



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Programa de Pós-graduação em Neurociências**  
**Instituto de Ciências Biológicas**

ISABELA CRISTINA SENA ROMANO

Efeitos da deficiência de tiamina e do processo de aprendizagem espacial sobre  
parâmetros neuroquímicos e imunológicos do hipocampo e tálamo de  
camundongos Swiss

Belo Horizonte  
2019

ISABELA CRISTINA SENA ROMANO

Efeitos da deficiência de tiamina e do processo de aprendizagem espacial sobre parâmetros neuroquímicos e imunológicos do hipocampo e tálamo de camundongos Swiss

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Doutora.**

Orientadora: Angela Maria Ribeiro

Belo Horizonte

2019

- 043 Romano, Isabela Cristina Sena.  
Efeitos da deficiência de tiamina e do processo de aprendizagem espacial sobre parâmetros neuroquímicos e imunológicos do hipocampo e tálamo de camundongos Swiss [manuscrito] / Isabela Cristina Sena Romano. - 2019.
- 170 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Angela Maria Ribeiro.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
1. Neurociências. 2. Deficiência de Tiamina. 3. Aprendizagem Espacial. 4. Hipocampo (Cérebro). 5. Tálamo. I. Ribeiro, Ângela Maria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.
- CDU: 612.8

Ficha elaborada por Sônia M.S. Moraes CRB 6/1357 - ICB/UFMG

## Agradecimentos

“Que eu possa agradecer a Vós,  
minha cama estreita,  
minhas coisinhas pobres,  
minha casa de chão,  
pedras e tábuas remontadas.  
E ter sempre um feixe de lenha  
debaixo do meu fogão de taipa,  
e acender, eu mesma,  
o fogo alegre da minha casa  
na manhã de um novo dia que começa”

Cora Coralina - Humildade

Tantas pessoas a agradecer, à minha orientadora, aos amigos de laboratório, aos meus pais e irmãos, ao meu marido, ao meu filho... Foi por causa dessa sólida rede de apoio que consegui realizar meu sonho. Sonho que muitas vezes pareceu inatingível. Mas essas pessoas queridas me sustentaram nos momentos de dúvida, me mostraram o norte nos momentos de desamparo e me mantiveram firme no meu propósito. Tenho sorte por ter em minha vida pessoas realmente valiosas e por isso serei para sempre grata. O que importa não é **o que** você tem, mas **quem** você tem na vida!!!!



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Efeitos da deficiência de tiamina e do processo de aprendizagem espacial sobre parâmetros neuroquímicos e imunológicos do hipocampo e tálamo de camundongos Swiss.**

### ISABELA CRISTINA SENA ROMANO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

Aprovada em 28 de novembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Angela Maria Ribeiro - Orientador  
UFMG

Prof(a). Claudio da Cunha  
UFPR

Prof(a). Gilberto Fernando Xavier  
USP

Prof(a). Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira  
UFMG

Prof(a). Juliana Carvalho Tavares  
UFMG

Belo Horizonte, 28 de novembro de 2019.

## RESUMO

O desenho experimental do presente estudo permitiu a avaliação dos efeitos de um episódio de deficiência de tiamina (DT) e do treino em uma tarefa de navegação espacial (aprendizado: AP), sobre componentes moleculares que são potenciais candidatos de exercerem papel importante no fenômeno da comunicação cruzada (*cross talking*) entre os Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Imunológico (SI). As hipóteses centrais foram: (i) componentes do SI e do SNC estão envolvidos no mecanismo molecular do aprendizado e memória espacial, sendo que o envolvimento desses componentes depende da etapa do processo da aprendizagem; e (ii) esses componentes moleculares podem ser alterados por um insulto neurodegenerativo, como a DT, que também afeta o processo de aquisição de uma tarefa espacial. Para testar essas hipóteses foram utilizados 112 camundongos *Swiss*, divididos em dois grupos: controle e DT. Após o episódio de DT, seguiu-se um período de recuperação de 30 dias. Cada grupo (controle e DT) foi subdividido em dois: um subgrupo foi submetido ao Labirinto em Tanque Raso (LTR) com o objetivo de solucioná-lo e o outro foi exposto ao LTR sem que o animal executasse a tarefa cognitiva. O treino ocorreu durante sete dias consecutivos. Imediatamente após as sessões 1, 3, 5, e 7 do treino, seis animais de cada subgrupo foram mortos por decapitação e amostras do hipocampo e tálamo foram separadas e utilizadas para as determinações, através de métodos bioquímicos, dos seguintes componentes neurobiológicos: GABA, glutamato, *Brain-Derived Neurotrophic Fator* (BDNF), Interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) e expressão do gene do *Bdnf*. Os resultados mostram que a DT afetou os níveis de GABA, taxa glutamato/GABA, BDNF, RNAm do gene *Bdnf*, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nas duas regiões cerebrais, tálamo e hipocampo. Verificou-se que o treino em uma tarefa cognitiva espacial está relacionado com alterações nos níveis de GABA, BDNF, RNAm do gene *Bdnf* e IL-1 $\beta$  do hipocampo, mas não do tálamo. Verifica-se que o esforço cognitivo em etapas iniciais e intermediárias do processo de aprendizagem está associado a alterações em componentes neuroimunológicos, que por sua vez relacionam-se entre si (p. ex., GABA e BDNF) e com o desempenho do indivíduo na aquisição da tarefa. Pela primeira vez, demonstra-se que componentes neuroimunológicos do hipocampo podem ser modulados durante a execução de uma tarefa cognitiva espacial e podem ser afetados por insultos neurodegenerativos, como a DT.

Palavras-Chave: Deficiência de Tiamina, etapas do aprendizado espacial, glutamato, GABA, BDNF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ .

## ABSTRACT

The experimental design of the present study allowed the evaluation of the effects of an episode of thiamine deficiency (TD) and training in a space navigation task (*Learning process*), on molecular components that are potential candidates to play a role in the phenomenon of cross talking between the Central Nervous System (CNS) and Immune System (IS). The central hypotheses were: (i) IS and CNS components are involved in the molecular mechanism of spatial learning and memory, and the involvement of these components depends on the stage of the learning process; and (ii) these molecular components can be altered by a neurodegenerative insult, such as the TD, which also affects the process of acquiring a spatial task. To test these hypotheses, 112 Swiss mice were used, divided into two groups: control and TD. After the TD episode, a 30-day recovery period was followed. Each group (control and TD) was subdivided into two: one subgroup was submitted to the shallow water maze (SWM) in order to solve it and the other was exposed to the STL without the animal performing the cognitive task. The training occurred during seven consecutive days. Immediately after training sessions 1, 3, 5, and 7, six animals from each subgroup were killed by decapitation and samples from the hippocampus and thalamus were separated and used for the determination, through biochemical methods, of the following neurobiological components: GABA, glutamate, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and *Bdnf* gene expression. The results show that TD affects GABA levels, glutamate/GABA rate, BDNF, *Bdnf* gene mRNA, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in both brain areas thalamus and hippocampus. Training in a spatial cognitive task has been found to be related to changes in GABA, BDNF, *Bdnf* gene mRNA and IL-1 $\beta$  levels in the hippocampus. Cognitive effort in the early and intermediate stages of the learning process is associated with changes in neuroimmunological components, which in turn are related to each other (i.e. GABA and BDNF) and to the individual's performance in the task acquisition. For the first time, it is demonstrated that neuroimmunological components of the hippocampus may be modulated during the performance of a spatial cognitive task and may be affected by neurodegenerative insults, such as TD.

Keywords: Thiamine deficiency, spatial learning steps, glutamate, GABA, BDNF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ .

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Actb** – *Actin beta* (Beta actina)

**AMPA** - *α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid* (Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazola-4-propionico)

**ANOVA** - Análise de variância

**βA**- Beta-Amilóide

**BDNF**- *Brain Derived Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)

**Bdnf**- gene do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

**CA**- corno de Amon

**cDNA** – *complementary desoxiribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico complementar)

**CE**- Córtex entorrinal

**CAP**- Controle aprendizado

**CAT**- Controle atividade

**CPF** – Córtex pré-frontal

**DAP**- Deficiente aprendizado

**DAT**- Deficiente atividade

**DPM** - Desvio padrão médio

**DT**- Deficiência de tiamina

**DTP**- Deficiência de tiamina induzida por piritiamina

**EW** – Encefalopatia de Wernick

**GABA**- *γ-aminobutírico acid* (Ácido γ-aminobutírico)

**GABA<sub>B</sub>**- receptor de GABA



**GAPDH** – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

**GD**- Giro denteado

**HPLC**- *High performance liquid chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance).

**IL-1 $\beta$** - Interleucina 1 beta

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-12p40**- Interleucina 12 subunidade 40

**KCC2** – K<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> cotransporter 2 (cotransportador de K<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> - 2)

**LAM** - Labirinto aquático de Morris

**LB**- Labirinto de Barnes

**LTM** - *Long-term memory* (Memória de Longa Duração).

**LTP** - *Long-term potentiation* (Potencialização de Longa duração)

**LTD** - *Long-term depression* (Depressão de Longa Duração)

**LTR** - Labirinto em Tanque Raso.

**MPA** - *3-mercaptopropionic acid* (ácido 3-mercaptopropiônico)

**NGF**- nerve Grow Factor (fator de crescimento nervoso)

**NMDA** - *N-metyl-D-Aspartate Acid* (ácido D-Metil-D-Aspartato)

**NT-3**- neurotrofina-3

**NT-4** - neurotrofina-4/5

**OD** - *Optical density* (densidade óptica)

**OPA**- *Ortophytaldeide* (ortoftaldeído)

**Ppia** – peptidilprolisomerase A

**PPT** – *Paddling poll task* (Tarefa em Tanque Raso)

**qPCR**- *quantitative Polymerase Chain Reaction* (reação quantitativa em cadeia da polimerase)

**RNA<sub>m</sub>**- ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensageiro)

**S**- segundos

**SI** - Sistema imunológico

**SLC19A2** - *Solute Carrier Family 19 Member 2* (membro 2 da Família 19 de carreadores solúveis)

**SLC19A3** - *Solute Carrier Family 19 Member 3* (membro 3 da Família 19 de carreadores solúveis)

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**STM**- *Short-term memory* (Memória de Curta Duração)

**SWK** - Síndrome de Wernick-Korsakoff

**TCA** - *tricarboxylic acid* (ácido tricarbóxico)

**TDP**- Tiamina difosfato

**ThTr1**- *Thiamine Transporter 1* (transportador de Tiamina 1)

**ThTr2** - *Thiamine Transporter 2* (transportador de Tiamina 2)

**TNF- $\alpha$**  - *Tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

**TrKB** - *Tropomyosin receptor kinase B* (receptor de tirosina cinase B)

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição da ração produzida no laboratório.....	49
<b>Tabela 2:</b> Composição da mistura de sais.....	50
<b>Tabela 3:</b> Composição da mistura de vitaminas.....	50
<b>Tabela 4:</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados na qPCR.....	62
<b>Tabela 5:</b> Principais efeitos da DT e do AP sobre parâmetros biológicos.....	86

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classificação dos sistemas de memória.....	22
<b>Figura 2:</b> Foto do Labirinto em Tanque Raso utilizado no presente estudo.....	53
<b>Figura 3:</b> Esquema do delineamento experimental.....	56
<b>Figura 4:</b> Esquema da distribuição dos animais em grupos.....	56
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	59
<b>Figura 6:</b> Perfil de um cromatograma representativo de uma análise.....	60
<b>Figura 7:</b> Variação do peso corporal e do consumo de ração.....	65
<b>Figura 8:</b> Curvas de aprendizado da tarefa espacial no LTR.....	69
<b>Figura 9:</b> Concentrações de glutamato e GABA no Tálamo de camundongos <i>Swiss</i> .....	71
<b>Figura 10:</b> Concentrações de glutamato e GABA no Hipocampo de camundongos <i>Swiss</i> .....	73
<b>Figura 11:</b> Taxa entre [glutamato]/GABA.....	75
<b>Figura 12:</b> Concentrações de BDNF no Tálamo e no Hipocampo de camundongos <i>Swiss</i> .....	78
<b>Figura 13:</b> Quantidade relativa de mRNA de <i>Bdnf</i> no Tálamo e Hipocampo.....	80
<b>Figura 14:</b> Concentrações de IL1- $\beta$ no Tálamo e no Hipocampo de camundongos <i>Swiss</i> .....	83
<b>Figura 15:</b> Concentrações de TNF- $\alpha$ no Tálamo e no Hipocampo de camundongos <i>Swiss</i> .....	85
<b>Figura 16:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e as concentrações de glutamato, no tálamo e hipocampo.....	89
<b>Figura 17:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e as concentrações de GABA, no tálamo e hipocampo.....	91
<b>Figura 18:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e as concentrações de taxa [glutamato]/[GABA], no tálamo e hipocampo.....	93
<b>Figura 19:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e as concentrações de níveis de BDNF, no tálamo e hipocampo.....	95
<b>Figura 20:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis relativos de RNAm do gene <i>Bdnf</i> no tálamo e hipocampo.....	97

<b>Figura 21:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de Il-1 $\beta$ no tálamo e hipocampo .....	99
<b>Figura 22:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de TNF- $\alpha$ no tálamo e hipocampo.....	101
<b>Figura 23:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre as concentrações de GABA e os níveis de BDNF no tálamo e no hipocampo.....	102
<b>Figura 24:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis relativos de RNAm DE Bdnf e os níveis de BDNF no tálamo e no hipocampo.....	103
<b>Figura 25:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de Il-1 $\beta$ e GABA no tálamo e no hipocampo.....	104
<b>Figura 26:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de TNF- $\alpha$ e GABA no tálamo e no hipocampo.....	105
<b>Figura 27:</b> Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de Il-1 $\beta$ e os níveis de BDNF e entre os níveis de TNF- $\alpha$ e BDNF no tálamo.....	106

## **SUMÁRIO**

### **1 INTRODUÇÃO**

1.1. Considerações Iniciais.....	16
1.2 Aprendizado e memória.....	20
1.3 Aprendizado e memória espacial: Bases neurobiológicas.....	27
1.3.1 Hipocampo.....	28
1.3.2 Circuitos Neuroquímicos X memória X Deficiência de Tiamina.....	32
1.3.3 Parâmetros Neuroimunes.....	35
1.3.3.1 Aspectos Gerais.....	35
1.3.3.2 BDNF.....	37
1.3.3.3 IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .....	40
1.4 Deficiência de Tiamina.....	41

### **2 HIPÓTESES**

2.1 Gerais.....	46
2.2 Específicas.....	46

### **3 OBJETIVOS**

3.1 Gerais.....	47
3.2 Específicos.....	47

### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

4.1 Animais.....	48
4.2 Episódio de Deficiência em Tiamina.....	48
4.3 Grupos experimentais.....	51
4.4 Labirinto em Tanque Raso- Tarefa de navegação espacial.....	51
4.4.1 Treino – Aprendizado espacial.....	53
4.5 Delineamento experimental.....	55

4.6 Dosagens de Glutamato e GABA por Cromatografia Líquida de Alta Performance ( <i>High performance liquid chromatography- HPLC</i> ).....	57
4.6.1 Processamento das amostras.....	57
4.6.2 Derivatização.....	57
4.6.3 Condições cromatográficas.....	58
4.7 Determinação dos níveis de BDNF, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .....	60
4.8 Determinações de RNAm do BDNF: análises por qPCR.....	61
4.9 Análises Estatísticas.....	62

## **5 RESULTADOS**

5.1 Modelo experimental.....	64
5.1.1 Peso corporal e consumo de ração.....	64
5.2 Efeitos da DT sobre o aprendizado.....	66
5.3 Efeitos da DT e AP sobre os níveis de Glutamato, GABA e taxa.....	70
5.3.1 Tálamo.....	70
5.3.2 Hipocampo.....	72
5.3.3 Taxa [glutamato]/GABA.....	74
5.4 Efeitos da DT e AP sobre os níveis de BDNF e RNAm de Bdnf.....	76
5.4.1 Níveis de BDNF no tálamo e no hipocampo.....	76
5.4.2 Níveis relativos de RNAm do gene do Bdnf no tálamo e no hipocampo.....	79
5.5 Efeitos da DT e AP sobre os níveis de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .....	81
5.5.1 Níveis de IL-1 $\beta$ no tálamo e no hipocampo.....	81
5.5.2 Níveis TNF- $\alpha$ no tálamo e no hipocampo.....	84
5.6 Principais efeitos da DT e do AP sobre parâmetros biológicos.....	86

5.7 Verificação da existência de correlação entre os dados comportamentais, imunológicos e neuroquímicos.....	87
5.7.1 Desempenho (número de erros) versus Parâmetros biológicos.....	88
5.7.1.1 Desempenho versus Glutamato, GABA ou Taxa [glutamato]/GABA (CAP+DAP; CAP; DAP).....	88
5.7.1.2 Desempenho versus BDNF ou RNAm de Bdnf.....	94
5.7.1.3 Desempenho versus IL-1 $\beta$ ou TNF- $\alpha$ .....	98
5.7.2 Correlações entre as variáveis neuroquímicas e neuroimunológicas..	102
5.7.2.1 CAPDAP.....	102
5.7.2.1.1 GABA versus BDNF.....	102
5.7.2.1.2 BDNF versus nível relativo de RNAm de Bdnf.....	103
5.7.2.1.3 GABA versus IL-1 $\beta$ .....	104
5.7.2.1.3 GABA versus TNF- $\alpha$ .....	105
5.7.2.2 CATDAT.....	106
5.7.2.2.1 BDNF, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .....	106
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>118</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>120</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>145</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações Iniciais

As bases neurobiológicas do processo de aprendizado e memória vêm sendo intensivamente investigadas por pesquisadores do mundo inteiro, principalmente no que se refere ao aprendizado e memória espacial, que são os componentes cognitivos primeiramente afetados nos casos de doenças neurodegenerativas. Contudo, apesar dos esforços de vários grupos de pesquisas, muito ainda permanece desconhecido sobre os mecanismos moleculares relacionados a esses processos cognitivos (p.ex. Nicola & Balázs, 2018; Yaniv, 2018; Nunes, 2018), tornando-se extremamente relevante os estudos, não apenas para o entendimento da fisiologia celular e molecular, que atua como base dos processos de aprendizado e memória, mas, também para contribuir no esclarecimento de suas disfunções. Um mecanismo neurobiológico chave destes processos cognitivos é o fenômeno da neuroplasticidade, que é a capacidade do cérebro remodelar-se, estruturalmente e funcionalmente, como o resultado de experiências cognitivas. Embora as bases da plasticidade sináptica estejam estabelecidas, muito da dinâmica molecular da neuroplasticidade continua obscura.

Durante meu trabalho de mestrado implantamos, no Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LANEC), um método para avaliar memória espacial em camundongos, utilizando o Labirinto em Tanque Raso (LTR) descrito por Deacon e Rawlins (2002). Os experimentos bioquímicos em amostras de tecido cerebral obtidas dos camundongos treinados no LTR mostraram um aumento significativo da concentração de Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no hipocampo dos animais que foram treinados na aquisição da tarefa espacial, além de correlações significativas

entre as concentrações de GABA e glutamato e também entre as concentrações desses neurotransmissores com o desempenho dos animais nas etapas iniciais do processo de aprendizagem (Sena, 2013). O dado referente à correlação significativa entre o desempenho nas primeiras sessões e os níveis de neurotransmissores no hipocampo despertou a atenção do nosso grupo de pesquisa, pois, corroborou uma hipótese levantada a partir de dados obtidos em trabalhos anteriores (Rêgo, 2014; Nunes, 2016), e também de outros autores (Langlais e cols., 1992), de que as fases iniciais e intermediárias do processo de aprendizado poderiam demandar componentes neurobiológicos distintos daqueles requisitados nas etapas posteriores. Ou seja, a hipótese levantada, e que se tornou a base central para o desenvolvimento do presente estudo, foi que os mecanismos neurobiológicos que participam do processo de aquisição de um aprendizado espacial variam de forma dependente das etapas deste processo. Propusemos então que, os substratos moleculares diferem entre as etapas do processo de aprendizagem e que as etapas iniciais (entre a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> sessões) parecem requerer alterações biológicas fundamentais para a aquisição da tarefa. Dados anteriores, obtidos pelo nosso grupo, mostraram ainda que o prejuízo no desempenho cognitivo em tarefas de navegação espacial, induzidas por insultos que causam neurodegeneração (p.ex. deficiência de tiamina, envelhecimento) ocorre na fase inicial do processo de aprendizado e a repetição da tarefa pode reverter os déficits inicialmente observados (Pires, 2005, Vigil e cols., 2010, Rêgo, 2014).

Tradicionalmente, ratos são usados como modelos experimentais para avaliação de funções cognitivas complexas (Tolman, 1948; Barnes, 1979; Morris, 1981; Deacon & Rawlins, 2002; Carvalho e cols., 2006; Oliveira-Silva e cols., 2007; Liguz-Leczna e

cols., 2014). No entanto, a utilização de camundongos apresenta algumas vantagens de acordo com os objetivos do estudo, como por exemplo, menor variação individual, disponibilidade no mercado de uma grande variedade de animais modificados geneticamente e maior variedade de anticorpos monoclonais comercializados, ampliando as possibilidades de estudos onde se propõe questões sobre o envolvimento de parâmetros imunológicos. Como uma segunda hipótese levantada no presente estudo, é que as alterações decorrentes de um insulto neurodegenerativo, que causa déficits cognitivos espaciais, envolvem não apenas disfunções bioquímicas, mas também imunológicas, decidimos que usar camundongos seria mais adequado.

No presente trabalho, utilizamos a Deficiência de Tiamina (DT) para induzir disfunções neurobiológicas em camundongos, a fim de estudar as consequências das alterações neuroquímicas e imunológicas centrais sobre o desempenho dos animais em uma tarefa de aprendizado espacial. A DT pode ser induzida em animais mediante administração de uma dieta desprovida dessa vitamina, associada ou não a administração parenteral de pirritiamina. Este último é um inibidor da pirofosfocinase, enzima responsável pela síntese da forma ativa da tiamina, a tiamina difosfato (TDP) (Hakim & Pappius, 1983; Hass, 1988; Vortmeyer & Colmant, 1988; Langlais e cols., 1996).

Segundo Martin e colaboradores (2003) uma das alterações bioquímicas causadas pela diminuição da concentração de tiamina nos tecidos encefálicos é a indução de processos neurodegenerativos, com alteração das funções cerebrais. Esses processos estão associados direta ou indiretamente à ativação precoce da micróglia,

células do Sistema Imunológico (SI) residentes no Sistema Nervoso Central (SNC) (Béchade e cols., 2013), devido à liberação de produtos neurotóxicos e citocinas pró-inflamatórias (Colton e Gilbert, 1987).

Sabe-se hoje que o papel da micróglia vai além daquele que se pensava no início da década de 2000, atribuindo a ela uma função de sentinela do SNC (Šiškov and Tremblay, 2013). Já existem evidências da atuação da micróglia na plasticidade sináptica (Ziv e cols., 2008; Wolf e cols., 2009) e na capacidade cognitiva (Kipnis e cols., 2004; Kipnis e cols., 2008). Além disso, alguns autores mostraram que a comunicação entre o SI e o SNC ocorre de forma bidirecional (Gladkevich e cols., 2004), sendo regulada por vários sinais, incluindo neurotransmissores, como glutamato e GABA, citocinas, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor alfa* = TNF- $\alpha$ ), a interleucina 1-  $\beta$  (IL1- $\beta$ ) (Black, 1995; Buckingham, 1996; Henry, 1997; McEwen, 1997) e neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain Derived Neural Factor* = BDNF) (Ferrini e Koninck, 2013).

Com a finalidade de estudar a dinâmica de algumas moléculas do SNC e do SI envolvidas nas etapas do processo de aprendizado e memória, o objetivo central do presente trabalho foi avaliar, em camundongos, a participação dos neurotransmissores, GABA e Glutamato, bem como da neurotrofina BDNF e das citocinas IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  em diferentes etapas do processo de aquisição de uma tarefa espacial, em condições fisiológicas e após recuperação dos animais de um episódio grave de DT. Em outras palavras, a hipótese é que a demanda de componentes neurobiológicos – neuroquímicos e imunológicos - durante o processo de aquisição de uma tarefa cognitiva espacial varia ao longo das etapas desse

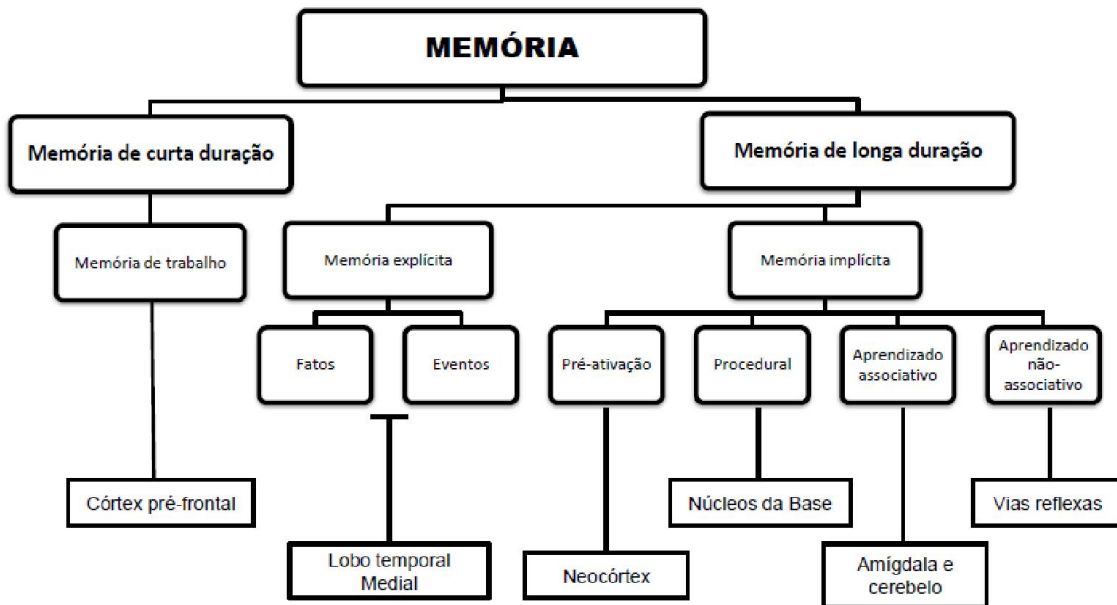
processo e que esses componentes sofrem alterações durante um episódio de neurodegeneração, afetando o desempenho cognitivo dos indivíduos. Em resumo, o desenho experimental do presente estudo possui duas variáveis independentes, deficiência de tiamina e aprendizado de uma tarefa cognitiva espacial, sendo as variáveis dependentes, parâmetros neuroquímicos e imunológicos, como GABA, glutamato, BDNF, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  medidos em etapas diferentes do processo de aprendizado.

## **1.2. Aprendizado e Memória**

Desde Aristóteles (385-322 a.C.) as pessoas se ocupam de entender funções cognitivas complexas, como o aprendizado e a memória. Esse filósofo já discutia a existência de diferentes componentes funcionais, diferenciando a aquisição da memória da capacidade de recordação (Aristóteles, trad. 1957). A maioria dos estudos sobre memória, até o final do século XIX, era no campo teórico devido à crença de que avaliar a memória era muito difícil e complexo. No entanto, em 1885, Hermann Ebbinghaus, mudou para sempre não só o estudo da memória, como toda a psicologia científica. Esse psicólogo estudou a memória de forma experimental desenvolvendo métodos de controle e quantificação, relacionando a memória ao desempenho em tarefas de aprendizagem. Anos mais tarde, William James (1890) se utilizando dos estudos de Ebbinghaus, propôs que havia dois tipos de memória, uma primária que diz respeito à percepção dos objetos e uma secundária, que seria a memória propriamente dita. Essa memória propriamente dita era conceituada como o “conhecimento de um estado mental anterior, após ele haver saído da consciência”. Mas foi com Endel Tulving (1983) que nasceu de fato a ciência

cognitiva, com sua teoria de dois sistemas de memória, a episódica e a semântica. Um conceito de memória mais geral, utilizado por Izquierdo (1989), baseando-se em dados obtidos por vários estudos, é que *“a memória representa o armazenamento e evocação de informação adquirida através de experiências; a aquisição de informações denomina-se aprendizado”*.

Atualmente, existe um consenso sobre a existência de três sistemas de aprendizado e memória distintos e bem definidos (**Figura 1**): memória de trabalho, memória de longo prazo implícita e memória de longo prazo explícita (Smith e Grossman, 2008). Esta é a classificação que adotamos nesse trabalho. Memória de trabalho, que pode também ser denominada memória operacional é um tipo de memória de curta duração, definida como um sistema de manutenção e manipulação ativa de uma quantidade limitada de informação durante uma quantidade limitada de tempo (Jonides, 1995). A memória de trabalho abrange o executivo central, um sistema de controle de atenção, suportado por dois sistemas responsáveis pelo arquivamento e manipulação temporária de informação, os sistemas visuo-espacial e fonológico. A memória de curta duração está relacionada ao córtex pré-frontal (Janowsky e cols., 1989), cerebelo (Pascual-Leone e cols., 1993), regiões occipital e parietal (Farah, 1988) e giros supramarginal e angular (Vallar & Shallice, 1990).



**Figura 1: Classificação dos sistemas de memória, baseado em García-Lázaro (2012). No fluxograma estão indicados os tipos de memórias e as principais estruturas encefálicas relacionadas aos processos centrais.**

A memória de longo prazo implícita, também chamada processual ou não-declarativa, envolve grande quantidade de informações que podem ser armazenadas e mantidas por longo período. A recuperação da memória implícita ou processual é feita sem a utilização da consciência e, assim, essa informação não pode ser declarada (Smith & Grossman, 2008). Esse sistema de memória é revelado quando uma experiência anterior melhora o desempenho em uma tarefa que não requer sua evocação consciente (Schacter, 1987). A memória implícita ou processual pode ser dividida em (i) pré-ativação, relacionada com estruturas do neocórtex, (ii) procedural, relacionada ao estriado, (iii) condicionamento, relacionado a amígdala e cerebelo e, (iv) aprendizado não-associativo, relacionado a vias reflexas (Smith & Grossman, 2008).

A memória de longo prazo explícita, ou memória declarativa, também envolve a codificação e armazenamento de grande quantidade de informação por um longo período de tempo. Diferentemente da memória implícita, essa memória pode ser evocada de forma consciente (Smith & Grossman, 2008). A memória declarativa pode ser subdividida em dois componentes, o semântico e o episódico. Memória semântica está relacionada ao armazenamento de informação de conhecimentos gerais acerca do mundo, enquanto a memória episódica engloba eventos dos quais participamos, ou seja, uma memória autobiográfica (Eisenkraemer, 2006). A codificação dessa informação dentro do sistema está relacionada a estruturas do lobo temporal medial e diencéfalo (Squire & Knowlton, 1995). Apesar de bem estabelecida, a classificação apresentada aqui, não abrange todos os tipos de memória descritos, alguns tipos ficam na interface entre duas classificações.

Este é o caso da Memória Espacial de Referência, que se considera como estando representada em uma interface, por apresentar componentes declarativos, não declarativos, de longa e de curta duração. A memória espacial de referência, conceituada inicialmente por Olton e colaboradores (1979), consiste em um sistema envolvido na obtenção de informação espacial através da repetição de uma tarefa, envolvendo a habilidade para codificar, armazenar por longo período e recuperar informações sobre localizações espaciais, configurações ou rotas (Kessels e cols., 2001). O estudo da memória espacial de referência torna-se importante na medida em que esse tipo de memória é prejudicado nos processos neurodegenerativos, que ocorrem em condições fisiológicas (envelhecimento) ou patológicas (doenças neurodegenerativas).



A memória espacial de referência foi muito estudada por Edward Tolman que propôs, em 1948, a possível existência de um mapa cognitivo, uma representação global real, no cérebro, do ambiente externo que permitiria ao animal se guiar pelo espaço. Em 1971, O'Keefe e Dostrovsky forneceram evidências neurobiológicas que corroboravam a hipótese de Tolman ao identificarem, em experimentos com ratos, as “*place cells*”, células piramidais do hipocampo, que se tornam ativas em conjunto dependendo da localização do animal. Mais tarde, o grupo de pesquisa de May-Britt e Edvard Moser demonstrou a existência das “*grid cells*”, células presentes no córtex entorrinal (CE) de ratos que mantêm um padrão de disparo em locais específicos, sustentando a teoria dos mapas cognitivos (Hafting, 2005). Essas descobertas em conjunto constituem forte evidência do papel do hipocampo e do CE na memória espacial e fornecem substratos neurobiológicos, no nível fisiológico, para essa teoria.

Com o intuito de estudar os processos relacionados ao aprendizado e à memória espacial, pesquisadores da área da psicologia experimental desenvolveram inúmeros testes, usualmente utilizando labirintos (p.ex. Barnes, 1979; Morris, 1981; Deacon e Rawlins, 2002). No caso da memória espacial de referência, o animal deve aprender e lembrar-se de uma localização alvo, que lhe proporcione alguma recompensa, que pode ser segurança ou comida, a serem acessados por meio de dicas visuo-espaciais fixas e extra-labirinto (Carrillo-Mora e cols., 2009), sendo que a recompensa se mantém na mesma localização durante todas as sessões do processo de aprendizado.

Existe uma enorme diversidade de labirintos que tem sido utilizada na avaliação da memória espacial de referência: labirintos abertos com múltiplas rotas como o Labirinto de Barnes - LB (Barnes, 1979) e o Labirinto Aquático de Morris - LAM (Morris, 1981); labirintos abertos com rotas restritas como os labirintos radiais, em 'Y' ou 'T' (Olton e Samuelson, 1976) e labirintos complexos como o de Biel (Biel, 1940) e o Cincinnati (Vorhees, 1983). Alguns labirintos são mais utilizados, como o LAM, LB e o Labirinto radial projetado por Olton e Samuelson (1976). Devido à importância dos fundamentos e princípios para os métodos utilizados no presente estudo, o LAM e o LB serão discutidos de forma mais detalhada.

Os LAM e LB são muito parecidos em relação à tarefa, que consiste no animal aprender e lembrar a localização de uma zona alvo, criando um mapa espacial a partir de dicas, fixas e extra-labirinto, presentes no ambiente (Rudy, 1987). Ambos os labirintos foram desenvolvidos para ratos e seu uso para camundongos requer algumas modificações. O LB consiste em uma plataforma circular aberta e elevada em relação ao chão, na qual existem vários orifícios/saídas falsas e apenas uma saída real, todas presentes ao longo da borda da plataforma, sendo que o número de "saídas"/orifícios pode variar dependendo do objetivo e do modelo utilizado. Embaixo de uma dessas saídas – a saída real - existe uma caixa (reforço) que permite que o animal se abrigue, enquanto as outras saídas são falsas, pois, estão fechadas. O objetivo do teste é que o animal aprenda a localizar a saída que permite refúgio. Porém, esse tipo de labirinto apresenta como desvantagem um aprendizado relativamente lento, devido à ausência de estímulos suficientemente fortes (Sunyer, 2007), além de permitir – caso não seja suficientemente limpo (variável de controle relativamente difícil/subjetiva) entre as tentativas - que o animal se guie por dicas

olfativas ao invés de dicas espaciais para solucionar o labirinto (Carrillo-Mora e cols., 2009).

O LAM consiste em uma piscina circular, na qual se encontra submersa em água uma plataforma de material transparente, invisível para o roedor. Para solucionar o labirinto, o animal deve encontrar a plataforma, que está deslocada para o centro da piscina, usando como referência as dicas espaciais presentes no ambiente. Devido à localização da plataforma, para solucionar o labirinto, o animal deve ir contra sua tendência natural de nadar na periferia da piscina (tigmotaxia) (Deacon, 2013; Carrillo-Mora e cols., 2009). A utilização da água diminui a chance do animal se guiar por dicas olfativas e, portanto, não espaciais. No entanto, esse mesmo estímulo pode ser muito aversivo e estressante para o animal, podendo comprometer seu desempenho na tarefa cognitiva. No caso da utilização do LAM para testar o desempenho de camundongos, deve-se considerar que esses animais são piores nadadores que ratos (Wishaw, 1995), além de haver uma grande preocupação com a rápida perda de calor dos camundongos (Deacon, 2013).

Considerando as desvantagens e o fato de que esses labirintos foram desenvolvidos em um contexto no qual os ratos eram os animais predominantemente usados em pesquisa comportamental, alguns pesquisadores vêm trabalhando para desenvolver testes que permitam utilizar camundongos como modelo experimental em avaliações de funções cognitivas espaciais. Deacon e Rawlins (2002) desenvolveram um equipamento, que pode ser considerado um híbrido do LB e do LAM, ou seja, com características desses dois labirintos, na tentativa de ajustar as melhores condições para avaliação do desempenho cognitivo de camundongos. Esse labirinto

denominado Labirinto em Tanque Raso (LTR) e na língua inglesa de *Shallow Water Maze (SWM)* ou *Paddling Pool Task (PPT)* foi validado em larga escala por Sankowski e cols., (2019). Esses autores mostraram que o LTR fornece resultados altamente confiáveis para testar a cognição espacial em camundongos C57/BL6. O LTR contém 2,5 cm de profundidade de água, permitindo que o animal caminhe, descartando a necessidade de nadar. O nível da água, embora relativamente baixo, comparado com o LAM, é suficiente para evitar que o animal se guie por dicas olfativas, além da saída para escape estar disposta na periferia do equipamento, se adequando ao comportamento natural do animal (Deacon & Rawlins, 2002; Schmitt, 2004; Deacon, 2013, Sankowski e cols., 2019). Camundongos com lesão no hipocampo mostraram um enorme prejuízo para encontrar a saída no LTR, demonstrando novamente a importância do lobo temporal medial para aprendizado e memória espacial de referência e a eficiência da tarefa no LTR para detectar prejuízos nestes componentes (Deacon e Rawlins, 2002, Sankowski e cols., 2019). Para responder as questões levantadas no presente estudo, optamos por utilizar camundongos como modelo experimental e, assim, escolhemos o LTR como paradigma comportamental.

### **1.3 Aprendizado e Memória Espacial: Bases Neurobiológicas**

Questões sobre os substratos biológicos da memória começaram a aparecer na segunda metade do século XX, com os avanços biotecnológicos que tornaram possível o avanço dos estudos de um nível descritivo, realizados primeiro no campo da filosofia, depois da psicologia, para a exploração de mecanismos na área da biologia. Apesar dos debates teóricos sobre a existência ou não de múltiplos

sistemas de memória (Poldrack and Foerde, 2008), evidências das neurociências tem apontado que os processos de aprendizagem e memória são compostos de múltiplos sistemas, que possuem diferentes princípios de operação e diferente neuroanatomia, como por exemplo, hipocampo e estruturas relacionadas - a amígdala, o neocórtex e o cerebelo (Squire, 2004, 2009). Em animais experimentais e seres humanos, lesões limitadas ao hipocampo, CE ou fórnix, tipicamente causam prejuízo da memória recente, que é a memória primeiramente afetada em várias doenças neurodegenerativas (Deacon e Rawlings, 2002; Eichembaum e Cohen, 2001).

### **1.3.1 Hipocampo**

Todas as fases do aprendizado espacial, aquisição, codificação e recuperação, estão relacionadas a um sistema de estruturas localizadas na região medial do lobo temporal como o hipocampo, córtex parietal posterior e o córtex retrosplenial. Algumas outras estruturas, também vêm sendo reconhecidas como componentes de vias que integram esse sistema, como o septo medial, que é a principal entrada de informação no hipocampo (Solari e Hangya, 2018). Apesar da participação dessas diferentes estruturas, o hipocampo é considerado um importante protagonista no fenômeno da cognição espacial.

A participação do hipocampo no aprendizado e memória declarativa episódica foi demonstrada nos estudos pioneiros sobre memória, conduzidos pela psicóloga Brenda Milner, com o paciente H.M. (Scoville e Milner, 1957.). Os resultados dos estudos com o paciente H.M. estabeleceram três princípios fundamentais que

continuam a orientar o trabalho experimental. Primeiro, a memória é uma função cerebral distinta, separável de outras habilidades cognitivas. Segundo, como o H.M. foi capaz de reter um número ou uma imagem visual por um curto período de tempo, o lobo temporal medial não é necessário para a memória imediata. Terceiro, as estruturas danificadas em H.M. não são o repositório da memória remota, porque ele reteve suas memórias de infância. Posteriormente, ficou claro que apenas um tipo de memória, a memória declarativa, foi prejudicada no H.M. e outros pacientes similares (Cohen e Squire, 1980).

A possibilidade de analisar as funções de conexões específicas dentro do lobo temporal medial tem avançado com o uso de novas técnicas genéticas e fisiológicas, bem como de técnicas de neuroimagem, que detectam informações detalhadas sobre a conectividade dessas regiões.

Os esforços para alcançar um modelo animal de memória humana prejudicada tiveram sucesso inicialmente utilizando-se macaco como modelo experimental (Mishkin, 1978). Os estudos com abordagem comportamental, juntamente com estudos neuroanatômicos, eventualmente identificou os componentes anatômicos do sistema de memória do lobo temporal medial que representam as bases da memória declarativa (Squire e Zola-Morgan, 1991): o hipocampo (incluindo os campos CA, o giro dentado (GD) e o complexo subicular), juntamente com os córtices entorhinal (CE), perirrinal e parahipocampal adjacentes que compõem grande parte do giro parahipocampal (Amaral & Witter, 1989; Knowles, 1992).

O hipocampo é uma estrutura alongada no eixo dorso-ventral em roedores e no eixo ântero-posterior em primatas. É composto por um arquicórtex formado por uma lâmina contínua de neurônios que se dobra sobre si mesma durante o desenvolvimento, dando origem a duas estruturas em forma de C. Essa forma específica do hipocampo rendeu a uma dessas estruturas o nome de Corno de Amon (CA) pela semelhança com o chifre presente na cabeça do Deus Egípcio Amon, e a outra estrutura o nome de Giro Denteado.

Desde a descoberta de células de localização (*place cells*) no hipocampo de ratos (O'Keefe e Dostrovsky, 1971), o hipocampo tem sido um foco nos estudos de como a informação espacial é representada no sistema nervoso e como o conhecimento espacial é usado para navegação (O'Keefe e Nadel, 1978; Moser e cols., 2008). Células de localização e células de grade (*grid cells*) (Fyhn e cols., 2004), mencionadas anteriormente, fornecem recursos computacionais que são substratos para a navegação. Tem-se verificado que lesões no hipocampo prejudicam o desempenho de animais em tarefas que requerem aprendizado de dicas espaciais para serem resolvidas (Nilson, 1987; Eichenbaum & Cohen, 2001; Deacon & Rawlins, 2002, Xavier & Costa, 2009).

Achados relevantes suportam a visão de que as células de localização do hipocampo não apenas atuam em funções da posição espacial do animal no momento presente, mas podem sinalizar escolha futura, eventos passados e estados motivacionais, (Pastalkova e cols., 2008). O hipocampo participa juntamente com a amígdala nos comportamentos defensivos, de fuga e esquiva, relacionados

ao medo e à ansiedade, respectivamente (Gray, 1982; Gray & McNaughton, 2000; Bannerman e cols., 2004)

A conexão intrínseca da circuitaria hipocampal foi descrita como trissináptica, uma via glutamatérgica que se inicia pela via perforante, via que parte do CE projetando para o GD onde se fazem as primeiras sinapses; em seguida as fibras musgosas que partem do GD fazem sinapses com as células piramidais em CA3 formando o segundo grupo de sinapses; por fim, as fibras que partem de CA3 formando o colateral de Schaffer fazem sinapses com as células piramidais em CA1 (Henze, 2000, Kwon e cols., 2018). Além disto, se conhecem outras vias que atuam paralelas às vias do sistema trissináptico; uma via monossináptica que liga fibras que saem de CE para o GD diretamente a CA1, CA2 e CA3 e uma via bissináptica que liga o CE a CA1, CA2 e CA3 sem passar pelo GD (Steward, 1976; Tamamaki, 1988). Importante destacar que, existem evidências do perfil de conectividade em neurônios excitatórios (piramidais CA1) e inibitórios (parvalbumina- positivos CA1) inervados pelas mesmas vias pré- sinápticas - *in puts* – (colaterais de Schaffer CA3), indicando a importância dos componentes excitatórios e inibitórios na função hipocampal (Kwon e cols, 2018). Estudo recente mostra a co-participação do GABA e da acetilcolina na modulação do estado funcional do hipocampo (Takács e cols., 2018).



### **1.3.2 Circuitos glutamatérgicos e GABAérgicos X Memória X Deficiência de Tiamina.**

As diversas funções do SNC de mamíferos envolvem vários circuitos neuroquímicos, dentre eles o balanço entre os sistemas glutamatérgico e GABAérgico tem um papel importante, tanto para o desenvolvimento, quanto para a manutenção de funções cognitivas complexas, como aprendizado e memória (Foster e Kemp, 2006). O equilíbrio funcional entre o sistema glutamatérgico e GABAérgico, respectivamente excitatório e inibitório, está associado à vários processos fisiológicos como, neurogênese, migração celular e plasticidade neuronal (Nacher e cols., 2002; McGee e Brecht, 2003, Foster & Kemp, 2006).

O hipocampo é também substrato neurobiológico para o fenômeno da neurogênese, o qual regula a plasticidade e a função do próprio hipocampo que, como mencionado acima, desempenha papel crítico na memória e na vulnerabilidade à neurodegeneração. A neurogênese é regulada por atividades neuronais, particularmente pelo balanço entre os sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos (Zhao e cols., 2008; Sun e cols., 2009). Existem evidências de que o desequilíbrio nesses sistemas resulta em danos no processo de neurogênese (Sun e cols, 2009) e, conseqüentemente, em funções cognitivas dependentes desse processo, como por exemplo, a memória (Taupin, 2006).

Experimentos desenvolvidos por Riedel e colaboradores (1996) e Whitlock e colaboradores (2006) mostraram o envolvimento do receptor glutamatérgico do tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA) na Potencialização de Longa Duração (LTP), processo

eletrofisiológico considerado envolvido na formação de memória. A utilização de drogas que afetam a LTP, em estudos farmacológicos, leva a alterações comportamentais dependentes do hipocampo, que podem ser quantificadas por déficit no desempenho de tarefas espaciais (Bikbaev e cols., 2008, Neyman & Manahan-Vaughan, 2008).

Dados de diferentes estudos mostram que o circuito GABAérgico está envolvido no aprendizado e memória (Toso e cols., 2007; McNally e cols., 2008). Diversos tipos de interneurônios GABAérgicos foram descritos no hipocampo, formando sinapses em diferentes domínios das células alvo pós-sinápticas e exercendo importante papel modulatório (Han e cols., 1993; Freund e Buzsáki, 1996, Takács e cols., 2018). A transmissão GABAérgica também pode estar envolvida no mecanismo de LTP, pois, a administração de antagonistas de receptores de GABA resulta na facilitação da indução de LTP. Assim, a LTP pode estar relacionada ao aumento da atividade excitatória glutamatérgica e diminuição da atividade inibitória GABAérgica, corroborando o papel desses sistemas no aprendizado e memória (Mott e Lewis, 1991).

Um dado interessante é que a manutenção das atividades glutamatérgicas e GABAérgicas requer uma constante fonte de energia, desde que os processos de exocitose até a captação de glutamato e GABA e, subsequente metabolismo desses dois neurotransmissores, são processos interligados com o metabolismo energético. A tiamina tem um papel importante na atividade do ciclo de Krebs e, portanto, a deficiência desta vitamina pode afetar os níveis desses neurotransmissores (Schousboe e cols, 2007). Nosso grupo mostrou, em 2010, que a restrição de

tiamina durante o desenvolvimento induz disfunções na cognição espacial e altera os níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais (Freitas-Silva e cols., 2010). Posteriormente, mostramos que o desempenho cognitivo de roedores em tarefas espaciais altera os níveis de GABA no hipocampo (Sena, 2015), indicando um possível papel do GABA no processo de aprendizado. Além disto, utilizando técnicas de análise proteômica, mostramos que a deficiência de tiamina aumenta a expressão da enzima responsável pela produção de GABA, a glutamato descarboxilase 1 (GAD1) a partir de glutamato (Nunes e cols., 2018), sugerindo um efeito compensatório, para aumentar os níveis de GABA diminuídos pela deficiência de tiamina. Esses achados, juntamente com outras evidências da literatura, foram utilizados como base para a elaboração de uma das hipóteses do presente estudo, que se refere ao papel funcional do GABA como componente do mecanismo de aprendizado e memória espacial. Doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (DA) (Quevenco e cols., 2019, Burbaeva e cols., 2014) e doença de Parkinson (DP) (Buchanan e cols., 2014), também envolvem distúrbios em sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos, indicando a relevância desses sistemas em processos associados à déficits cognitivos.

Além da sua importância como componentes de sistemas de transmissão de informação entre neurônios, glutamato e GABA participam também como componentes moleculares em mecanismos de interfaces entre funções dos SNA e SI. A ativação de receptores microgliais para glutamato do tipo AMPA induzem liberação de TNF- $\alpha$  (Hagino, 2004) e a estimulação do receptor GABA<sub>B</sub> em micróglia reduz a liberação de IL-6 e IL-12p40, que são citocinas envolvidas em processos inflamatórios (Kunh, 2004). Alguns dados mostram também que sinapses

glutamatérgicas e GABAérgicas, principalmente no hipocampo, podem ser moduladas via BDNF micróglial (Gottmann e cols., 2009; Frerking e col., 1998; Tanaka e cols., 1997; Baldelli e cols., 2002, 2005). Dessa forma, o entendimento da dinâmica entre essas moléculas e seus papéis durante o processo de aprendizado, em condições fisiológicas ou no estado de deficiência de tiamina pode representar uma importante contribuição na compreensão das bases biológicas desse processo.

### **1.3.3 Parâmetros neuroimunológicos**

#### **1.3.3.1 Aspectos gerais**

Há várias evidências de uma interação entre o SNC e o SI que contribui ativamente para a homeostase do organismo (Kanchan e cols., 2018; Ransohoff e cols., 2003; Rogers e cols., 2011; Tremblay e cols., 2011), incluindo funções de processos cognitivos (Derecki e cols., 2010) e a neurogênese no hipocampo (Wolf e cols., 2009). Recentes evidências reforçam a ideia de que o sistema imune fornece suporte para o sistema nervoso central em vários níveis. Martin and Kipnis, 2017 apresentaram uma ampla revisão sobre as interações entre SI e SNC. No entanto, embora estudos sobre essa interação tenham se acumulado nos últimos anos, muitos pontos relacionados aos mecanismos dessas interações continuam obscuros.

Micróglia são células do SI, especificamente da imunidade inata, residentes no SNC. Essas células podem reagir a alterações em seu microambiente, produzindo moléculas que participam do processo inflamatório, exercendo papel fisiológico para manutenção da homeostase e também mediando processos, que até muito

recentemente eram considerados como sendo apenas associados às células do sistema nervoso, como a plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Kanchan e cols., 2018). Essas células, através de seus prolongamentos (processos microgliais) são capazes de se comunicar fisicamente com vários elementos sinápticos, indicando um papel modulador da atividade sináptica e da plasticidade (Kanchan e cols., 2018; Wake e cols., 2009; Tremblay e cols., 2010; Schafer e cols., 2012). Neste sentido, existem também evidências de que a micróglia integra vias da resposta imune, que afetadas podem estar associadas com doenças do SNC (Matcovitch-Natan e cols, 2016).

Recentes achados (Wendeln e cols, 2018) demonstram que a aplicação periférica de estímulos inflamatórios induz aprendizado agudo do sistema imune e tolerância no cérebro e resulta em uma reprogramação epigenética da micróglia cerebral, que persiste por seis meses. Esses autores mostraram também uma associação entre estímulos periféricos do sistema imune e a produção de beta-amilóide ( $\beta$ A). Além disto, foi verificada uma ligação do sistema imune com o estado neuropatológico, após um insulto, como por exemplo, um derrame. Por outro lado, em alguns estados fisiológicos, a micróglia pode ter um papel neuroprotetor, como por exemplo, na eliminação de  $\beta$ A associada à estímulos repetitivos de estresse, associados à um processo neurodegenerativo (Kanchan e cols, 2018)

O papel das células gliais, na regulação da homeostase cerebral, acontece através do mecanismo de ação de mediadores químicos produzidos por essas células, como por exemplo: neurotransmissores, BDNF, citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico. (Batchelor e cols., 1999; Davalos e cols., 2005; Nakajima e Kohsaka, 2004, Ferrini e

Koninck, 2013). No envelhecimento (neurodegeneração fisiológica) foi observado que o cérebro de indivíduos idosos apresenta certa vulnerabilidade a disfunções do sistema imune, com evidências de interações entre micróglia, IL-1  $\beta$ , BDNF e plasticidade sináptica (Petterson, 2018).

Sabe-se que células imunes são capazes de produzir BDNF, o qual previne danos axonais e neuronais após um insulto no SNC. Portanto, o BDNF é um candidato importante para mediar os efeitos neuroprotetores (Stadelmann e cols, 2002). Tem se tornado cada vez mais evidente que no caso de lesões do SNC as células do sistema imune podem liberar tanto moléculas neurodegenerativas como neuroprotetoras. O equilíbrio entre esses dois fatores determina o resultado da interação entre esses dois sistemas (Kerschensteiner and Hohlfeld, 2009).

### **1.3.3.2 BDNF**

Em 1982 foi descrito o segundo membro da família das neurotrofinas [o primeiro foi o Fator de Crescimento do Nervo (NGF) na década de 50], o BDNF, cuja ação promove o crescimento e a sobrevivência de uma variedade de neurônios, incluindo neurônios ganglionares da raiz dorsal, hipocámpais e corticais (Acheson e cols., 1995; Huang e Reichardt, 2001). Dados recentes indicam que o BDNF é uma das moléculas candidatas como potencial componente do mecanismo de interface entre SNC e SI (De Pins e cols., 2019).

Neurotrofinas desempenham papel na neuroplasticidade, neurogênese e neuroproteção no SNC. Como mencionado, a família das neurotrofinas inclui o

NGF, o BDNF, a neurotrofina 3 (NT-3) e neurotrofina 4/5 (NT-4). Essas moléculas são expressas abundantemente no hipocampo, região descrita acima, que desempenha função cognitiva importante, como nos processos de aprendizado e memória. A expressão de neurotrofina hipocampal diminui durante o envelhecimento e também em doenças neurodegenerativas, como a DA (Murer e cols., 2001; Phillips e cols., 1991; Ferrer e cols., 1999). Por outro lado, um aumento das neurotrofinas, especialmente do BDNF, mantém e melhora a função cognitiva em indivíduos idosos e previne a neurodegeneração no hipocampo (Hall e cols., 2000; Gonçalves e cols., 2006).

O BDNF possui um importante papel na diferenciação e sobrevivência neuronal, além de atuar como neuromodulador, controlando diretamente a atividade neuronal e a plasticidade sináptica (Mattson, 2008; Merighi e cols., 2008; Santos e cols., 2010). Esta neurotrofina está também envolvida nos fenômenos de LTP e de Depressão de Longa Duração (LTD), mecanismos eletrofisiológicos relacionados aos processos de aprendizado e memória (Huang e Reichardt, 2001; Bramham e Messaoudi, 2005, Bekinschtein e cols., 2008; Vedder e Savage, 2017).

Existem vários estudos apresentando evidências da participação do BDNF em processos de aprendizagem e memória, sendo que nos últimos anos o papel desta neurotrofina como parte do mecanismo de processos cognitivos, tem sido cada vez mais explorado (p.ex. Zhong e cols., 2018; Gao e cols., 2018; Ortiz e cols., 2018, Choi e cols., 2018, El Hayet e cols., 2019, Wang e cols., 2019).

O gene *Bdnf* em humanos, presente no cromossomo 11, possui 4 exons 5' (I ao IV) que são associados a distintos promotores e um exon 3' (V) que codifica a proteína BDNF madura. São transcritos oito diferentes RNAm, sendo que aqueles contendo os exons I, II e III são, predominantemente, expressos no cérebro (Timmusk e cols., 1993), enquanto os RNAm contendo o exon IV predominam no pulmão e coração. A síntese de RNAs contendo exons I a III é induzida de forma significativa por estímulos convulsivos no cérebro, enquanto os tipos com exons IV apenas aumentam ligeiramente (Timmusk e cols., 1993). A indução da síntese de RNAm, acentuada ou não, é controlada por promotores distintos para os quatro subtipos.

Cada uma das neurotrofinas liga-se à um ou mais receptores da família tirosina kinase (TrK= *Tropomyosin-Related Tyrosine Kinase*), principalmente os TrKB, receptores esses que são amplamente expressos no SNC (Patapoutian e Reichardt, 2001, Zahavi e cols, 2018). A ativação da sinalização BDNF-TrK funciona como um facilitador na neurotransmissão sináptica em CA1, estimulando a síntese protéica (Kang e Schuman, 1996; Shratt, 2004; Takei e cols., 2004; Leal e cols., 2014; Panja e Bramham, 2014).

Camundongos homozigotos para deleção do gene *Bdnf* (-/-) sobrevivem apenas 3 semanas e os heterozigotos (+/-) são viáveis, mas exibem uma variedade de fenótipos, como: obesidade (Lyons e cols., 1999; Kernie e cols., 2000), diminuição da suscetibilidade à convulsões (Kokaia e cols., 1995) e prejuízo no desempenho em tarefas de aprendizagem espacial (Linnarsson e cols., 1997).



### 1.3.3.3 IL- 1 $\beta$ e TNF- $\alpha$

Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias liberadas pela ativação da micróglia, como IL-1 $\beta$  (Wu e cols., 2012) e TNF- $\alpha$  (Cacci e cols., 2012) podem afetar, especificamente, precursores neurais, diferenciação e sobrevivência neuronal. Ambas as citocinas afetam a transcrição de genes, a transdução de sinal, a atividade neuronal e a apoptose (Goshen, 2008; Koo, 2008; Kuzumaki e cols., 2010; Wu e cols., 2012).

A citocina IL-1 é produzida por uma variedade de células, como macrófagos, fibroblastos, micróglia e neurônios (Bianchi e cols., 1999). A IL-1 possui duas formas ativas a  $\alpha$  e a  $\beta$ , e a maioria das suas ações biológicas ocorre por meio da indução da transcrição de moléculas envolvidas na produção de mediadores pró-inflamatórios (Wesche e cols., 1997; Dinarello, 1996). Essas citocinas são muito importantes para a resposta imune inata e participam da cascata inflamatória e de processos que culminam em neurodegeneração (Akiama e cols., 2000).

O TNF- $\alpha$  é um importante regulador dos mecanismos de sinalização imunológicos, sendo produzido por células da glia, neurônios, macrófagos e outras células do SI. No cérebro essa interleucina circunda as sinapses e regula a comunicação dos neurônios (Tobinick, 2009), e sua presença no líquido tem sido associada à modulação da atividade neuronal e da LTP (Yamamoto e cols., 2007).

O processo inflamatório no cérebro é reconhecido como um importante fator em várias doenças neurológicas como doença de Alzheimer, acidente vascular cerebral

e esclerose múltipla. Durante a inflamação as células microgлияis e outros componentes da imunidade inata secretam seus produtos que acabam por lesar as células presentes naquele microambiente. Wang e Hazzel mostraram em 2010 que micrógliaas ativadas também são as principais responsáveis pelo comprometimento neurológico observado em animais com deficiência de tiamina, sendo o estresse oxidativo o principal responsável pela ativação microglial.

#### **1.4. Deficiência de Tiamina**

A primeira citação da existência da vitamina B1, também chamada de tiamina, ocorreu a 4000 anos atrás, na China (Said, 2011). Essa vitamina foi sintetizada pela primeira vez em 1936 (Williams e Cline, 1936). Na sua forma livre (T<sup>+</sup>), a vitamina B1 é composta por um anel tiazol e um grupo pirimidina, que juntos formam uma estrutura de dois anéis contendo enxofre, unidos por um grupo metileno (Said, 2011). Depois de ingerida, é absorvida no intestino delgado por dois transportadores específicos ThTr1 e ThTr2, produtos dos genes SLC19A2 e SLC19A3, respectivamente (Martin e cols., 2003; Mayr e cols., 2011). SLC19A2 é largamente expresso em vários tecidos, com maior expressão no músculo esquelético e não participa da absorção intestinal. Por outro lado, o SLC19A3 é predominante expresso no duodeno (Zhao and Goldman, 2013). Após ser captada pelos tecidos, a tiamina é ativada na forma de TDP ou tiamina pirofosfato (TPP) pela ação da enzima pirofosfocinase. A TDP tem sua principal função como coenzima em reações do metabolismo energético celular, como a reação do piruvato à acetil-CoA, e reações das vias das pentoses e do ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA: *tricarboxylic acid cycle*) (Haas, 1988; Berg e cols., 2004). A TDP, no citoplasma, atua

na via das pentoses como cofator da enzima Transcetolase, participando do metabolismo da glicose e na biossíntese de lipídeos. Essa forma fosforilada da tiamina é transportada para a mitocôndria, onde atua como cofator do Complexo Piruvato Desidrogenase e da enzima  $\alpha$ -Cetoglutarato Desidrogenase, sendo que essa última faz parte do TCA (Mayr e *cols.*, 2011).

Mais tarde descobriu-se que a tiamina também pode agir através de mecanismos nos quais não atua como coenzima. Ela pode atuar facilitando a neurotransmissão acetilcolinérgica pela sua coliberação com acetilcolina na fenda sináptica. Esse papel da tiamina foi corroborado pela descoberta da fosforilação dependente de tiamina difosfato de um receptor de acetilcolina (Aleshin e *cols.*, 2019).

A ingestão inadequada ou má absorção de tiamina, associada ou não ao uso de álcool (Thomson e *cols.*, 1970; Harper, 2009; Kopelman e *cols.*, 2009), pode reduzir os níveis dessa vitamina no corpo levando a um quadro de deficiência (DT). Essa deficiência também pode ocorrer pelo aumento da demanda ou pela perda de B1 por hiperemese, que ocorre durante a gravidez (Butterworth e *cols.*, 1993; Baker e *cols.*, 2002), na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Alcaide e *cols.*, 2003) e em doenças gastrointestinais (Butterworth 2009).

A DT é considerada uma doença nutricional, metabólica enzimática e neuroinflamatória capaz de afetar tanto o sistema nervoso quanto o cardiovascular (Abdou e Hazell, 2015). A carência de tiamina resulta no enfraquecimento da função mitocondrial associada à diminuição da atividade das enzimas dependentes de tiamina citadas acima. Como estão envolvidas no metabolismo da glicose, a

disfunção dessas enzimas, causa prejuízo na síntese de ATP, mudanças na função cerebral, alterações em neurotransmissores, estresse oxidativo/nitrosativo, acidose láctica, diminuição do pH cerebral, excitotoxicidade, inflamação, estresse do retículo endoplasmático, disfunção da barreira hemato-encefálica e apoptose (Jhala e Hazell, 2011). A falta de vitamina B1 afeta também a biossíntese de lipídios e, conseqüentemente, causa prejuízo na constituição da bainha de mielina (Okazaki e *cols.*, 1990).

A DT pode resultar em doenças neurodegenerativas como a Encefalopatia de Wernicke (EW), cujos principais sintomas são: oftalmoplegia, ataxia, perda de memória, confusão mental (Butterworth 2009) e hipoatividade da marcha e da postura (Zubaran e *cols.*, 1997). A EW, se não tratada, leva a uma condição mais grave que é a Síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK), caracterizada pelo surgimento de déficits cognitivos, neurológicos e comportamentais, frequentemente encontrados em pacientes com diagnóstico de alcoolismo crônico (Dror e *cols.*, 2014; Scalzo e *cols.*, 2015). As regiões predominantemente afetadas pela DT são o tálamo, corpos mamilares, região periaquedutal, assoalho do quarto ventrículo, hipotálamo, vermis cerebelar, hipocampo, ponte, cerebelo e córtex pré-frontal (Torvik, 1986; Victor e *cols.*, 1989; Sullivan e Pfefferbaum, 2009). A administração de tiamina em pacientes na fase aguda, EW, pode prevenir, reduzir ou reverter os sintomas, porém em casos crônicos, SWK, devido à lesões relacionadas à morte neuronal, os comprometimentos são irreversíveis (Sechi e Serra, 2007).

A DT parece estar envolvida também em outras doenças neurodegenerativas, como DP e DA (Tanev e *cols.*, 2008). Múltiplas semelhanças existem entre a DT e a DA,

principalmente em relação a redução do metabolismo da glicose no cérebro (Gibson e cols., 2016). As características compartilhadas entre a DT e outras doenças neurodegenerativas primárias constituem uma plataforma única na pesquisa sobre doenças neurodegenerativas (Gibson e cols., 2016). Por possuírem etapas moleculares similares, relacionadas ao processo de morte neuronal, o uso do modelo da DT como instrumento na pesquisa básica se torna uma vantagem, uma vez que o pesquisador conhece a causa primária da neurodegeneração e, portanto, tem mais controle e possibilidades de manipulação das variáveis.

A DT pode ser induzida através de um dos quatro protocolos: (i) dieta deficiente em B1; (ii) dieta deficiente em B1 associada ao tratamento crônico com etanol e (iii) dieta deficiente em B1 associada à administração parenteral de piritiamina (DTP), um inibidor da pirofosfocinase, enzima responsável pela produção da forma ativa da tiamina, a TDP e (iv) deficiência ou restrição maternal de B1 (Hakim e Pappius, 1983; Haas, 1988; Vortmeyer e Colmant, 1988; Langlais e cols., 1996; Oliveira e cols., 2007; De Freitas-Silva e cols., 2010). Esses modelos experimentais têm revelado que a DT induz disfunções em regiões cerebrais específicas, em um padrão bastante similar ao que ocorre nos seres humanos (Savage e cols., 2012).

Dados obtidos por nosso grupo e outros autores têm mostrado que a deficiência de tiamina (DT) interfere em vários mecanismos celulares capazes de desencadear processos neurodegenerativos centrais, afetando funções cerebrais como memória e aprendizado (Resende e cols., 2012; Vigil e cols., 2010; Martin e cols., 2003; Butterworth, 2003), e disfunções bioquímicas como mudanças nas concentrações de

acetilcolina (Pires e cols., 2015, Vetreno, 2011), glutamato e GABA (Feitas-Silva e cols., 2010) e serotonina (Vigil e cols., 2010).

Ao longo do episódio de DT em modelos experimentais, como os roedores, sinais clínicos são utilizados como evidências para se acompanhar a evolução do processo. Assim, observa-se: alopecia, hipersensibilidade a estímulos, anorexia, perda do tônus muscular, ataxia, postura distônica (hopistótonos), perda do reflexo de endireitamento e convulsões. Nos últimos estágios, nos quais os animais apresentam sinais neurológicos da deficiência, se a tiamina não for rapidamente repostada, os animais podem morrer (Zhang e cols., 1995; Mousseau e cols., 1996; Ciccia e Langlais, 2000). O tempo em que os primeiros sinais aparecem varia de acordo com o protocolo seguido e com o modelo utilizado. No modelo de DTP (modelo utilizado no presente estudo: deficiência na dieta associada ao tratamento com pirritiamina), os sinais clínicos se manifestam por volta do 9º dia de tratamento e os sinais neurológicos no 12º dia.

## **2 HIPÓTESES**

### **2.1 Geral**

O aprendizado de uma tarefa cognitiva espacial induz variações em parâmetros imunológicos e neuroquímicos no cérebro de camundongos *Swiss* e esses efeitos dependem da etapa do processo de aprendizado e são afetados pela deficiência de tiamina.

### **2.2 Específicas**

O aprendizado de uma tarefa cognitiva espacial induz variações nos níveis de glutamato, GABA, BDNF, IL1- $\beta$ , e de TNF- $\alpha$  no hipocampo, mas não no tálamo, de camundongos *Swiss*.

Os efeitos do processo de aprendizado sobre os níveis de glutamato, GABA, BDNF, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  no hipocampo são mais pronunciados nas etapas iniciais da aquisição da tarefa, onde existe uma maior demanda funcional associada a esses componentes moleculares.

Os efeitos da deficiência de tiamina sobre o processo de aprendizagem espacial afetam os níveis de glutamato, GABA, BDNF, IL1- $\beta$ , e TNF- $\alpha$  no hipocampo, que são importantes durante a aquisição da tarefa, induzindo déficits que são mais intensos nas etapas iniciais do processo.

A repetição da tarefa espacial, através das sessões de treino, reverte os efeitos da deficiência de tiamina sobre os parâmetros neuroimunológicos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar parâmetros neuroquímicos e imunológicos em camundongos *Swiss* deficientes ou não em tiamina, durante as etapas do processo de aprendizado de uma tarefa de navegação espacial.

#### **3.2 Específicos**

Determinar os seguintes parâmetros em camundongos adultos submetidos ou não a deficiência de tiamina:

- O peso e o consumo de ração, ao longo do episódio de deficiência em tiamina;
- O desempenho dos animais – aprendizado - em tarefa de navegação espacial;
- As concentrações de GABA e glutamato no hipocampo e no tálamo, em diferentes etapas do processo de aprendizado.
- As concentrações de BDNF, RNAm de Bdnf, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  no hipocampo e no tálamo, em diferentes etapas do processo de aprendizado.

E, avaliar as correlações entre os diferentes parâmetros imunológicos, neuroquímicos e comportamentais, mencionados acima.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados 112 camundongos machos, adultos (dois meses de idade), da linhagem *Swiss*, provenientes do biotério de criação da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os camundongos foram mantidos no biotério experimental do Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LaNeC), sob ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum* durante o tempo que antecedeu os experimentos. Os animais foram mantidos e periodicamente manipulados (no momento do tratamento) por duas semanas (período de aclimatação) antes de se iniciar os experimentos. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela *Comissão de Ética no Uso Animal - CEUA* da UFMG sob o número de protocolo 73/2015.

### **4.2 Episódio de Deficiência em Tiamina**

Os 112 camundongos foram divididos inicialmente em dois grupos experimentais, grupo controle (n= 56) e grupo DT (n=56). Ambos os grupos receberam ração deficiente em tiamina (**Tabelas 1, 2 e 3**), sendo que a diferença entre eles consistiu na administração de 0,25mg/kg de pirritiamina (inibidor da pirofosfocinase) nos animais do grupo DT e 0,4mg/kg de tiamina nos animais do grupo controle (Resende e cols. 2012). O primeiro dia de tratamento foi considerado o Dia 0 (D0), no qual os animais foram pesados, receberam injeções e tiveram acesso a ração deficiente em tiamina. Durante os doze dias de tratamento, referentes ao episódio de DT, o consumo de ração e de peso corporal de todos os animais foram registrados

diariamente. Esses registros nos possibilitaram acompanhar a evolução dos primeiros sinais clínicos da deficiência, que são anorexia e perda de peso. Após o aparecimento de um dos últimos sinais neurológicos, perda de reflexos de endireitamento ou convulsões, que ocorreu por volta do 12<sup>o</sup> dia de tratamento. O episódio de DT foi interrompido pela administração de dose única de injeção i.p. de tiamina (1mg em 0.1mL de salina/10 g de peso corporal; Sigma) (Inaba e cols., 2016). Os animais do grupo controle receberam tratamento pareado na forma de injeções i.p. de salina (0,1ml/ 10g de peso corporal). Após o episódio de DT, todos os animais foram submetidos a um período de recuperação, recebendo ração e água *ad libitum*, durante 30 dias.

**Tabela 1: Composição da ração produzida no laboratório**

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

**Tabela 2: Composição da mistura de sais**

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

**Tabela 3: Composição da mistura de vitaminas**

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

### **4.3. Grupos Experimentais**

Após o período de recuperação (30 dias) os dois grupos de camundongos (C e DT) foram, cada um, subdivididos em outros dois subgrupos, denominados Atividade (AT) e Aprendizado (AP). Assim foram formados quatro grupos: Controle Atividade (CAT, n=28), Controle Aprendizado (CAP, n=28), Deficiente Atividade (DAT, n=28) e Deficiente Aprendizado (DAP, n=28). A distribuição desses grupos está apresentada no **Painel A da Figura 3**. Os animais dos dois grupos Aprendizado (CAP e DAP) foram submetidos ao treino da tarefa cognitiva no LTR, como detalhado abaixo no item **“4.4.1 Treino – Aprendizado Espacial”**.

Os camundongos dos dois grupos Atividade (CAT e DAT) foram expostos ao LTR, porém sem o objetivo de solucionar o labirinto. Os animais desses grupos não foram treinados. Para isto, foi utilizado o mesmo protocolo, porém todas as saídas foram fechadas e ao final dos 60s (tempo máximo de cada tentativa) o animal foi retirado do labirinto pelo experimentador e devolvido à gaiola. Desta forma, os animais desses dois grupos puderam explorar livremente o labirinto, mas não tiveram nenhuma tarefa a ser aprendida. Assim, esses dois grupos representaram um tipo de controle da variável de atividade motora.

### **4.4 Labirinto em Tanque Raso- Tarefa de navegação espacial**

As avaliações comportamentais foram realizadas utilizando o LTR, um labirinto construído de acordo com especificações descritas por Deacon e Rawlins (2002), porém com algumas modificações nas dimensões e materiais utilizados. A seguir

descrevemos os protocolos dos procedimentos utilizados durante o treino dos animais, delineados e validados por Deacon e Rawlins (2002), com pequenas modificações descritas por Sena (2013). Conforme mencionado na Introdução do presente estudo, o método do LTR foi recentemente validado em larga escala por Sankowski e cols. (2019), comprovando-se a sua eficiência para avaliar o desempenho cognitivo espacial de camundongos C57/BL6. Resumidamente, o equipamento consiste de um labirinto (LTR) circular recoberto com material emborrachado preto. A borda circular da plataforma (base do labirinto) é limitada por uma parede de acrílico transparente, composta por 12 placas de 20 cm de altura e 30 cm de largura, compondo um dodecágono (**Figura 2**). Em cada junção entre duas placas consecutivas de acrílico, na borda, existe uma saída construída com tubos de material plástico preto, com 40 mm de diâmetro. Apenas uma das 12 saídas existentes tem abertura que permite ao camundongo sair do labirinto (saída verdadeira), sendo que as outras 11 saídas são falsas. O LTR foi colocado em uma sala com pistas visuais fixas, extra-labirinto, que serviram de referências visuo-espaciais, utilizadas pelos camundongos para localizar a saída (reforço). Essa saída verdadeira foi mantida na mesma orientação em relação às pistas externas. Portanto, a posição do labirinto na sala não foi alterada durante o treino, ou seja, entre as tentativas e entre as sessões.

O equipamento não possui nenhuma pista, marca ou sinal interno, que pudesse servir de pista intralabirinto. Uma câmera de televisão com lente angular foi fixada no teto da sala, na direção bem acima do labirinto, para registrar o comportamento do camundongo durante as tentativas do treino.



**Figura 2:** Labirinto em Tanque Raso utilizado para avaliar o desempenho dos camundongos na tarefa de navegação espacial. O labirinto consiste em um equipamento circular com doze saídas, sendo apenas uma verdadeira (reforço).

#### **4.4.1 Treino – Aprendizado Espacial**

O treino (aquisição) foi realizado em sete sessões consecutivas, sendo uma sessão por dia. Cada sessão foi constituída de quatro tentativas com rodízio dos camundongos entre as tentativas. O intervalo entre a 1ª tentativa de uma sessão e a 1ª tentativa do dia seguinte foi de aproximadamente 24 horas e os intervalos entre as tentativas de uma mesma sessão foi de cerca de uma hora. Todas as sessões do treino foram realizadas no período da manhã, entre 8h e 12h. Durante o treino, a saída (reforço) estava localizada em uma posição constante, em relação às dicas extra-labirinto, na periferia do quadrante Norte (quadrante alvo). Cada tentativa consistiu em colocar o animal no centro do labirinto com a cabeça voltada para um quadrante diferente. O camundongo foi deixado no equipamento por no máximo 60s.

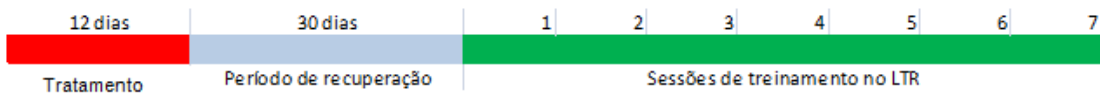
Cada tentativa foi finalizada quando o camundongo encontrava a saída ou se o tempo de 60s fosse atingido e, neste último caso, o experimentador, com a ajuda de duas placas transparentes, direcionava gentilmente o animal até a saída. Depois de encontrar ou ser guiado até a saída, o tubo em que o camundongo se encontrava, era retirado do equipamento e o animal era recolocado dentro de sua gaiola. A latência (tempo em segundos gasto pelo camundongo para encontrar a saída) foi utilizada como unidade quantitativa do desempenho do camundongo durante o treino no LTR. A latência, em segundos, foi obtida através do cálculo da mediana dos valores nas quatro tentativas de cada sessão. Quanto menor a latência, melhor o desempenho do animal. Outra unidade de registro do desempenho dos animais foi o número de erros, que nos parece ser uma medida mais precisa do desempenho cognitivo já que não depende da velocidade do animal. Foi considerado “erro” todas as vezes em que o animal introduzia a cabeça em um tubo sem saída.

Resumindo: o desempenho do animal, em cada tentativa de uma sessão, foi registrado em duas unidades: (i) latência (s), definida como o tempo gasto para o animal encontrar o reforço (saída) e (ii) número de erros, definido como o número de vezes que o animal tentava entrar, colocando a cabeça, em um tubo sem saída, ou seja, errava o alvo. O resultado final do desempenho de cada animal em cada sessão foi expresso: (i) pela mediana das latências (s) das quatro tentativas em cada sessão e (ii) pela mediana do número de erros das quatro tentativas em cada sessão. O resultado do desempenho médio dos animais de cada grupo foi expresso como a média  $\pm$  desvio padrão das medianas obtidas no desempenho de cada animal.

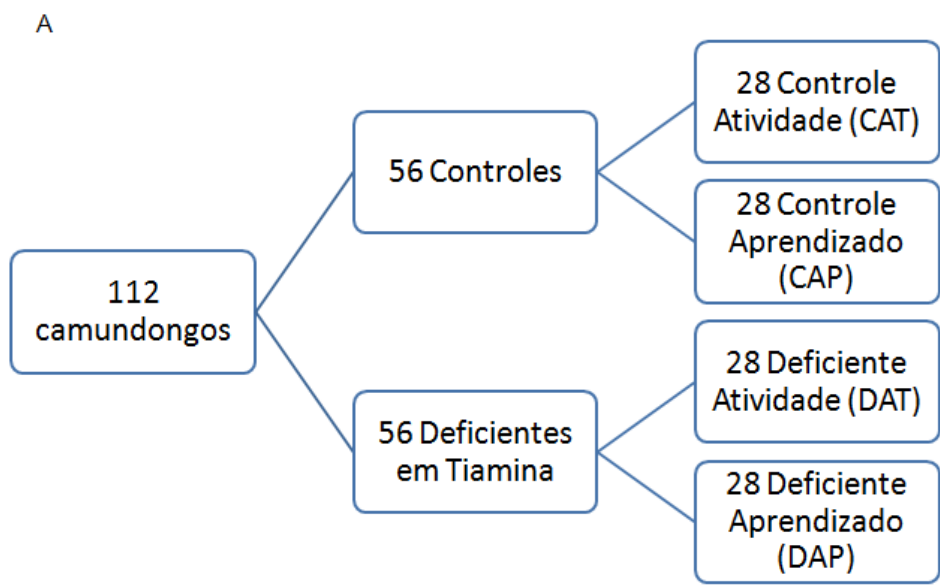
#### 4.5 Delineamento experimental

Após o período de doze dias de DT, os 112 camundongos se recuperaram por 30 dias (período de Recuperação). Os camundongos dos quatro grupos experimentais foram submetidos ao LTR, treinados (CAP e DAP) ou não (CAT e DAT), durante sete dias consecutivos (sete sessões). Um esquema geral do Delineamento Experimental está apresentado na **Figura 3**. Imediatamente após as sessões 1, 3, 5 e 7 do Treino, seis camundongos de cada um dos quatro grupos, conforme distribuição apresentada no **Painel B da Figura 4**, foram mortos por decapitação. Após a execução, os encéfalos foram rapidamente retirados da cavidade craniana e embebidos em solução de Ringer e, a seguir colocados sobre uma placa de Petri invertida sobre gelo para a separação dos hemisférios, e coleta (hemisfério direito e esquerdo) das regiões do tálamo e hipocampo. Após a separação dos hemisférios, cada tálamo foi retirado da região medial. Depois, o mesencéfalo foi removido e o hipocampo exposto foi cuidadosamente dissecado da região cortical de cada hemisfério. As amostras de tálamo e hipocampo foram pesadas e armazenadas em microtubos e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento para determinação das concentrações de glutamato, GABA, BDNF, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . No dia dos ensaios bioquímicos, as amostras de tálamo e hipocampo foram selecionadas de forma aleatória (hemisfério direito ou esquerdo) e descongeladas para serem processadas, conforme descrito abaixo.





**Figura 3** Esquema do delineamento experimental. Os animais foram submetidos a um Episódio de doze dias de Deficiência em Tiamina, seguido por um período de Recuperação de 30 dias. A seguir foram submetidos à avaliação comportamental no LTR, durante sete sessões (uma por dia). Cada sessão foi composta por quatro tentativas, com duração máxima de 60 segundos.



B

Sessões	1	2	3	4	5	6	7
Animais por sessão	28	22	22	16	16	10	10
Animais mortos por sessão	6	0	6	0	6	0	10

O número de animais foi o mesmo para todos os grupos.

**Figura 4:** Esquema da distribuição dos animais em grupos (Painel A) e o Número de camundongos removidos (para os estudos biológicos) e o número dos remanescentes em cada sessão do treino (Painel B).

#### **4.6 Dosagens de Glutamato e GABA por Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High performance liquid chromatography*- HPLC)**

O método utilizado no presente estudo para as dosagens de GABA e Glutamato foi desenvolvido pelo nosso grupo (Freitas-Silva e cols., 2010), e se encontra detalhado abaixo.

##### **4.6.1 Processamento das amostras**

Conforme mencionado acima, de cada animal foram escolhidos aleatoriamente um dos tálamos e um dos hipocampos, retirados do hemisfério direito ou do esquerdo, para serem utilizados nas dosagens neuroquímicas. As amostras foram descongeladas e homogeneizadas em 15 volumes de solução metanol: água (85:15 v/v) em homogeneizador semiautomático. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 4 °C, durante 15 minutos em uma rotação de 7.800 x g (Sorvall RC-5B). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi coletado e mantido no gelo, até ser submetido à derivatização, que ocorreu no mesmo dia, um minuto antes das amostras serem aplicadas no HPLC.

##### **4.6.2 Derivatização**

Devido à ausência de características eletroativas ou fluorescentes intrínsecas dos aminoácidos glutamato e GABA, utilizou-se a técnica de derivatização pré-coluna para a separação e identificação cromatográfica desses compostos. A derivatização pré-coluna foi realizada conforme descrito previamente por Mengerink e cols. (2002)

e Kutlán e Molnár-Perl (2003). A reação de derivatização foi feita misturando-se 100  $\mu\text{L}$  de amostra (sobrenadante obtido do processamento das amostras de tálamo ou hipocampo), 20  $\mu\text{L}$  de ortoftaldeído (OPA) metanólico (5 mg/mL) preparado no dia do ensaio, 75  $\mu\text{L}$  de tampão borato (pH 9,9) e 5  $\mu\text{L}$  de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). A solução resultante foi levemente agitada e injetada no sistema cromatográfico após um minuto, à temperatura ambiente.

#### **4.6.3 Condições cromatográficas**

O sistema utilizado foi o cromatógrafo *Shimadzu* (LC-10AD, Tokyo, Japan) com válvula injetora de 200  $\mu\text{L}$  (*Rheodyne 7725-I*, California, USA) e detector fluorescente (FLD - *Shimadzu spectrofluorometric detector* RF-551, Tokyo, Japan) acoplado a uma bomba LC-10. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 337 e 454 nm, respectivamente. Uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (150 mm $\times$ 4,6 mm, ID) e pré-coluna (RT 250-4 E. Merck, Darmstadt E.R., Germany) foram utilizadas nas análises (**Figura 5**)

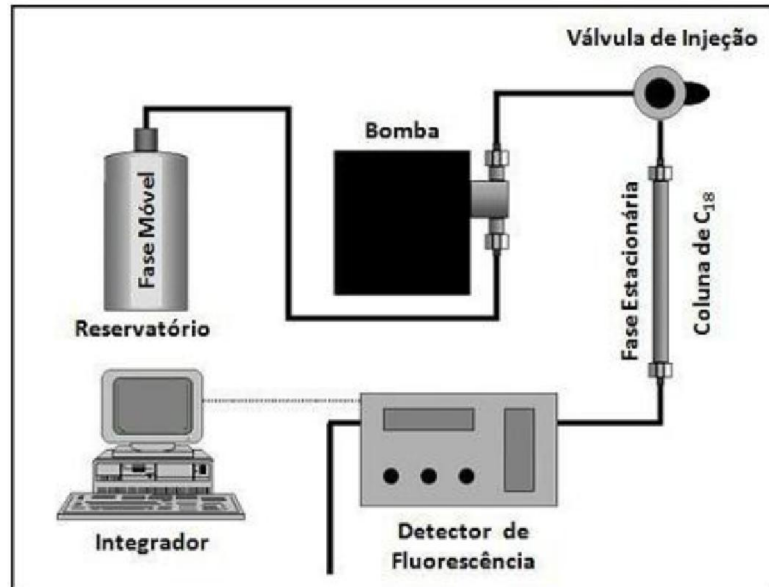


Figura 5 Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – Figura retirada do site: <http://pfarma.com.br/farmacutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>, acesso em 05-02-15.

A fase móvel isocrática consistiu em uma solução 0,05 M de acetato de sódio, tetrahydrofurano e metanol (50:1:49 v/v), pH 4,0. Glutamato e GABA foram eluídos em um tempo inferior a 9 minutos e as concentrações desses neurotransmissores nas amostras de tecido cerebral – Tálamo e Hipocampo - foram calculadas de acordo com as áreas dos picos e respectivas curvas padrões. Um integrador (Shimadzu C-R7Ae plus) contendo um programa de análise de dados acoplado ao sistema cromatográfico forneceu a área dos picos dos cromatogramas (**Figura 6**) a partir da intensidade de fluorescência. Os dados das concentrações de glutamato e GABA foram expressos como média das triplicatas de cada amostra em  $\mu\text{g/g}$  de tecido e  $\text{ng/g}$  de tecido, respectivamente.

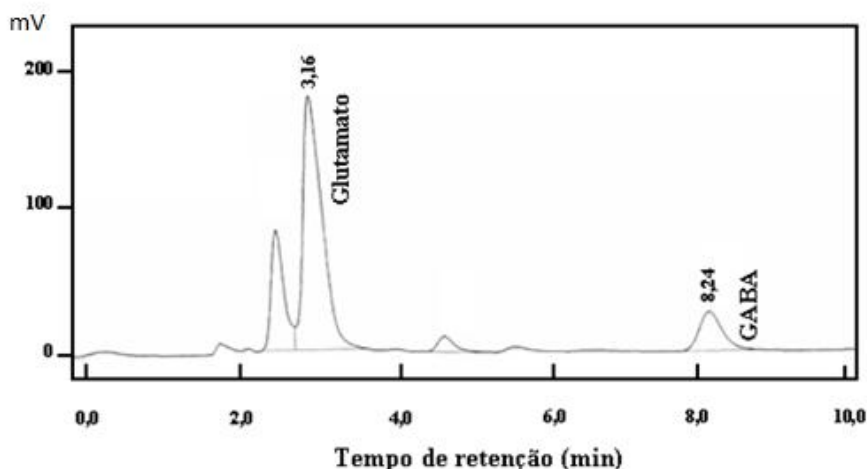


Figura 6: Perfil de um cromatograma representativo de uma análise, indicando os picos de glutamato e GABA e seus respectivos tempos de retenção. min=minutos, mV=milivolts.

#### 4.7 Determinação dos níveis de BDNF, IL1- $\beta$ , e de TNF- $\alpha$

As concentrações de IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e BDNF em amostras de Tálamo e Hipocampo foram determinadas por ELISA sanduíche (*MATURE BDNF RAPID ELISA KIT, Biosensis; Chemicon International, Temecula, CA- MILLIPORE; Kit Elisa Max Deluxe para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ - Biolegend*) de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, as amostras foram homogeneizadas com tampão de lise, 10mL/g de tecido (20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, NP40 1% (v/v), Glicerol 10%(m/v), 1mM PMSF, 10mM EDTA, 10 $\mu$ M E-64, 0,5mM Vanadato de Sódio). As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e diluídos com tampão diluente de amostra (1:2 v/v). O padrão liofilizado foi reconstituído e diluições seriadas foram realizadas para a obtenção da curva padrão (0-1000 pg/mL). As análises das amostras e padrões foram realizadas em duplicatas. As concentrações de IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e BDNF, foram expressas em pg/mg

tecido, as quais foram determinadas a partir das densidades ópticas (OD) obtidas em 450nm.

#### **4.8 Determinações de RNAm do Bdnf: análises por qPCR**

Após conhecermos os resultados da quantificação do BDNF, por ELISA, nos quais constatamos efeitos significativos dos tratamentos (Treino e DT), decidimos realizar outro ensaio, com o objetivo de verificar se os efeitos observados sobre os níveis protéicos de BDNF seriam via expressão do Bdnf ou na tradução e processamento da proteína. No entanto, devido à quantidade insuficiente de amostras provenientes de alguns animais que compunham os grupos CAT e DAT, realizamos apenas ensaios de qPCR com amostras de tálamo e hipocampo obtidas dos animais dos grupos CAP e DAP.

Os procedimentos do qPCR foram realizados de acordo com Magalhães, 2015. Brevemente, O RNA total foi extraído das amostras (tálamo ou hipocampo) usando TRizol®, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amostras foram quantificadas usando o DeNovix DS-11 (DeNovix, Delaware, EUA). Para síntese de cDNA, 600 ng de RNA total foram usados na reação de transcrição reversa com primers oligo (dT20) (Prodinol Biotechnology, Belo Horizonte, Brasil) e *Revertaid® transcriptase* (Thermo, São Paulo, Brasil), de acordo com a instruções do fabricante. Foi realizada uma qPCR com o Kit de Master Mix Kapa Fastq de PCR SYBR® (Kapa Biosystems, São Paulo, Brasil) e com o sistema CFX96 Touch™ RT-PCR (BioRad). Os parâmetros utilizados foram os seguintes: 95°C durante 3min, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 3s e 60°C durante 20s. Os níveis de fluorescência foram medidos durante o passo final de cada ciclo (60°C). Em todas as

reações, um controle negativo sem *primer* de cDNA foi testado. Para normalizar os níveis de mRNA, três genes de referência (gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (GAPDH), beta-actina (Actb) e Cyclo ou Ppia (*peptidilprolisomerase A*) foram usados. A quantidade relativa do gene de interesse, o Bdnf, foi calculado conforme descrito por Vandesompele e colaboradores (2002) e ao seu valor foi atribuído uma unidade arbitrária.

**Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados na qPCR. Genes normalizadores (*Gapdh*: gliceraldeído-3- fosfato dehidrogenase, *Actb*: beta actina, *Cyclo* e o gene de interesse *Bdnf*.**

<b>Genes</b>	<b><i>Foward Sequence (5'-3')</i></b>	<b><i>Reverse Sequence (5'-3')</i></b>
Gapdh	AGGAGCGAGACCCCACTAAC	GTGGTTCACACCCATCACAA
Actb	GTGGGAATGGGTCAGAAGG	GGTCATCTTTTCACGGTTGG
Cyclo	AATGCTGGACCAAACACAAA	CCTTCTTTCACCTTCCCAA
Bdnf	AGTGGAGCCGAACAACTGATT	CGTTTACTTCTTTCATGGGCG

#### **4.9 Análises Estatísticas**

A análise dos dados foi feita por meio do programa GraphPad Prism 5.0/2007. A normalidade dos dados foi verificada através dos testes de Kolmogorovi-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os dados comportamentais, assim como os dados dentro de cada grupo (CAT, DAT, CAP, DAP) e os dados de quantificação do gene Bdnf foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida por pós-teste de Bonferroni. Os demais dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste Bonferroni para avaliar a diferença entre os grupos

CAT, DAT, CAP e DAP. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % ( $p < 0,05$ ).

A fim de avaliar o grau de relacionamento linear entre os dados emparelhados das amostras, utilizamos o Coeficiente de Correlação de Pearson (dados paramétricos). Uma vez que verificamos que havia correlação linear entre os dados ( $p < 0,05$ ), nós utilizamos o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para definir quão bem a variável resposta poderia ser predita a partir da variável preditora, ou seja, qual era o grau de ajuste da amostra com o modelo de regressão linear. Resumindo, para dizer que havia correlação entre os dados utilizamos como valores de corte  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,25$  para um  $n=24$  e  $r^2 > 0,19$  para  $n=48$  (Quinino e cols., 2011) Com a finalidade de extrair o máximo de informação dos dados testamos a existência de correlação não só com os dados dos grupos isolados, mas também unimos grupos que apresentavam diferença em uma única variável. A saber: Unimos CAT com DAT (cuja diferença reside unicamente no tratamento); CAP com DAP (cuja diferença também reside no tratamento); CAT com CAP (cuja diferença reside na aquisição da tarefa) e DAT com DAP (cuja diferença também reside na aquisição da tarefa).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Modelo Experimental

#### 5.1.1 Peso corporal e Consumo de ração

Como mencionado em Material e Métodos, o peso corporal e o consumo de ração dos 112 camundongos foram medidos diariamente. Os dados apresentados no **Painel A da Figura 7** são relativos ao peso corporal, e se referem a medidas realizadas do dia 0 (primeiro dia em que foi colocada a ração deficiente) até o 12º dia, quando o episódio de DT foi interrompido. A análise de variância com medidas repetidas mostrou que não houve efeito do tempo ( $F_{(12,1224)}=1,59$ ;  $p=0,08$ ), porém houve efeito da deficiência ( $F_{(1,1224)}=20,50$ ;  $p<0,0001$ ) e interação ( $F_{(12,1224)}=27,28$ ;  $p<0,001$ ) entre os dois efeitos sobre o peso dos camundongos (Figura 6A). Diferenças entre o grupo deficiente e controle foram observadas entre os dias 8 e 12 do episódio de DT, conforme resultado obtido com o pós-teste de Bonferroni.

Os dados referentes ao **consumo de ração** estão apresentados no **Painel B da Figura 7 e** são a partir do dia 1 até o 12º dia. A análise de variância com medidas repetidas mostrou que houve efeito do tratamento/DT ( $F_{(11,24)}=11,49$ ;  $p<0,0001$ ) e efeito do tempo ( $F_{(11,24)}=5,16$ ;  $p=0,03$ ). No entanto, não houve interação ( $F_{(11,48)}=1,75$ ;  $p=0,09$ ) entre os efeitos DT e tempo. O pós-teste de Bonferroni não identificou diferenças entre dias específicos, indicando que o efeito “tratamento” e “tempo” sobre o consumo de ração se distribui ao longo do tratamento para os dois grupos.

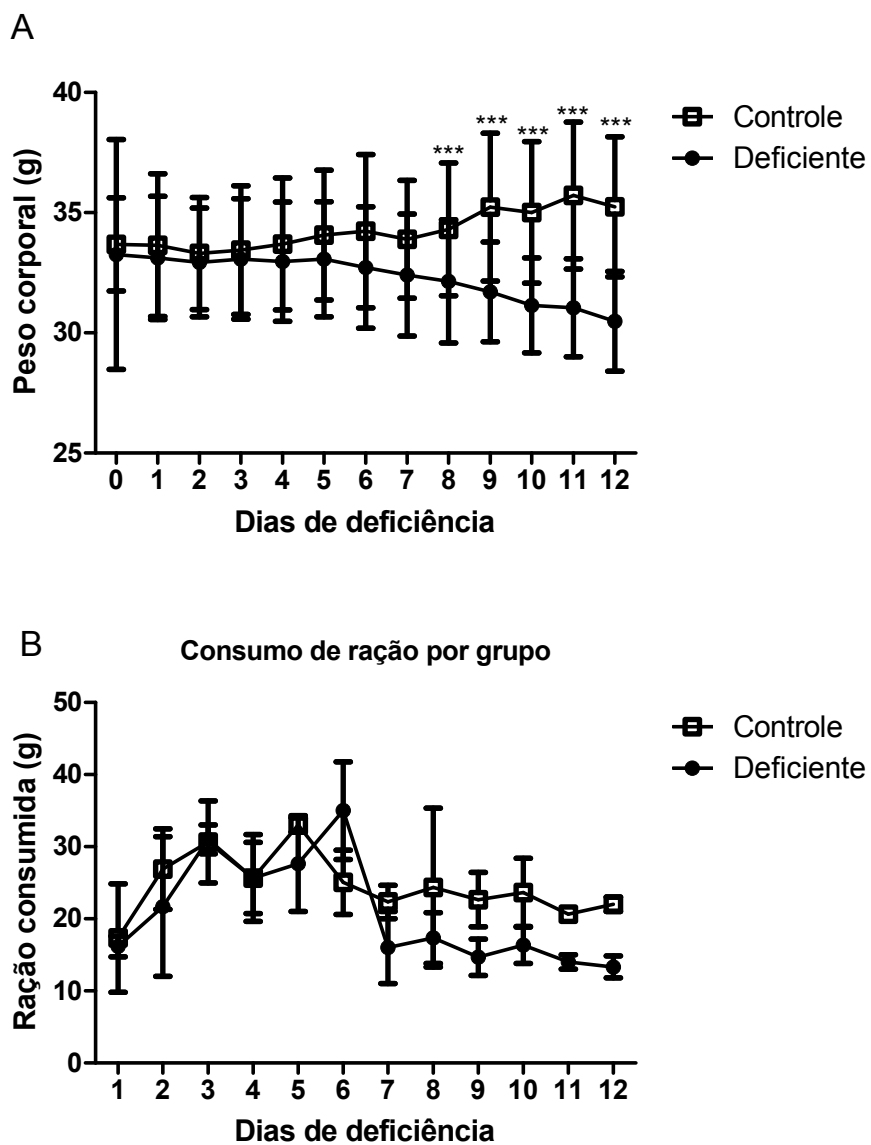


Figura 7: Variação do Peso Corporal (Painel A) e Consumo de Ração (Painel B), dos camundongos dos grupos Controle (n=56) e Deficiente (n=56), durante os doze dias referentes ao episódio de DT. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão do respectivo grupo em cada dia. \*\*\* indica diferenças significativas,  $p < 0,001$ , entre os grupos, obtidas com o pós-teste de Bonferroni. Foi realizado ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

## 5.2 Efeito da DT sobre o aprendizado

**Desempenho expresso em latência (s):** Analisamos os dados de desempenho utilizando apenas os 10 animais que passaram por todas as sessões. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou (**Figura 8A**) que houve interação ( $F_{(6,108)}=3,54$ ;  $p=0,003$ ), efeito da DT ( $F_{(1,108)}=119,49$ ;  $p<0,0001$ ) e efeito do AP ( $F_{(6,108)}=36,68$ ;  $p<0,0001$ ). Comparando os dois grupos, o pós-teste de Bonferroni mostrou que houve diferença significativa nas sessões três ( $p<0,001$ )<sup>\*\*\*</sup>, quatro ( $p<0,001$ )<sup>\*\*\*</sup>, cinco ( $p<0,001$ )<sup>\*\*\*</sup> e seis ( $p<0,01$ )<sup>\*\*</sup> mostrando que o desempenho dos camundongos do grupo DAP, mesmo usando somente 10 animais na análise, através de um modelo estatístico mais rigoroso, quando comparado aos animais do grupo CAP foi significativamente pior nas mesmas sessões detectadas anteriormente. Ambas as curvas de aprendizado dos animais deficientes, elaborada com dados de todos os animais ou com 10 animais, apresentaram um perfil semelhante. Os dados do desempenho médio, expressos em latências (s), dos animais em cada tentativa, ao longo das sete sessões, estão apresentados na **figura 8B**.

**Desempenho expresso por número de erros cometidos:** Avaliamos também o desempenho expresso pelo número de erros utilizando somente os 10 animais (**Figura 8C**) que passaram por todas as sessões de treino. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou que há efeito da DT ( $F_{(1,108)}=35,82$ ;  $p<0,0001$ ) e efeito do AP ( $F_{(6,108)}=14,69$ ;  $p<0,0001$ ). Não há efeito da interação ( $F_{(6,108)}=1,53$ ;  $p=0,17$ ) entre DT e AP sobre o desempenho. O pós-teste Bonferroni mostrou que houve diferença significativa entre as sessões dois ( $p<0,0001$ )<sup>\*\*\*\*</sup>, três

( $p < 0,0001$ )\*\*\*\*, quatro ( $p < 0,0001$ )\*\*\*\*, cinco ( $p < 0,0001$ )\*\*\*\* e seis ( $p < 0,0001$ )\*\*\*\* quando comparado os dois grupos, mostrando que o desempenho dos camundongos do grupo DAP, quando comparados ao desempenho do grupo CAP, foi significativamente pior nessas sessões.

Em relação ao grupo CAP ao longo das sessões de treinamento no LTR, a análise de variância de uma via mostrou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) e o pós-teste de Bonferroni indicou que há diferença entre todas as sessões (segunda sessão ( $p < 0,05$ ) e demais ( $p < 0,001$ )) quando comparadas à primeira sessão. Também mostrou que há diferença entre as sessões quatro ( $p < 0,001$ ), cinco ( $p < 0,001$ ), seis ( $p < 0,001$ ) e sete ( $p < 0,001$ ), quando comparadas a segunda sessão. Mostrou ainda diferença entre a quarta ( $p < 0,01$ ), quinta ( $p < 0,001$ ), sexta ( $p < 0,05$ ) e sétima ( $p < 0,01$ ) sessão quando comparadas a terceira.

Avaliando os dados referentes ao desempenho dos camundongos do grupo DAP, ao longo das sessões do treino, a análise de variância de uma via mostrou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) e o pós-teste de *Bonferroni* indicou que houve diferença entre as sessões três ( $p < 0,05$ ), quatro ( $p < 0,001$ ), cinco ( $p < 0,001$ ), seis ( $p < 0,001$ ) e sete ( $p < 0,001$ ), quando comparadas a primeira sessão e diferença entre as sessões cinco ( $p < 0,001$ ), seis ( $p < 0,001$ ) e sete ( $p < 0,001$ ), quando comparadas a segunda sessão. Mostrou ainda diferença entre as sessões cinco ( $p < 0,01$ ), seis ( $p < 0,001$ ) e sete ( $p < 0,001$ ), quando comparadas a terceira sessão e entre as sessões cinco ( $p < 0,001$ ) e seis ( $p < 0,01$ ), quando comparadas a sétima sessão. Confirmando os dados obtidos quando se expressa o desempenho em Latência (s), os camundongos do grupo DAP foram mais lentos para aprender as regras do teste, mas a repetição

da tarefa permitiu que o número médio de erros cometidos pelos animais do grupo deficiente fosse diminuindo ao longo do processo e os animais deficientes atingisse valor similar ao número de erros cometidos pelos animais do grupo controle (CAP). Ou seja, conforme mencionado acima, o desempenho foi alterado DT, mas a capacidade de aprendizado permaneceu inalterada, sendo resgatada com a repetição da tarefa. Os dados do desempenho médio dos animais, expressos em números de erros, em cada tentativa, ao longo das sete sessões estão apresentados na **figura 8D**.

A ausência de dados comportamentais, referentes aos animais dos grupos CAT e DAT, se justifica pelo fato de que os animais desses dois grupos não foram submetidos à tarefa cognitiva.

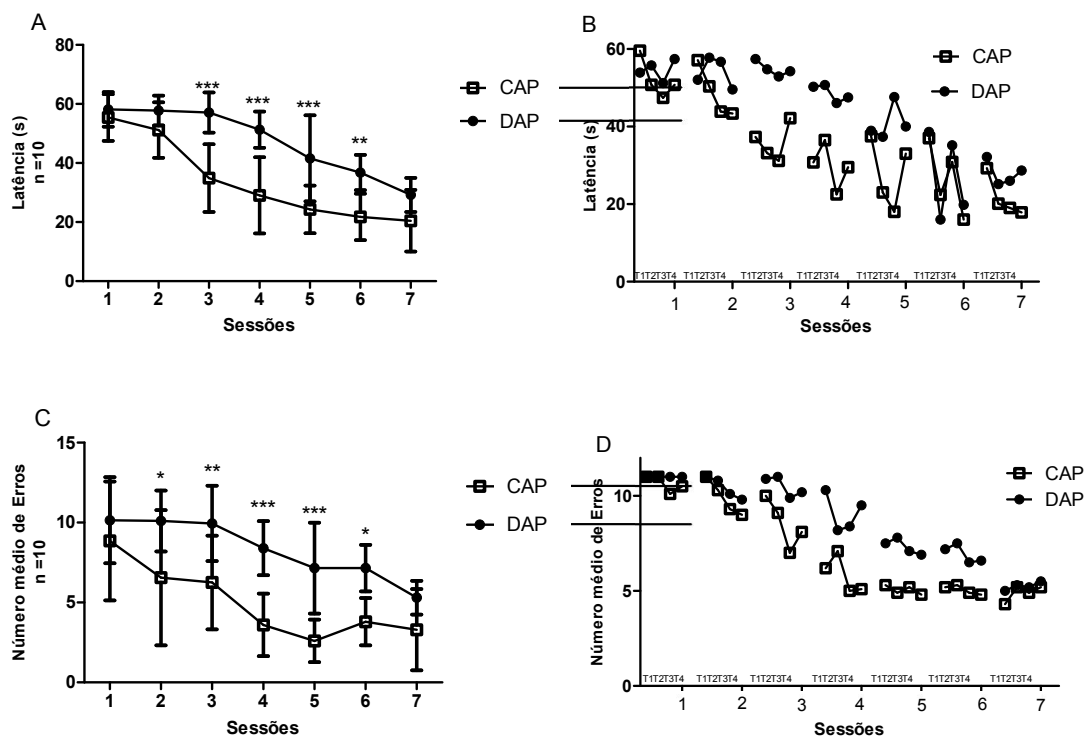


Figura 8: Curvas de aprendizado da tarefa espacial no LTR, mostrando o desempenho médio dos camundongos dos dois grupos (CAP= Controle Aprendizado e DAP= Deficiente Aprendizado) ao longo das sete sessões. Painel A: desempenho dos animais expresso em latência (s). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão das medianas das quatro tentativas em cada uma das sessões. Painel B: desempenho dos animais expresso em latência (s). Cada ponto representa a média dos animais em cada uma das quatro tentativas ao longo das sete sessões. Painel C: Número médio de Erros. (n=10 em cada sessão). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão das medianas das quatro tentativas em cada uma das sessões. Painel D: Número médio de Erros. (n=10 em cada sessão) Cada ponto representa a média dos animais em cada uma das quatro tentativas ao longo das sete sessões. Detalhes no texto. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os dois grupos, obtidas no pós teste de Bonferroni; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Foi realizado o teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

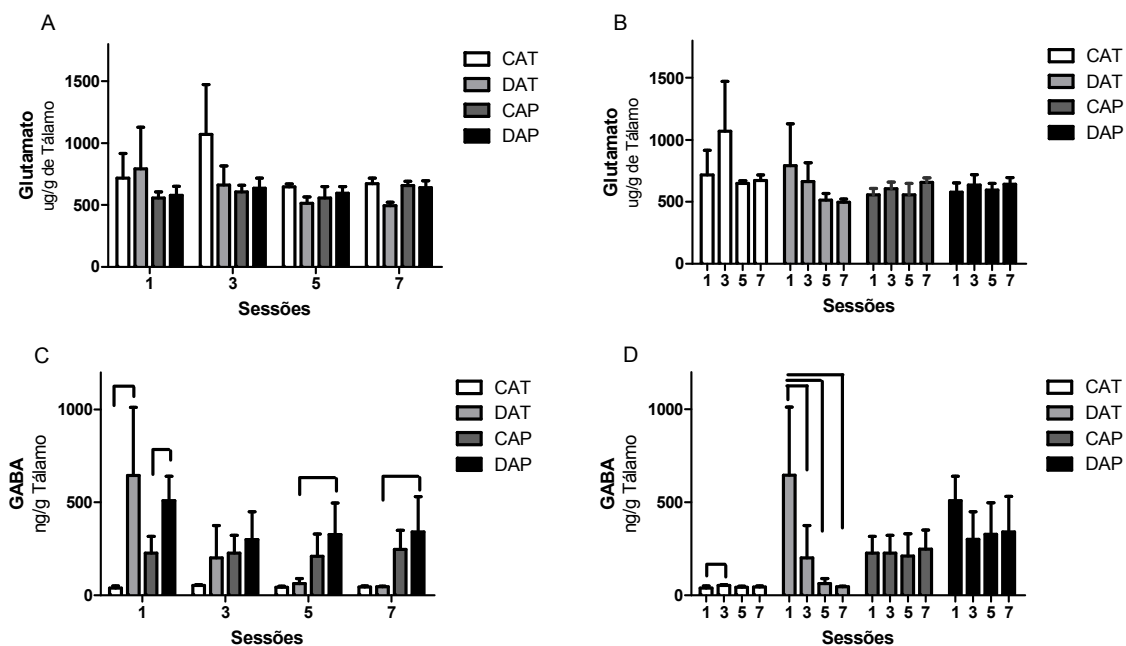
## 5.3 Efeitos da DT e AP sobre os níveis de Glutamato e GABA

### 5.3.1 Tálamo

A ANOVA não mostrou interação ( $F_{(9,80)}=0,59$ ,  $p=0,80$ ), nem efeito do treino ( $F_{(3,80)}=0,85$ ,  $p=0,47$ ) e nem do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=1,23$ ,  $p=0,30$ ) sobre a concentração de glutamato no tálamo (**Figura 9A e 9B**). Entretanto, para o GABA, ANOVA mostrou que houve efeito significativo do treino ( $F_{(9,80)}=10,18$ ,  $p<0,0001$ ), do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=21,92$ ,  $p<0,0001$ ) e interação ( $F_{(9,80)}=5,57$ ,  $p<0,0001$ ) entre esses dois fatores (**Figura 9C**). O pós-teste de *Bonferroni* mostrou que há diferença significativa ( $p<0,0001$ ) entre os grupos CAT e DAT e entre CAP e DAP na sessão 1. Há também diferença entre os grupos DAT e DAP nas sessões 5 ( $p<0,0001$ ) e 7 ( $p<0,0001$ ).

A análise dos dados dentro de cada grupo ao longo das sessões, usando a análise de variância de uma via, mostrou que houve diferença significativa ( $p=0,01$ ) nas concentrações de GABA entre as sessões, para o grupo CAT (**Figura 9D**). O pós-teste de *Bonferroni* mostrou que essa diferença está entre as sessões 1 e 3. O mesmo teste mostrou que houve também diferença entre as sessões do DAT ( $p=0,0001$ ) e que a diferença ocorreu entre as sessões 1 e 3 ( $p<0,01$ ), 1 e 5 ( $p<0,001$ ) e 1 e 7 ( $p<0,001$ ). Os outros grupos, CAP ( $p=0,88$ ) e DAP ( $p=0,069$ ) não apresentaram diferença ao longo das sessões. A DT induz um aumento na concentração de GABA nos animais deficientes (Grupo DAP, sessão 1). Ao longo do treino esse aumento vai progressivamente se revertendo (efeito do treino), retornando aos níveis do controle (CAP, sessão 1).

## Tálamo



**Figura 9: Concentrações de glutamato (Painéis A e B) e GABA (Painéis C e D) no tálamo de camundongos *Swiss* nos grupos Controle Atividade (CAT, n=6 em cada sessão), Deficiente Atividade (DAT, n=6 em cada sessão, Controle Aprendizado (CAP, n=6 em cada sessão) e Deficiente Aprendizado, n=6 em cada sessão). As amostras biológicas obtidas de cada camundongo foram analisadas em triplicada e a média utilizada para calcular a média do grupo (média  $\pm$  desvio padrão), para as concentrações de glutamato, ( $\mu\text{g/g}$ ) e GABA, ( $\text{ng/g}$ ). As linhas horizontais, acima das barras, indicam diferenças significativas,  $p < 0,05$ , entre dois grupos ou duas sessões, detectadas pelo pós-teste de Bonferroni. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias.**

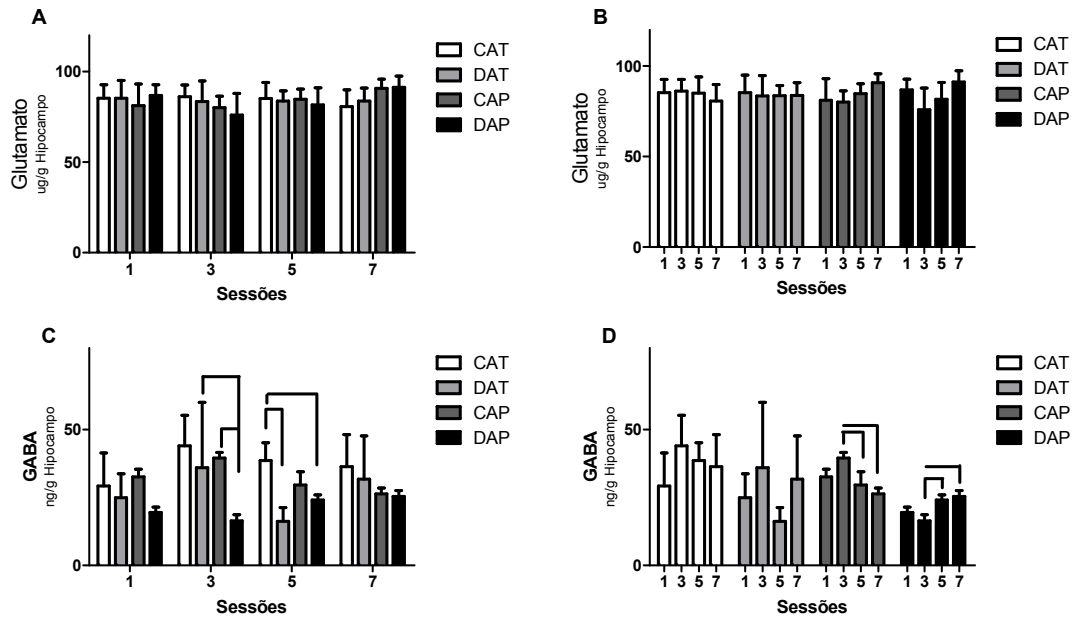


### 5.3.2 Hipocampo

A análise de variância não mostrou interação ( $F_{(9,80)}=1,60$ ,  $p=0,13$ ), efeito do treino ( $F_{(3,80)}=1,61$ ,  $p=0,19$ ), nem efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=0,01$ ,  $p=0,99$ ) sobre os níveis de glutamato no hipocampo (**Figura 10A e 10B**). Por outro lado, para o GABA, a ANOVA mostrou que houve interação ( $F_{(9,80)}=2,53$ ,  $p<0,01$ ), efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=11,96$ ,  $p<0,001$ ) e efeito do treino ( $F_{(3,80)}=3,07$ ,  $p=0,03$ ) sobre as concentrações deste neurotransmissor (**Figura 10C**). O pós-teste de Bonferroni mostrou que houve diferenças entre os grupos CAT e DAT na sessão 5 ( $p<0,0001$ ), entre os grupos DAT e DAP na sessão 3 ( $p<0,001$ ) e entre os grupos CAP e DAP na sessão 3 ( $p<0,0001$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos CAT e CAP ( $p>0,05$ ).

A análise de variância de uma via indicou efeito do treino nas concentrações de GABA, entre as sessões do grupo CAP ( $F_{(3,23)}=18,80$ ;  $p<0,0001$ ). Esse efeito se encontra em diferenças entre as sessões 3 e 5 ( $p<0,05$ ) e 3 e 7 ( $p<0,0001$ ). Há efeito do treino também entre as sessões do grupo DAP ( $F_{(3,23)}=24,08$ ,  $p=0,0005$ ), com diferenças também entre as sessões 3 e 5 ( $p<0,001$ ) e 3 e 7 ( $p<0,001$ ) (**Figura 10D**).

## Hipocampo

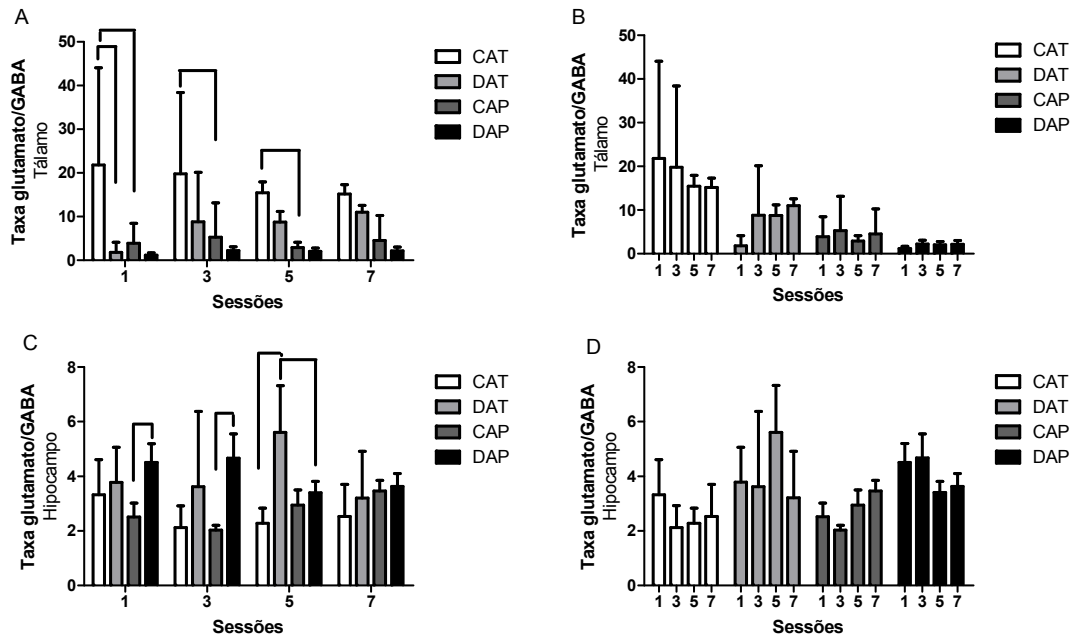


**Figura 10: Concentrações de glutamato (Painéis A e B) e GABA (Painéis C e D) no hipocampo de camundongos *Swiss* nos grupos Controle Atividade (CAT, n=6 em cada sessão), Deficiente Atividade (DAT, n=6 em cada sessão, Controle Aprendizado (CAP, n=6 em cada sessão) e Deficiente Aprendizado (DAP, n=6 em cada sessão). As amostras biológicas obtidas de cada camundongo foram analisadas em triplicada e a média utilizada para calcular a média  $\pm$  desvio padrão do grupo, para as concentrações de glutamato e GABA. As linhas horizontais acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre dois grupos, detectadas pelo pós-teste de Bonferroni. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias.**

### 5.3.3 Taxa [glutamato]/[GABA]

Utilizamos as concentrações de glutamato e GABA para calcular uma taxa entre os dois parâmetros uma vez que o balanço entre esses dois sistemas tem um papel na homeostase. A ANOVA de duas vias mostrou que houve efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=17,63$ ,  $p<0,0001$ ), porém não houve efeito das sessões/treino ( $F_{(3,80)}=0,26$ ,  $p=0,85$ ) e, nem interação ( $F_{(9,80)}=0,72$ ,  $p=0,68$ ) entre os fatores sobre a taxa glutamato/GABA no tálamo (**Figura 11A e 11B**). O pós-teste de Bonferroni não identificou entre quais grupos ocorreu a diferença. Não houve diferença dentro dos grupos.

Para as taxas de glutamato/GABA no hipocampo (**Figura 11C e 11D**), a ANOVA mostrou que não houve efeito das sessões ( $F_{(3,80)}=0,92$ ,  $p=0,43$ ). No entanto, houve efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=11,89$ ,  $p<0,0001$ ) e interação ( $F_{(9,80)}=2,96$ ,  $p=0,004$ ) entre os fatores. O pós-teste de Bonferroni indicou diferença significativa entre os grupos CAT e DAT na sessão 5 ( $p<0,001$ ), DAT e DAP na sessão 5 ( $p<0,01$ ) e entre CAP e DAP nas sessões 1 ( $p<0,05$ ) e 3 ( $p<0,001$ ). A ANOVA de uma via indicou diferença significativa entre as sessões 3 e 5 ( $p<0,01$ ) do grupo DAP.



**Figura 11:** Taxa entre as concentrações de glutamato e GABA no tálamo (Painéis A e B) e hipocampo (Painéis C e D) de camundongos *Swiss* nos grupos Controle Atividade (CAT, n=6 em cada sessão), Deficiente Atividade (DAT, n=6 em cada sessão, Controle Aprendizado (CAP, n=6 em cada sessão) e Deficiente Aprendizado (DAP, n=6 em cada sessão). As amostras biológicas obtidas de cada camundongo foram analisadas em triplicada e a média utilizada para calcular a média  $\pm$  desvio padrão do grupo, para as concentrações de glutamato e GABA. As linhas horizontais acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre dois grupos, detectadas pelo pós-teste de Bonferroni. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias.

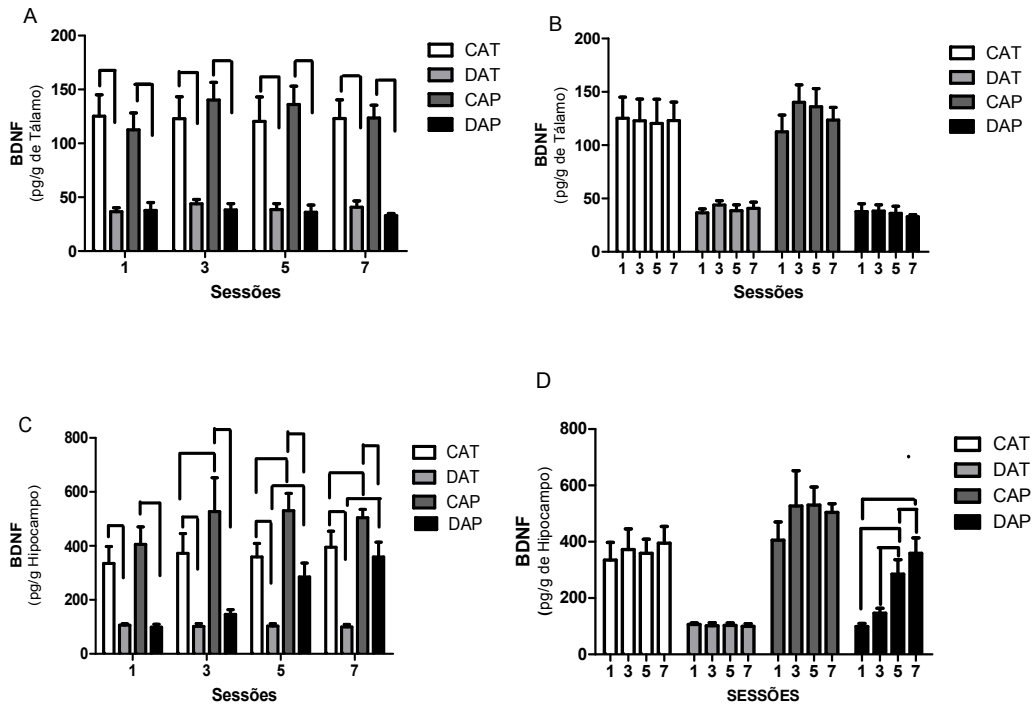
## 5.4 Efeitos da DT e AP sobre os níveis de BDNF e RNAm Bdnf

### 5.4.1 Níveis de BDNF no Tálamo e no Hipocampo

**Tálamo:** A análise de variância de duas vias mostrou que não houve interação ( $F_{(9,80)}=1,44$ ,  $p=0,18$ ), nem efeito das sessões ( $F_{(3,80)}=1,77$ ,  $p=0,15$ ), porém foi verificado efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=350,71$ ,  $P<0,0001$ ) sobre a concentração de BDNF no tálamo dos camundongos (**Figura 12A**). O pós-teste mostrou que há uma diminuição significativa ( $p<0,0001$ ) na concentração de BDNF no tálamo, tanto entre os grupos CAT e DAT quanto entre CAP e DAP em todas as sessões. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CAT e CAP e nem entre DAT e DAP em nenhuma das sessões. A ANOVA de uma via não indicou diferenças significativas dentro dos grupos (**Figura 12B**).

**Hipocampo:** As análises estatísticas mostraram que houve interação ( $F_{(9,80)}=7,21$ ,  $p<0,0001$ ), efeito das sessões/treino ( $F_{(3,80)}=16,67$ ,  $p<0,0001$ ) e efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=236,24$ ,  $P<0,0001$ ) sobre a concentração de BDNF no hipocampo dos camundongos (**Figura 12C**). O pós-teste mostrou que houve diminuição significativa ( $p<0,0001$ ) na concentração de BDNF no hipocampo, entre os grupos CAT e DAT em todas as sessões. Foram observadas ainda diferença entre os grupos CAT e CAP nas sessões 3 ( $p<0,0001$ ), 5 ( $p<0,0001$ ) e 7 ( $p<0,01$ ), entre os grupos DAT e DAP nas sessões 5 ( $p<0,0001$ ) e 7 ( $p<0,0001$ ) e entre os grupos CAP e DAP em todas as sessões ( $p<0,0001$ ). A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa ( $p<0,0001$ ) entre as sessões do grupo DAP (**Figura 12D**). O pós-teste de Bonferroni indicou que essa diferença se encontra entre as sessões 1 e

5 ( $p < 0,001$ ); 1 e 7 ( $p < 0,001$ ); 3 e 5 ( $p < 0,001$ ); 3 e 7 ( $p < 0,001$ ) e 5 e 7 ( $p < 0,5$ ). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre as sessões.



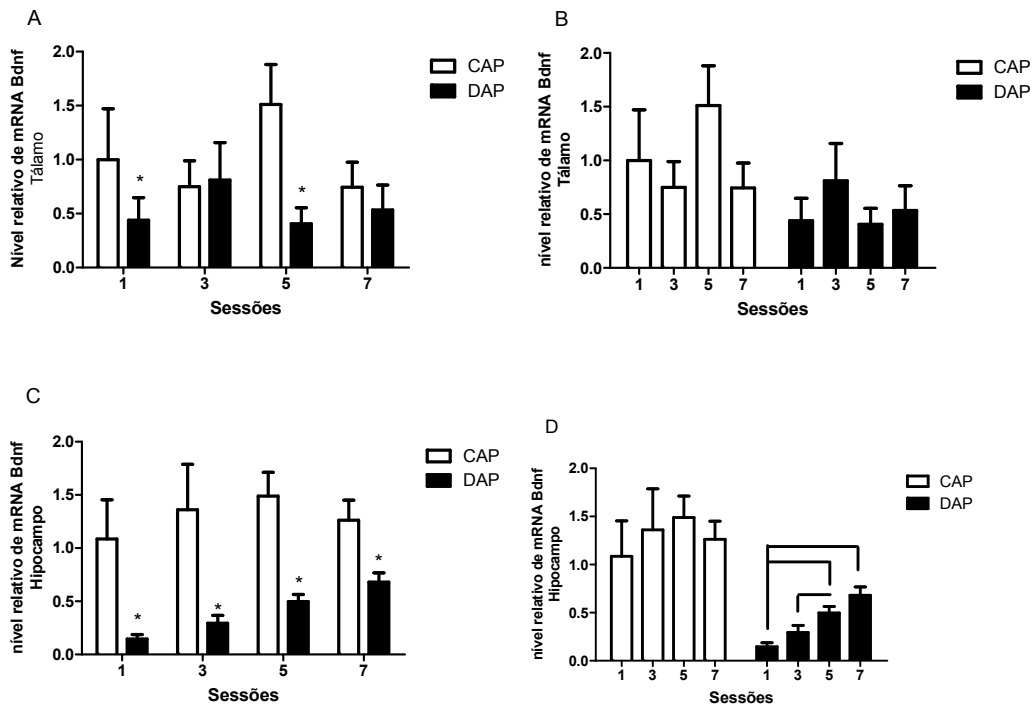
**Figura 12: Concentrações (pg/g) de BDNF no tálamo (Painéis A e B) e no hipocampo (Painéis C e D) de camundongos Swiss nas etapas 1, 3, 5 e 7 do processo de aprendizagem. Grupos: Controle Atividade (CAT, n=6 em cada sessão), Deficiente Atividade (DAT, n=6 em cada sessão) Controle Aprendizado (CAP, n=6 em cada sessão) e Deficiente Aprendizado, (n=6 em cada sessão). As amostras biológicas obtidas de cada camundongo foram analisadas em triplicada e a média das triplicadas usadas para calcular a média do grupo. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias.**

#### 5.4.2 Níveis relativos de RNAm do gene Bdnf no Tálamo e no Hipocampo

**Tálamo:** as análises de variância mostraram que houve interação ( $F_{(3,40)}=8,61$ ,  $p=0,0002$ ) e efeito do tratamento/DT ( $F_{(1,40)}=27,91$   $p<0,0001$ ), porém não houve efeito das sessões/treino ( $F_{(3,40)}=2,50$ ,  $p=0,07$ ) sobre o nível relativo de transcritos do gene Bdnf no tálamo dos camundongos (**Figura 13A**). O pós-teste mostrou que houve uma diminuição significativa ( $p<0,05$ ) da concentração do nível relativo de transcritos do gene Bdnf no tálamo na sessão 1 ( $p<0,01$ ) e na sessão 5 ( $p<0,001$ ) do grupo DAP quando comparado ao grupo CAP nas mesmas sessões. A análise de variância de uma via mostrou que não houve diferença significativa (**Figura 13B**) entre as sessões do grupo CAP ( $p=0,23$ ) nem do grupo DAP ( $p=0,46$ ), no tálamo.

**Hipocampo:** as análises estatísticas mostraram que não houve interação ( $F_{(3,40)}=2,64$ ,  $p=0,06$ ), porém houve efeito do tratamento/DT ( $F_{(1,40)}=182,28$ ,  $p<0,0001$ ), e efeito das sessões/treino ( $F_{(3,40)}=6,89$ ,  $p=0,0008$ ) sobre o nível relativo de transcritos do gene Bdnf (**Figura 13C**). O pós-teste mostrou que houve uma diminuição significativa ( $p=0,001$ ) dos níveis desse transcrito no hipocampo nas sessões 1 ( $p<0,001$ ), 3 ( $p<0,001$ ), 5 ( $p<0,001$ ) e 7 ( $p<0,001$ ) do grupo DAP, quando comparado ao grupo CAP. A análise de variância de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre as sessões do grupo CAP ( $p=0,08$ ). Já no grupo DAP (**Figura 13D**), o teste mostrou que houve diferença significativa ( $p=0,0001$ ) entre as sessões/treino. O pós-teste de Bonferroni indicou que essa diferença está entre todas as sessões ( $p<0,001$ ), quando comparadas a primeira sessão. Existe diferença também entre as sessões cinco ( $p<0,001$ ) e sete ( $p<0,001$ ) quando comparadas a terceira; e entre as sessões cinco e sete ( $p<0,001$ ).





**Figura 13:** Quantidade relativa de RNAm do gene *Bdnf* no tálamo (Painéis A e B) e no hipocampo (Painéis C e D) de camundongos *Swiss* nas sessões 1, 3, 5 e 7 do processo de aprendizado. Grupos: Controle Aprendizado (CAP, n=6 em cada sessão) e Deficiente Aprendizado, (DAP, n=6 em cada sessão). As amostras biológicas obtidas de cada camundongo foram analisadas em triplicada. Os dados são apresentados pela média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo. Os asteriscos se referem à diferenças significativas, detectas com o pós-teste. (\*)  $p < 0,05$ . A quantidade de mRNA (eixo das ordenadas) é expressa em unidade arbitrária (Detalhes em Métodos). Foi realizado o teste ANOVA de duas vias.

## 5.5 Efeitos da DT e AP sobre os níveis de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$

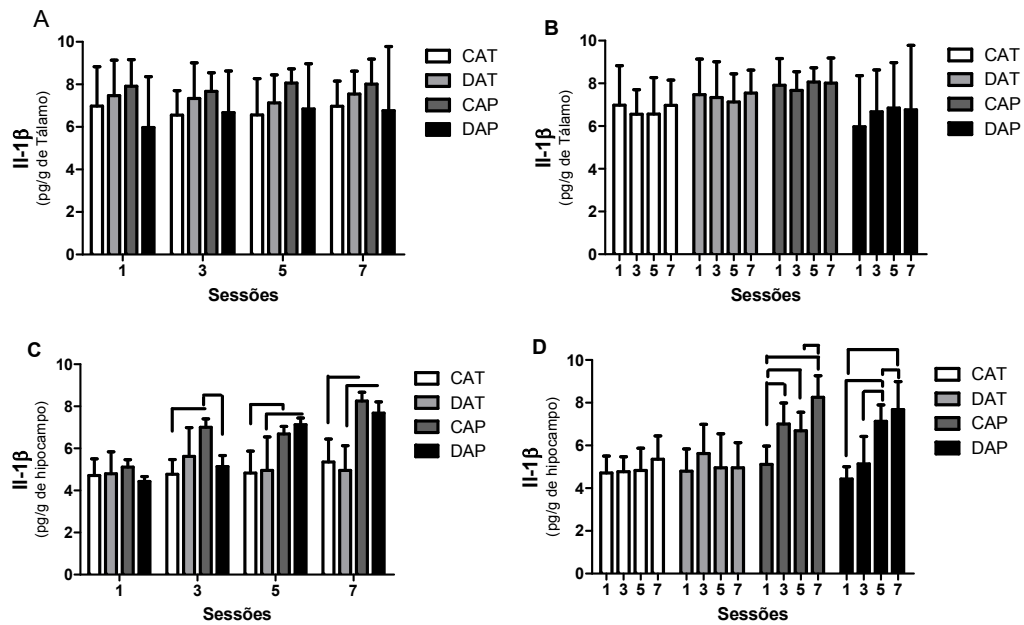
### 5.5.1 Níveis de IL-1 $\beta$ no Tálamo e no Hipocampo

**Tálamo:** A análise de variância de duas vias mostrou que não houve interação ( $F_{(9,80)}=0,16$ ,  $p=0,99$ ) e nem efeito das sessões/treino ( $F_{(3,80)}=0,12$ ,  $p=0,94$ ), porém houve efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=3,21$ ,  $p=0,02$ ) sobre a concentração de IL-1 $\beta$  no tálamo dos camundongos (**Figura 14A**). O pós-teste de Bonferroni não mostrou diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos. A análise dos dados dentro de cada grupo ao longo das sessões não apresentou diferença significativa (**Figura 14B**).

**Hipocampo:** A análise dos níveis de IL-1 $\beta$  mostrou que houve interação ( $F_{(9,80)}=3,73$ ;  $p=0,0006$ ), efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=16,26$ ;  $p=0,0001$ ) e das sessões/treino ( $F_{(3,80)}=11,84$ ;  $P<0,0001$ ) sobre os níveis desta citocina no hipocampo dos camundongos (**Figura 14C**). O pós-teste mostrou que não houve diferença entre os grupos CAT e DAT ( $p>0,05$ ) em nenhuma sessão. Porém, houve diferença entre os grupos CAT e CAP nas sessões 3 ( $p<0,01$ ), 5 ( $p<0,05$ ) e 7 ( $p<0,001$ ); entre os grupos DAT e DAP nas sessões 5 ( $p<0,01$ ) e 7 ( $p<0,001$ ); e entre os grupos CAP e DAP na sessão 3 ( $p<0,05$ ).

A análise dos dados dos grupos CAT e DAT ao longo das sessões não apresentou diferença significativa. Já para o grupo CAP, a análise de variância de uma via mostrou que há efeito significativo do treino ( $p<0,0001$ ) e o pós-teste de Bonferroni mostrou diferenças ocorreram entre todas as sessões quando comparadas a primeira sessão (um e três ( $p<0,05$ ); um e cinco ( $p<0,05$ ) e um e sete ( $p<0,001$ );

mostrou ainda diferença entre as sessões cinco e sete ( $p < 0,5$ ). No grupo DAP, a análise de variância de uma via mostrou que há efeito do treino ( $p < 0,0001$ ) ao longo das sessões. O pós-teste de Bonferroni indicou que há diferença (aumento induzido pelo treino) entre as sessões cinco ( $p < 0,01$ ) e sete ( $p < 0,001$ ), quando comparadas a primeira sessão; indicou ainda diferença entre as sessões três e cinco ( $p < 0,05$ ) e entre as sessões três e sete ( $p < 0,01$ ) (**Figura 14D**).

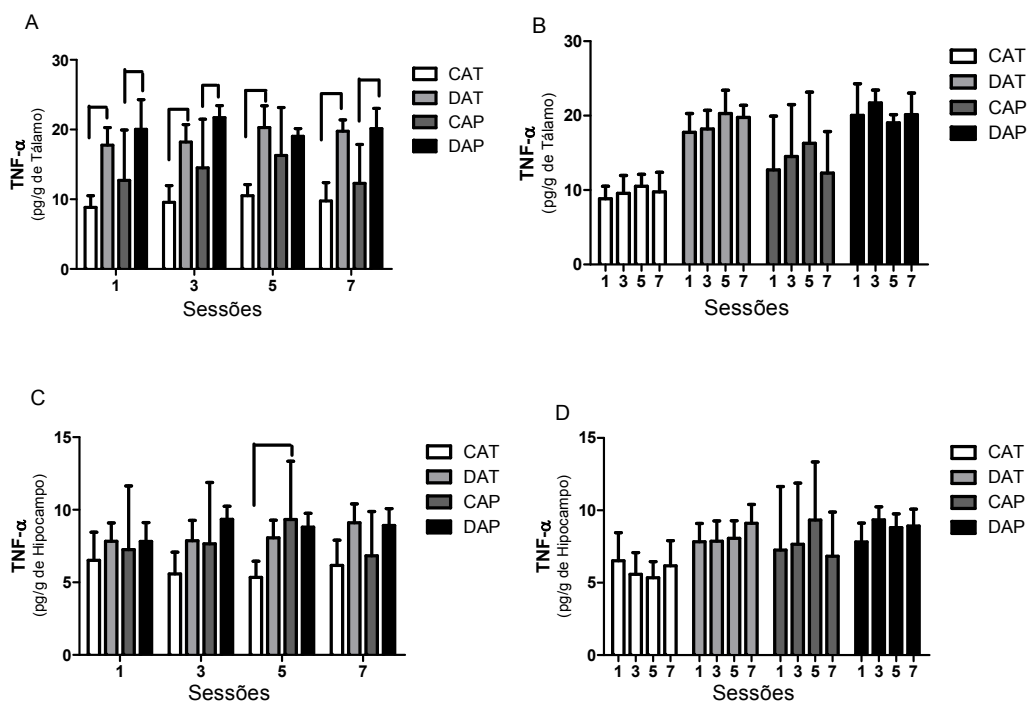


**Figura 14: Concentrações (pg/g) de IL-1 $\beta$  no tálamo (Painéis A e B) e no hipocampo (Painéis C e D) de camundongos *Swiss*, nas sessões 1, 3, 5 e 7 do processo de aprendizado. Grupos: Controle Atividade (CAT, n=6 em cada sessão), Deficiente Atividade (DAT, n=6 em cada sessão), Controle Aprendizado (CAP, n=6 em cada sessão) e Deficiente Aprendizado, (DAP, n=6 em cada sessão). As amostras biológicas obtidas de cada camundongo foram analisadas em triplicada e a média utilizada para calcular a média do grupo. Os dados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni.**

### 5.5.2 Níveis de TNF- $\alpha$ no Tálamo e no Hipocampo

**Tálamo:** A análise de variância mostrou que não houve interação ( $F_{(9,80)}=0,56$ ,  $p=0,82$ ) e nem efeito das sessões/treino ( $F_{(3,80)}=0,80$ ,  $p=0,49$ ), porém houve efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=35,91$ ,  $p<0,0001$ ) sobre a concentração de TNF- $\alpha$  no tálamo dos camundongos (**Figura 15A**). O pós-teste de Bonferroni mostrou que houve aumento significativo ( $p>0,0001$ ) no grupo DAT, quando comparado com o grupo CAT em todas as sessões. Houve também aumento significativo no grupo DAP, quando comparado com o grupo CAP nas sessões 1 ( $p<0,01$ ), 3 ( $p<0,01$ ) e 7 ( $p<0,01$ ). No entanto, não houve diferença entre os grupos CAT e CAP ( $p>0,05$ ) e entre DAT e DAP ( $p>0,05$ ) em nenhuma das sessões. Não há diferença significativa dentro dos grupos ao longo das sessões (**Figura 15B**).

**Hipocampo:** A análise dos níveis de TNF- $\alpha$  (**Figura 15C**) mostrou que não houve interação ( $F_{(9,80)}=0,78$ ;  $p=0,63$ ) e nem efeito das sessões/treino ( $F_{(3,80)}=0,24$ ,  $p=0,87$ ), porém houve efeito do tratamento/DT ( $F_{(3,80)}=6,93$ ;  $p=0,0003$ ) sobre os níveis dessa citocina no hipocampo dos camundongos. O pós-teste indicou que não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos CAT e DAT; DAT e DAP e CAP e DAP ao longo das sessões. Porém entre os grupos CAT e CAP houve diferença na sessão 5 ( $p<0,05$ ). Não há diferença significativa dentro dos grupos ao longo das sessões (**Figura 15D**).



**Figura 15: Concentrações (pg/g) de TNF- $\alpha$  no tálamo (Painéis A e B) e no hipocampo (Painéis C e D) de camundongos Swiss, nas sessões 1, 3, 5 e 7 do processo de aprendizado. Grupos: Controle Atividade (CAT, n=6 em cada sessão), Deficiente Atividade (DAT, n=6 em cada sessão), Controle Aprendizado (CAP, n=6 em cada sessão) e Deficiente Aprendizado, (DAP, n=6 em cada sessão). As amostras biológicas obtidas de cada camundongo foram analisadas em triplicada e a média utilizada para calcular a média do grupo. Os dados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo. Foi realizado o ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.**

## 5.6 Principais efeitos da DT e do AP sobre parâmetros biológicos

**TABELA 5: RESUMOS DOS EFEITOS (*main effects*)**

Valores de **F** e **p** são apresentados apenas para os efeitos significativos

Variáveis Independentes / Variáveis dependentes	Tratamento (TD)	Treino/sessões (AP)	Interação	Tratamento (TD)	Treino/sessões (AP)	Interação
	Tálamo			Hipocampo		
<b>Glutamato (Glu)</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>GABA</b>	( $F_{(3,80)}=21,92$ , $p<0,0001$ )	( $F_{(9,80)}=10,18$ , $p<0,0001$ )	( $F_{(9,80)}=5,57$ , $p<0,0001$ )	( $F_{(3,80)}=11,96$ , $p<0,001$ )	( $F_{(9,80)}=3,07$ , $p<0,03$ )	( $F_{(9,80)}=2,53$ , $p<0,001$ )
<b>Taxa= Glu/GABA</b>	( $F_{(3,80)}=17,63$ , $p<0,0001$ )	ns	ns	( $F_{(3,80)}=11,89$ , $p<0,0001$ )	ns	( $F_{(9,80)}=2,96$ , $p=0,004$ )
<b>BDNF</b>	( $F_{(3,80)}=350,7$ , $P<0,0001$ )	ns	ns	( $F_{(3,80)}=236,2$ , $P<0,0001$ )	( $F_{(3,80)}=16,67$ , $p<0,0001$ )	( $F_{(9,80)}=7,21$ , $p<0,0001$ )
<b>RNA<sub>m</sub> do gene Bdnf</b>	( $F_{(1,40)}=27,91$ , $p<0,0001$ )	ns	( $F_{(3,40)}=8,61$ , $p=0,0002$ )	( $F_{(1,40)}=182,2$ , $p<0,0001$ )	( $F_{(3,40)}=6,89$ , $p=0,0008$ )	ns
<b>IL-1B</b>	( $F_{(3,80)}=3,21$ , $p=0,02$ )	ns	ns	( $F_{(3,80)}=16,26$ ; $p=0,0001$ )	( $F_{(3,80)}=11,84$ ; $P<0,0001$ )	( $F_{(9,80)}=3,7$ ; $p=0,0006$ )
<b>TNF-a</b>	( $F_{(3,80)}=35,91$ , $p<0,0001$ )	ns	ns	( $F_{(3,80)}=6,93$ ; $p=0,0003$ )	ns	ns

## **5.7 Verificação da existência de correlação entre os dados comportamentais, imunológicos e neuroquímicos**

A verificação da existência de relação significativa entre as variáveis analisadas no presente estudo foi realizada pelo teste de correlação de Pearson, uma vez que os dados apresentaram distribuição normal. Para determinar se o modelo era útil para explicar os dados nós adotamos o coeficiente de determinação. Assim, para aceitar a ocorrência de correlação significativa entre os parâmetros avaliados, utilizamos como valores de corte  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,25$  para um  $n = 24$  e  $r^2 > 0,19$  para  $n = 48$ . Algumas das correlações encontradas estão apresentadas em uma organização de acordo com as variáveis analisadas e grupos experimentais. Além de verificar a existência ou não de correlação significativa, utilizando os dados de duas variáveis medidas nos animais de um mesmo grupo (grupos separados), algumas análises foram realizadas utilizando dados dos animais de mais de um grupo, que foram reunidos com a finalidade de se obter mais informações sobre os efeitos nas relações entre as duas variáveis em questão. Não foram verificadas correlações significativas entre os dados obtidos dos grupos CAT e DAT separadamente, nem no tálamo e nem no hipocampo.



## 5.7.1 Desempenho (número de erros) versus Parâmetros biológicos

### 5.7.1.1 Desempenho versus Glutamato, GABA ou Taxa [glutamato]/GABA (CAP+DAP; CAP; DAP)

O teste de correlação de Pearson mostrou que não existem correlações significativas entre o desempenho dos animais no LTR e as concentrações de glutamato no tálamo dos animais dos grupos CAPDAP ( $r=-0,12$ ;  $p=0,38$ ;  $r^2=0,01$ ) (**Figura 16A**) ou, separadamente, dos grupos CAP ( $r=0,01$ ;  $p=0,93$ ;  $r^2=0,0003$ ) (**Figura 16B**), e DAP ( $r=-0,35$ ;  $p=0,08$ ;  $r^2=0,12$ ) (**Figura 16C**). O teste também mostrou que não há correlações significativas entre glutamato no hipocampo e desempenho dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,11$ ;  $p=0,43$ ;  $r^2=0,01$ ) (**Figura 16D**) ou, separadamente, dos grupos CAP ( $r=0,06$ ;  $p=0,75$ ;  $r^2=0,0004$ ) (**Figura 16E**) e DAP ( $r=-0,28$ ;  $p=0,17$ ;  $r^2=0,08$ ) (**Figura 16F**).

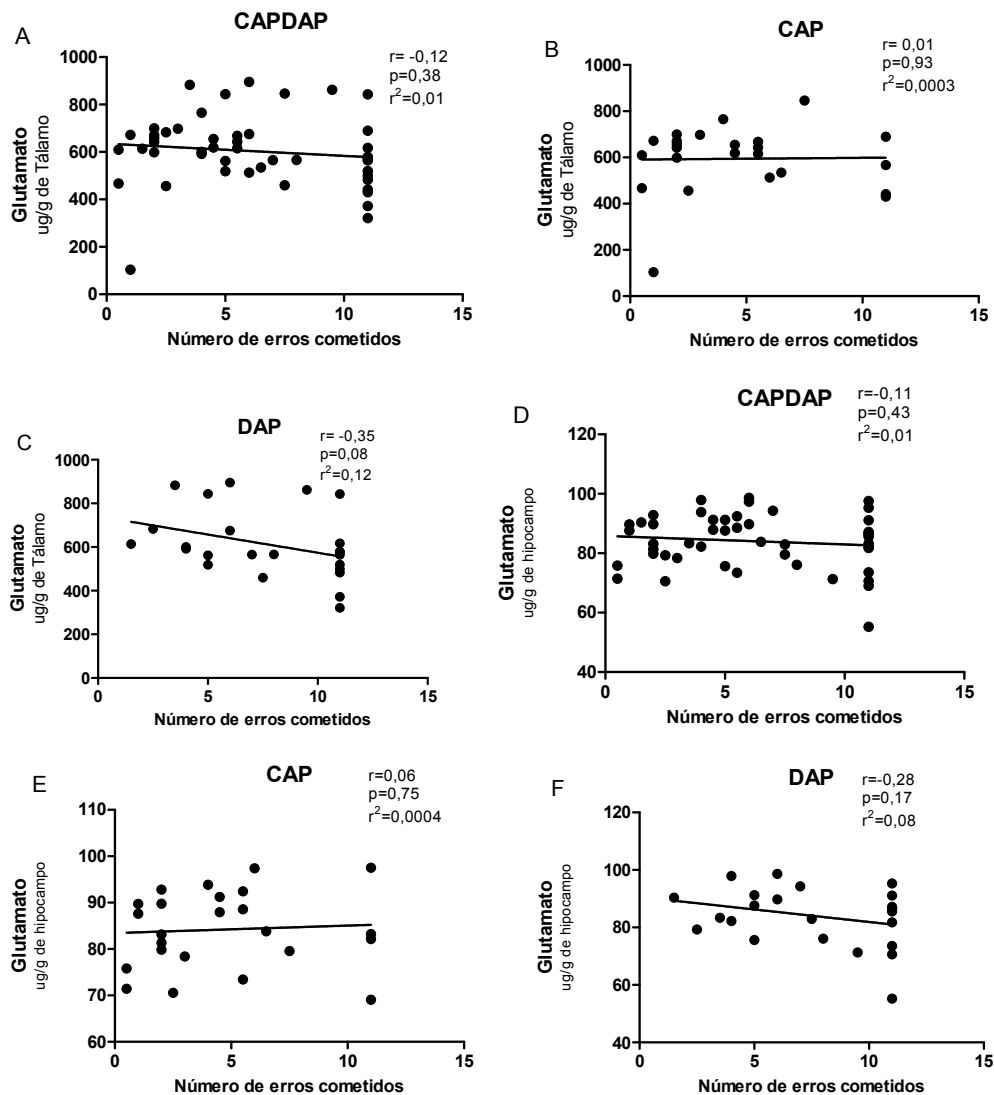


Figura 16: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e as concentrações de glutamato, no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Os critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24), não foram atendidos em nenhuma das condições.

O teste mostrou ainda que não existem correlações significativas entre o desempenho dos animais no LTR e as concentrações de GABA no tálamo dos animais do grupo CAPDAP ( $r=0,14$ ;  $p=0,31$ ;  $r^2=0,02$ ) (**Figura 17A**) ou, separadamente, dos grupos CAP ( $r=0,008$ ;  $p=0,96$ ;  $r^2=0,00007$ ) (**Figura 17B**) e DAP ( $r=-0,09$ ;  $p=0,65$ ;  $r^2=0,009$ ) (**Figura 17C**). O teste também mostrou que não há correlações significativas entre GABA no hipocampo e desempenho dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,27$ ;  $p=0,06$ ;  $r^2=0,07$ ) (**Figura 17D**). No entanto, as análises utilizando dados dos animais dos grupos CAP ( $r=0,43$ ;  $p=0,03$ ;  $r^2=0,18$ ) (**Figura 17E**) e DAP ( $r=-0,51$ ;  $p=0,009$ ;  $r^2=0,26$ ) (**Figura 17F**) indicaram correlações significativas entre esses parâmetros, principalmente, com os níveis de GABA do hipocampo dos animais deficientes, para os quais o modelo atende o critério de  $r^2>0,25$ .

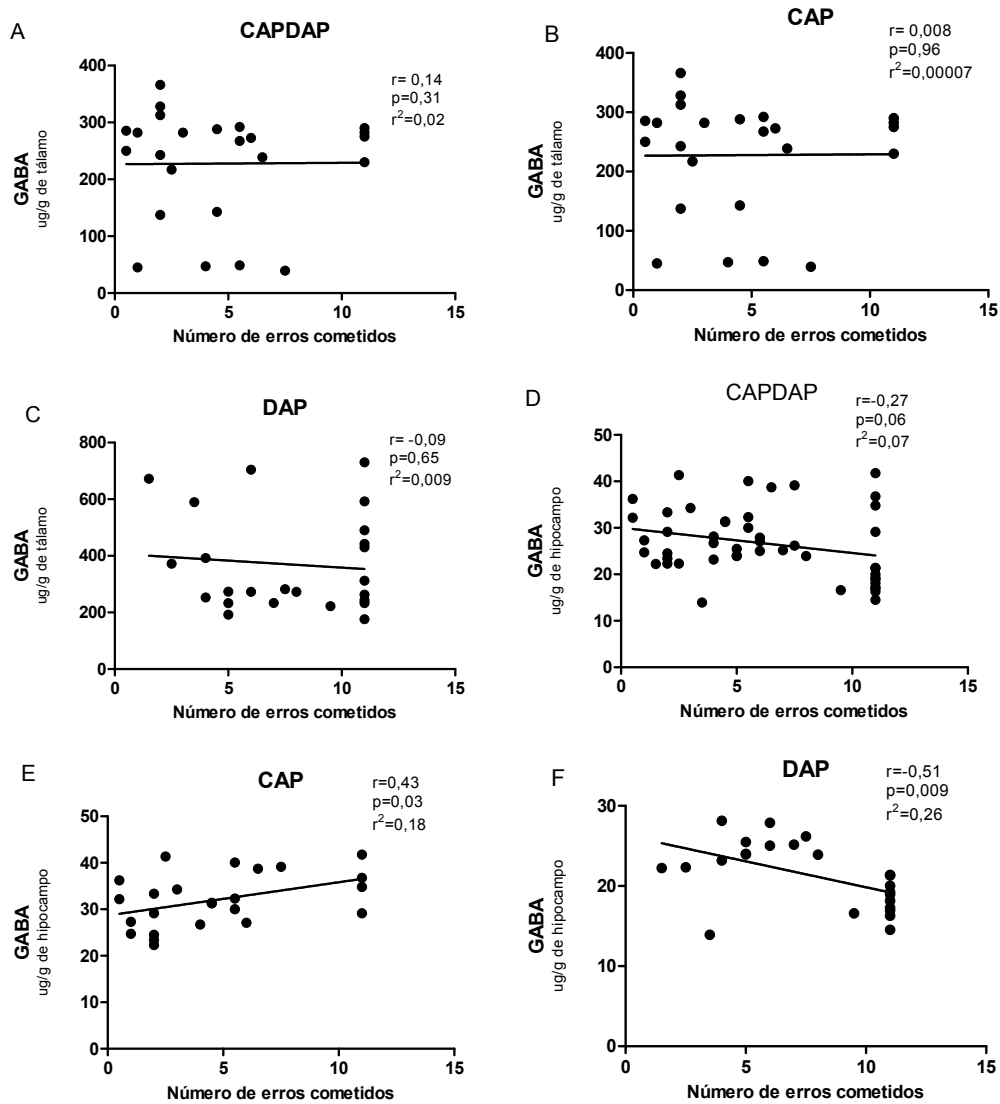


Figura 17: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e as concentrações de GABA, no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Os critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24) foram atendidos apenas para os animais deficientes do grupo DAP (painel F).

O teste mostrou também que não existem correlações entre o desempenho dos animais no LTR e a taxa [glutamato]/[GABA] no tálamo dos animais do grupo CAPDAP juntos ( $r=-0,06$ ;  $p=0,65$ ;  $r^2=0,0004$ ) (**Figura 18A**), ou separados, CAP ( $r=0,10$ ;  $p=0,61$ ;  $r^2=0,01$ ) (**Figura 18B**) e DAP ( $r=-0,09$ ;  $p=0,65$ ;  $r^2=0,009$ ) (**Figura 18C**). O teste também mostrou que não há correlações significativas entre GABA no hipocampo e desempenho dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,28$ ;  $p=0,04$ ;  $r^2=0,08$ ) (**Figura 18D**), CAP ( $r=-0,30$ ;  $p=0,14$ ;  $r^2=0,09$ ) (**Figura 18E**) e DAP ( $r=0,29$ ;  $p=0,16$ ;  $r^2=0,08$ ) (**Figura 18F**). Utilizando-se os dados de todos os animais dos grupos CAPDAP, o valor de  $p=0,04$ , sugerindo uma possível associação entre desempenho e o balanço entre os níveis de glutamato e GABA. No entanto, o valor de  $r^2$  não atende o critério para o modelo de análise estatística.

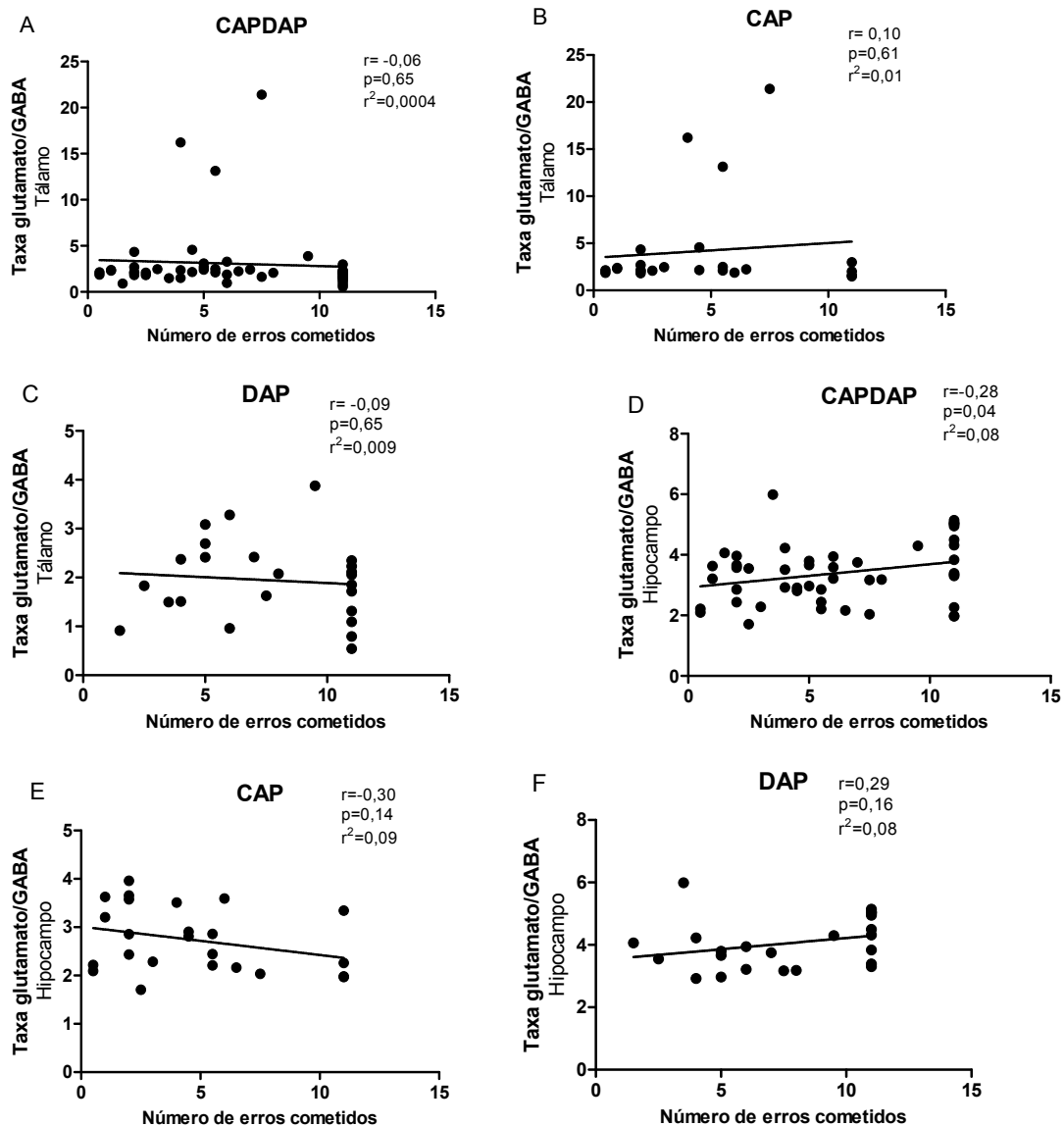
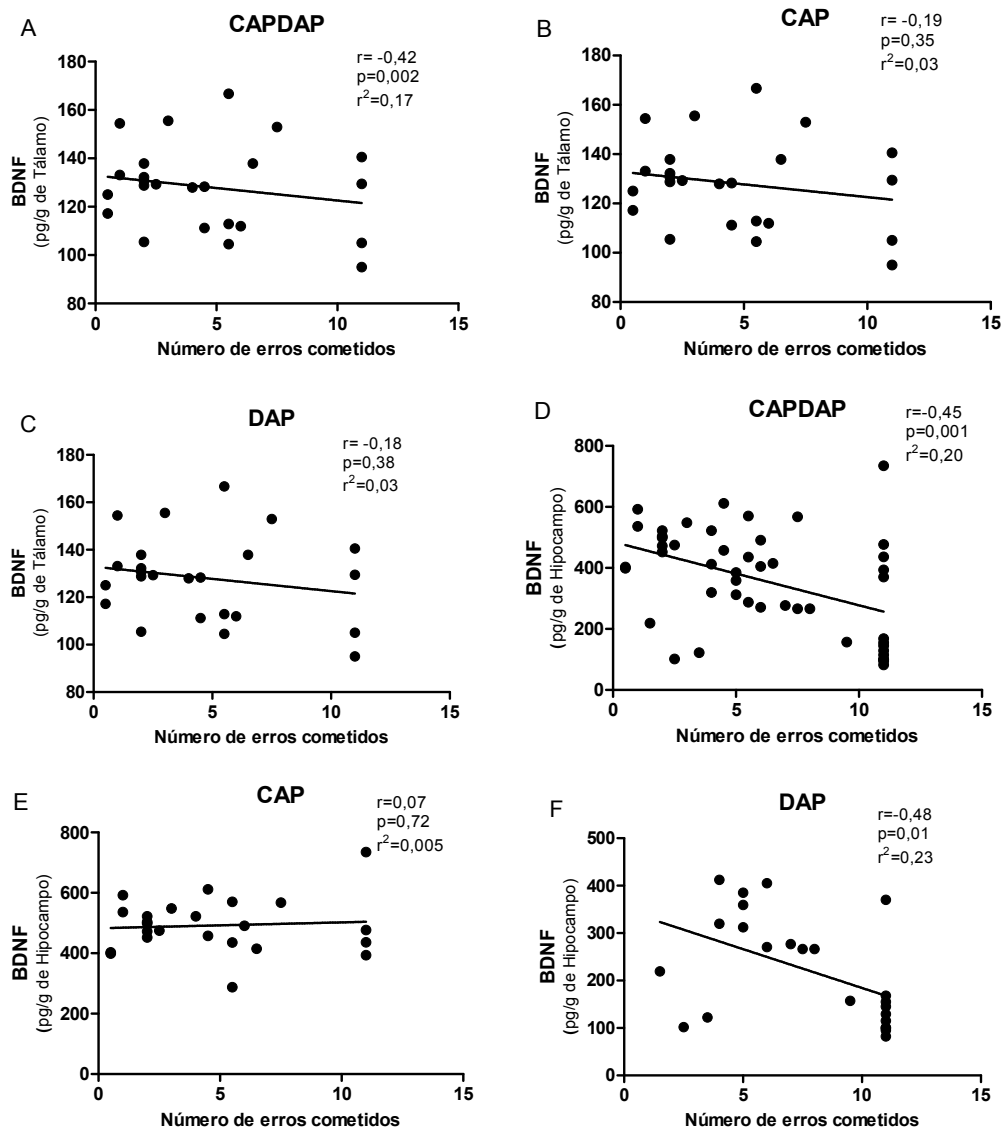


Figura 18: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e a taxa [glutamato]/[GABA], no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Os critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24), não foram atendidos em nenhuma das condições.

### 5.7.1.2 Desempenho versus BDNF ou RNAm Bdnf

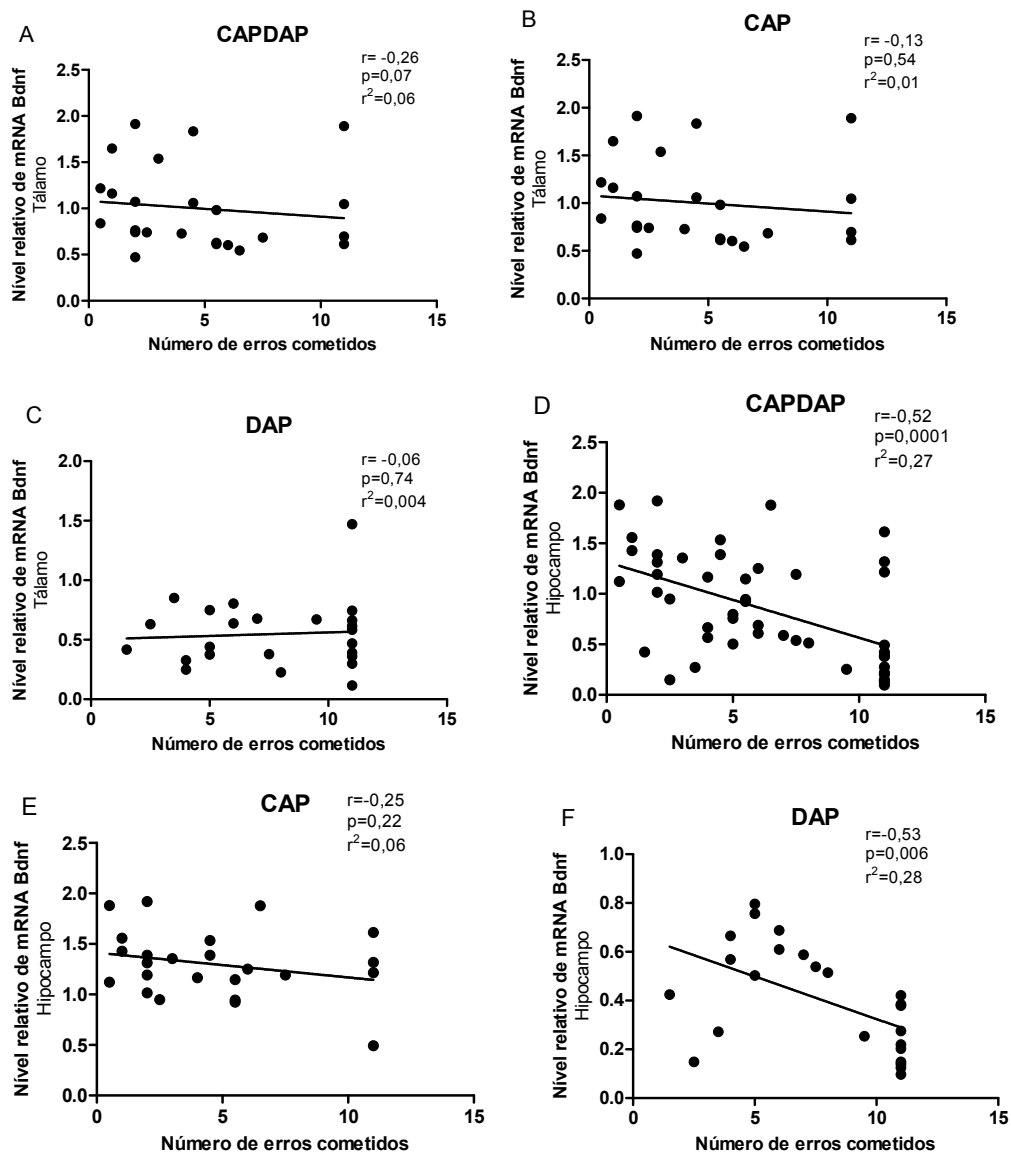
O teste de correlação de Pearson mostrou que não existem correlações significativas entre o desempenho dos animais no LTR e os níveis de BDNF no tálamo dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,42$ ;  $p=0,002$ ;  $r^2=0,17$ ) (**Figura 19A**), CAP ( $r=-0,19$ ;  $p=0,35$ ;  $r^2=0,03$ ) (**Figura 19B**), e DAP ( $r=-0,18$ ;  $p=0,38$ ;  $r^2=0,03$ ) (**Figura 19C**). O teste também mostrou que há correlação negativa significativa entre BDNF no hipocampo e desempenho dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,45$ ;  $p=0,001$ ;  $r^2=0,20$ ) (**Figura 19D**). Essa correlação significativa desaparece se utilizamos os dados apenas dos animais do grupo CAP ( $r=0,07$ ;  $p=0,72$ ;  $r^2=0,005$ ) (**Figura 19E**). Por outro lado, com os dados dos animais do grupo DAP ( $r=0,48$ ;  $p=0,01$ ;  $r^2=0,23$ ) detecta-se uma correlação que atende todos os critérios de significância (**Figura 19F**).



**Figura 19:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Os critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24), foram atendidos para a correlação entre os níveis de BDNF no hipocampo dos animais do grupo DAP e número de erros (Painel F). As demais condições não atenderam os critérios de significância.



De forma similar ao observado com o parâmetro BDNF, o teste de correlação de Pearson mostrou que não existem correlações significativas entre o desempenho dos animais no LTR e os níveis relativos de RNAm do gene Bdnf no tálamo dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,26$ ;  $p=0,07$ ;  $r^2=0,06$ ) (**Figura 20A**), CAP ( $r=-0,13$ ;  $p=0,54$ ;  $r^2=0,01$ ) (**Figura 20B**), e DAP ( $r=-0,06$ ;  $p=0,74$ ;  $r^2=0,004$ ) (**Figura 20C**). Por outro lado, o teste também mostrou que há correlação negativa significativa entre RNAm do gene Bdnf no hipocampo e o desempenho dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,52$ ;  $p=0,0001$ ;  $r^2=0,27$ ) (**Figura 20D**), e no grupo DAP ( $r=-0,53$ ;  $p=0,006$ ;  $r^2=0,28$ ) (**Figura 20F**). No entanto, com o perfil similar das correlações para o BDNF, no grupo CAP, não foi observado correlação significativa ( $r=-0,25$ ;  $p=0,22$ ;  $r^2=0,06$ ) (**Figura 20E**).



**Figura 20:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis relativos de RNAm do gene Bdnf no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Os critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24) foram atendidos para as correlações entre os níveis de RNAm Bdnf no hipocampo dos animais dos grupos CAPDAP (Painel D) e DAP (Painel F). As demais condições não atenderam os critérios de significância.

### 5.7.1.3 Desempenho versus IL-1 $\beta$ ou TNF- $\alpha$

O teste de correlação de Pearson mostrou que não existem correlações significativas entre o desempenho dos animais no LTR e os níveis de IL-1 $\beta$  no tálamo dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,09$ ;  $p=0,54$ ;  $r^2=0,008$ ) (**Figura 21A**), CAP ( $r=0,07$ ;  $p=0,71$ ;  $r^2=0,006$ ) (**Figura 21B**), e DAP ( $r=0,08$ ;  $p=0,70$ ;  $r^2=0,006$ ) (**Figura 21C**). Embora o valor de “p” seja 0,002, pelos critérios adotados para o modelo estatístico ( $r^2<0,19$ ), o teste indica que não há correlação aceitável entre os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo e o desempenho dos animais do grupo CAPDAP ( $r=0,43$ ;  $p=0,002$ ;  $r^2=0,18$ ) (**Figura 21D**). Não existe correlação significativa entre esses parâmetros para os animais do grupo CAP ( $r=0,21$ ;  $p=0,30$ ;  $r^2=0,04$ ) (**Figura 21E**). Por outro lado, existe uma correlação negativa significativa quando se usa os dados do grupo DAP ( $r= -0,53$ ;  $p=0,006$ ;  $r^2=0,28$ ) (**Figura 21E**).

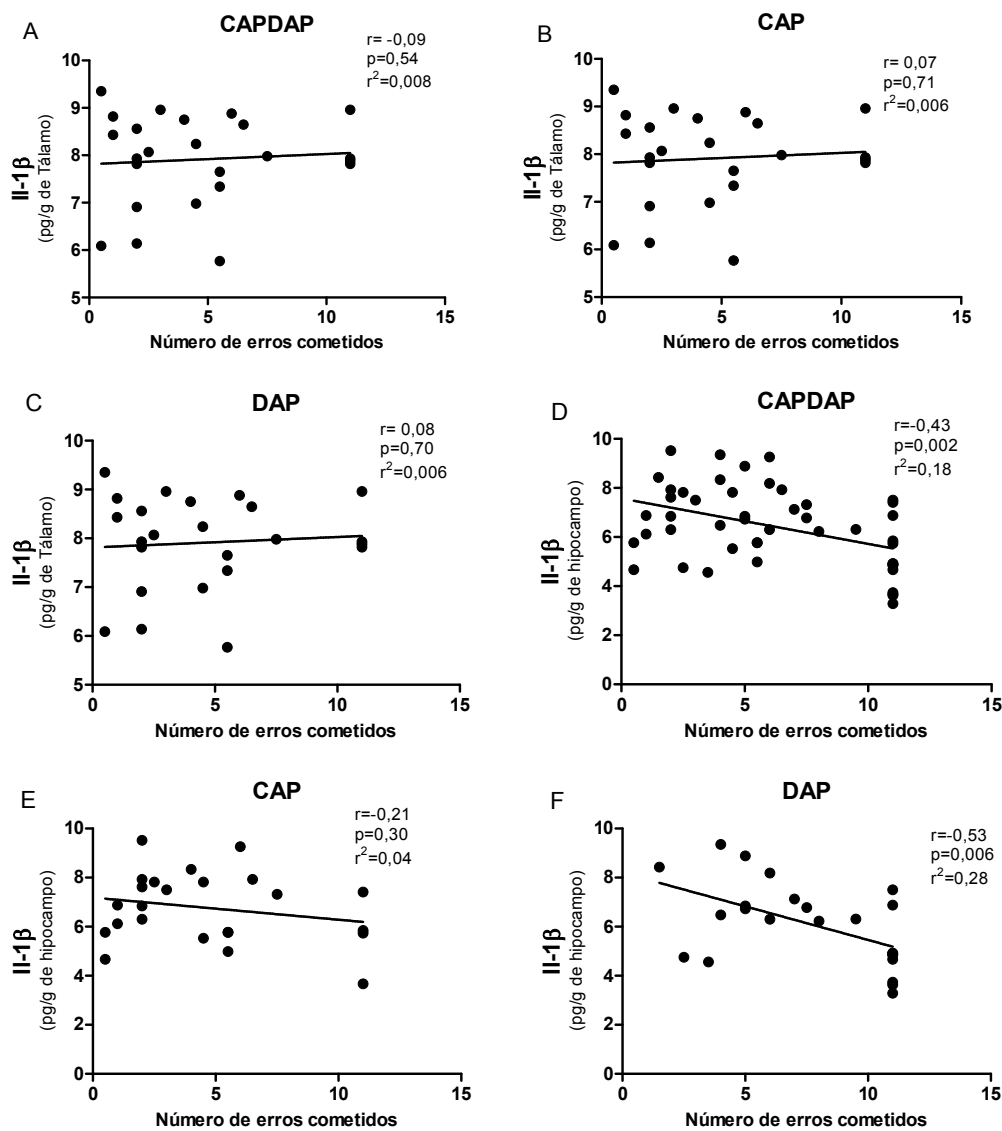


Figura 21: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de IL-1 $\beta$  no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Os critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24) foram atendidos para as correlações entre os níveis de IL-1B no hipocampo dos animais do grupo DAP (Painel F). As demais condições não atenderam os critérios de significância, embora os dados dos níveis de IL-1B no hipocampo dos animais CAPDAP (Painel D) indicam a possibilidade de uma relação ( $p = 0,002$ ), já que o valor de  $r^2$  se encontra muito próximo do critério.

O teste de correlação de Pearson mostrou que não existem correlações significativas entre o desempenho dos animais no LTR e os níveis de TNF- $\alpha$  no tálamo dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,28$ ;  $p=0,64$ ;  $r^2=0,08$ ) (**Figura 22A**), CAP ( $r=0,17$ ;  $p=0,41$ ;  $r^2=0,03$ ) (**Figura 22B**), e DAP ( $r=-0,12$ ;  $p=0,56$ ;  $r^2=0,01$ ) (**Figura 22C**). O teste mostrou ainda que não há correlações significativas entre os níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo e o desempenho dos animais do grupo CAPDAP ( $r=-0,13$ ;  $p=0,37$ ;  $r^2=0,01$ ) (**Figura 22D**), CAP ( $r=0,14$ ;  $p=0,48$ ;  $r^2=0,02$ ) (**Figura 22E**), e DAP ( $r=-0,17$ ;  $p=0,41$ ;  $r^2=0,02$ ) (**Figura 22E**).

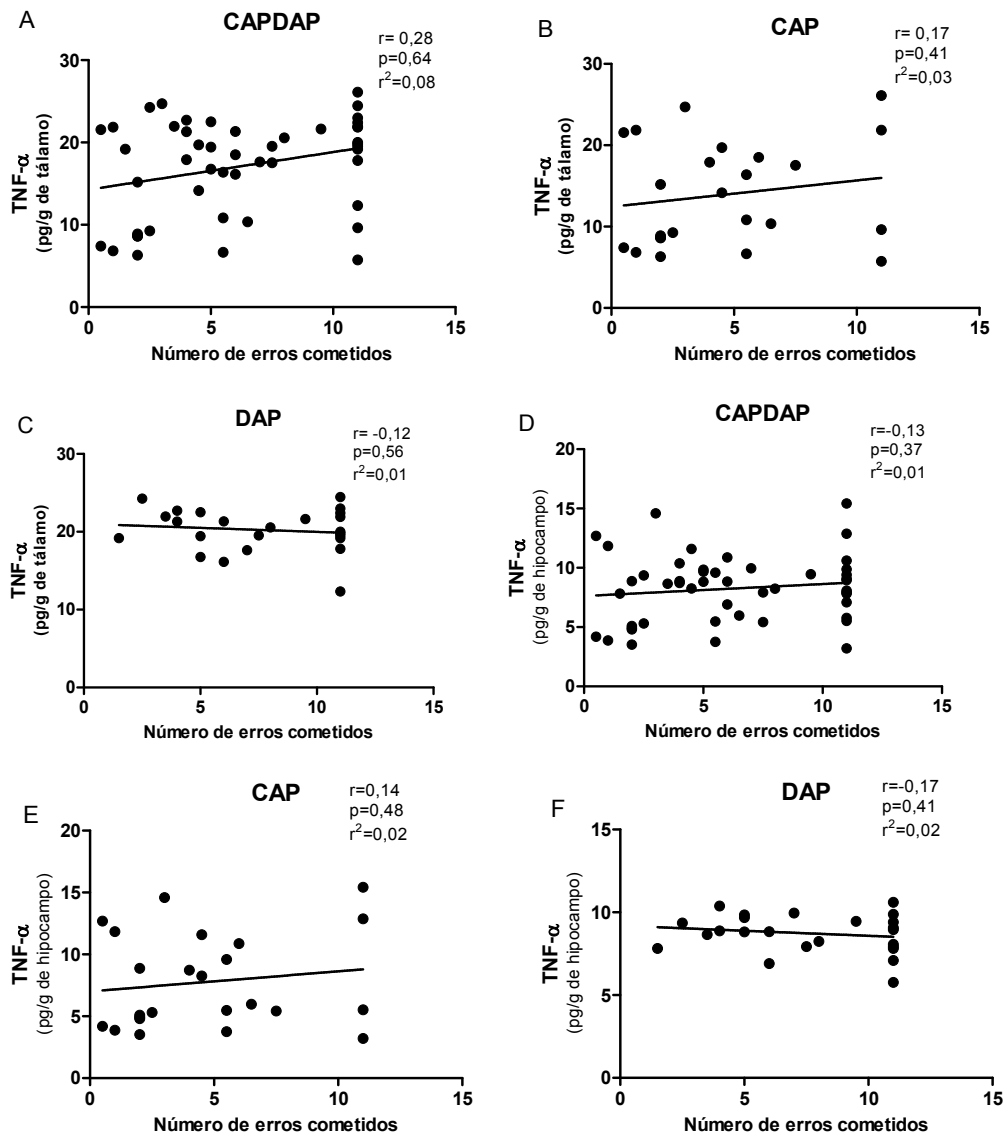


Figura 22: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de TNF- $\alpha$  no tálamo (painéis A, C e E à esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F à direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). A correlação foi considerada significativa quando  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24). Nenhuma das condições atende esses critérios.

## 5.7.2 Correlações entre as variáveis neuroquímicas e neuroimunológicas

### 5.7.2.1 CAPDAP

#### 5.7.2.1.1 GABA versus BDNF

O teste de correlação de Pearson mostrou que existe correlação negativa significativa entre as concentrações de GABA e os níveis de BDNF no tálamo ( $r=-0,46$ ;  $p=0,0009$ ;  $r^2=0,21$ ) (Figura 23A) e correlação positiva significativa no hipocampo ( $r=0,76$ ;  $p=0,0001$ ;  $r^2=0,58$ ) (Figura 23B) dos animais dos grupos CAPDAP.

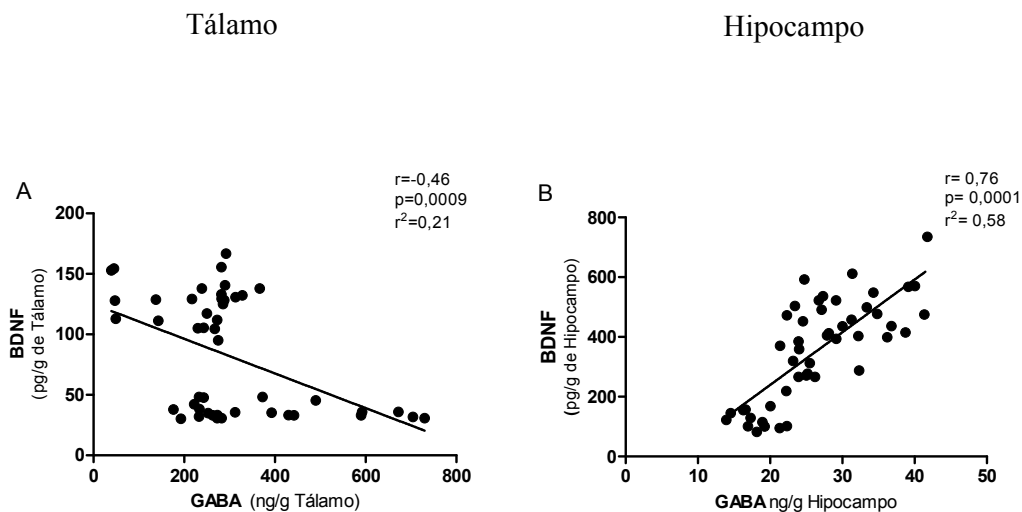
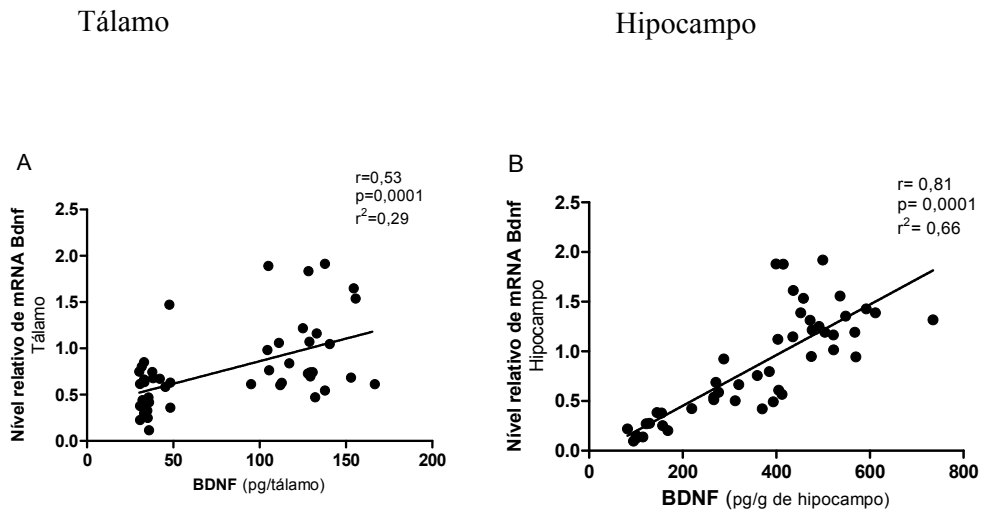


Figura 23: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre as concentrações de GABA e os níveis de BDNF no tálamo (painel A) e no hipocampo (painel B). A correlação foi considerada significativa quando  $p<0,05$  e  $r^2>0,25$  ( $n=24$ ) ou  $r^2>0,19$  ( $n=48$ ), conforme dados apresentados nos painéis A e B.

### 5.7.2.1.2 BDNF versus nível relativo de RNAm do gene Bdnf

O teste de correlação de Pearson mostrou que existem correlações positivas significativas entre os níveis relativos de RNAm do gene Bdnf e os níveis de BDNF no tálamo ( $r=0,53$ ;  $p=0,0019$ ;  $r^2=0,29$ ) (**Figura 24A**) e no hipocampo ( $r=0,81$ ;  $p=0,0001$ ;  $r^2=0,66$ ) (**Figura 24B**) dos animais do grupo CAPDAP.

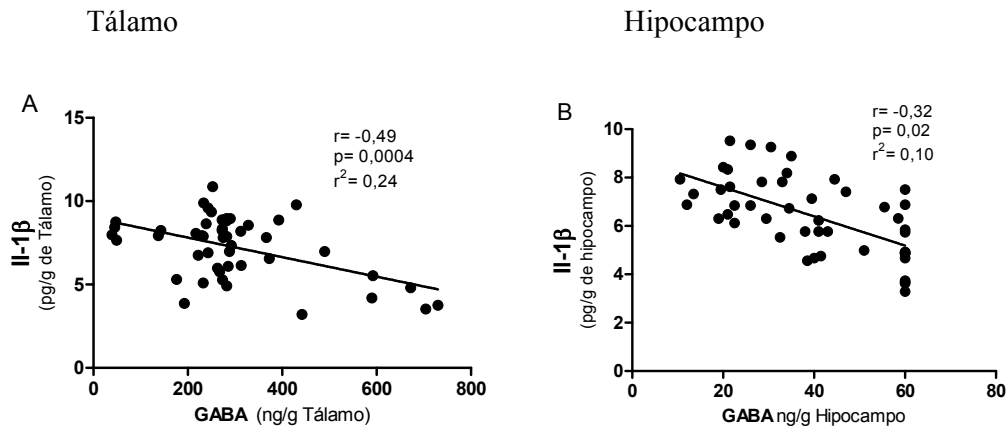


**Figura 24:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis relativos de RNAm do gene Bdnf e os níveis de BDNF no tálamo (painel A) e no hipocampo (Painéis B). A correlação foi considerada significativa quando  $p<0,05$  e o  $r^2>0,19$  ( $n=48$ ), conforme dados apresentados nos painéis A e B.



### 5.7.2.1.3 GABA versus Il-1 $\beta$

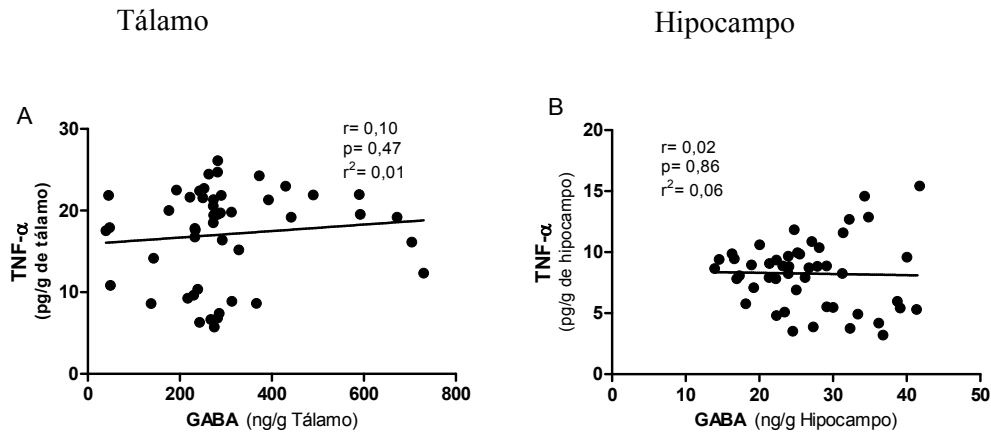
O teste de correlação de Pearson mostrou que existem correlações negativas significativas entre os níveis de GABA e Il-1 $\beta$  no tálamo ( $r=-0,49$ ;  $p=0,0004$ ;  $r^2=0,24$ ) (**Figura 25A**), mas não se observa correlação significativa hipocampo ( $r=-0,32$ ;  $p=0,02$ ;  $r^2=0,10$ ) (**Figura 25B**) dos animais do grupo CAPDAP.



**Figura 25:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de Il-1 $\beta$  e GABA no tálamo (painel A) e no hipocampo (Painéis B). A correlação significativa foi com os dados determinados no tálamo (Painel A), considerando  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  ( $n=48$ ).

### 5.7.2.1.3 GABA versus TNF- $\alpha$

O teste de correlação de Pearson mostrou que não existe correlação significativa entre os níveis de GABA e Il-1 $\beta$  no tálamo ( $r=-0,10$ ;  $p=0,47$ ;  $r^2=0,01$ ) (**Figura 26A**), nem no hipocampo ( $r=0,02$ ;  $p=0,86$ ;  $r^2=0,06$ ) (**Figura 26B**) dos animais do grupo CAPDAP.

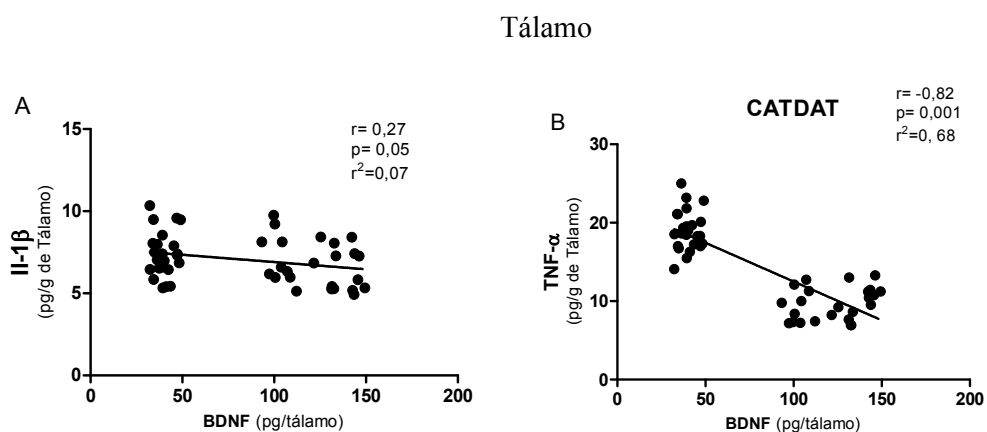


**Figura 26:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e GABA no tálamo (painel A) e no hipocampo (Painéis B). Nenhuma das correlações foi significativa, considerando os critérios  $p<0,05$  e o  $r^2>0,19$  ( $n=48$ ).

## 5.7.2.2 CATDAT

### 5.7.2.2.1 BDNF, Il- $\beta$ e TNF- $\alpha$

O teste de correlação de Pearson mostrou que não existe correlação significativa entre os níveis Il- $\beta$  e BDNF no tálamo ( $r=-0,27$ ;  $p=0,05$ ;  $r^2=0,07$ ) (**Figura 27A**). Por outro lado, o teste mostra que existe correlação negativa significativa entre os níveis de TNF- $\alpha$  e BDNF ( $r=-0,82$ ;  $p=0,001$ ;  $r^2=0,68$ ) (**Figura 27B**) no tálamo dos animais do grupo CATDAT. As representações gráficas desses dados evidenciam uma polarização entre os animais dos grupos controle e deficiente.



**Figura 27:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de Il-1 $\beta$  e os níveis de BDNF no tálamo (painel A) e entre os níveis de TNF- $\alpha$  e BDNF no tálamo (Painel B). A correlação foi considerada significativa quando  $p<0,05$  e o  $r^2>0,19$  ( $n=48$ ), conforme dados apresentados no painel B.

## 6 DISCUSSÃO

O desenho experimental do presente estudo permitiu a avaliação dos efeitos da deficiência de tiamina e do treino em uma tarefa de navegação espacial, sobre componentes moleculares, que são potenciais candidatos de exercerem papel importante no fenômeno da comunicação cruzada (*cross talking*) entre os SNC e SI.

Uma das hipóteses do presente estudo é que a demanda neurobiológica para execução de uma tarefa espacial, durante o processo do treino, depende da etapa deste processo. Mostramos que o esforço cognitivo em etapas iniciais e intermediárias do processo de aprendizagem está associado a alterações em componentes neuroimunológicos, que por sua vez relacionam-se entre si (p. ex., GABA e BDNF) e com o desempenho do indivíduo na aquisição da tarefa. Além disto, mostramos que esses fatores biológicos podem ser alterados por insultos, como a DT, e também podem ser modulados pela execução da tarefa cognitiva espacial afetada por esse insulto.

O modelo experimental utilizado, roedores deficientes em tiamina, está bem estabelecido na literatura, por outros autores (Langlais e cols., 1987; Gibbson e cols., 1999; Todd and Butterworth, 2001; Savage e cols., 2012; Vetreno e cols., 2012) e também pelo nosso grupo (Pires e cols., 2001; Carvalho e cols., 2006; Vigil e cols., 2010; Nunes e cols., 2018). A evolução dos sinais clínicos, nos camundongos deficientes, foi reproduzida de acordo com as descrições destes autores. Os dados comportamentais observados, utilizando um paradigma comportamental validado para camundongos (Deacon e Rawlins, 2000 ; Sankowski

e cols., 2019) mostram que os animais do grupo deficiente em tiamina tiveram um atraso no aprendizado no LTR, mas que após a repetição da tarefa, o desempenho desses animais atingiu um nível similar a dos animais do grupo controle. Este resultado indica que os camundongos não perderam a capacidade de aprender, mas que a eficiência na aquisição da tarefa foi prejudicada. A análise do desempenho, tanto utilizando latência quanto erros para expressar os dados, mostra que a DT afetou essa variável nas fases iniciais do processo de aprendizagem. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos prévios realizados pelo nosso grupo (Carvalho e cols., 2006; Vigil e cols., 2010; Nunes, 2016) e por outros autores (Langlais e cols., 1992; Savage e cols., 2012; Vetreno e cols., 2012).

Os resultados obtidos nas avaliações dos componentes neurobiológicos mostram que os níveis de glutamato no tálamo e no hipocampo dos camundongos não são afetados pela DT nem pelo treino no LTR. Dados semelhantes foram observados em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, utilizando ratos (Andrade, 2011; Nunes, 2016) e camundongos (Sena, 2013) como modelo experimental e medindo os níveis de glutamato no final do processo de aprendizado. Gong e colaboradores (2017) também encontraram resultado similar em estudo com camundongos DT submetidos ao labirinto em Y, no qual não foi detectada alteração de glutamato no hipocampo, apenas no córtex.

Por ser um neurotransmissor amplamente distribuído e com vasto espectro funcional no SNC (Krebs, Erichsen & Bingman, 1991) os mecanismos de modulação e manutenção das concentrações homeostáticas do glutamato podem ter sido eficientes e evitado alterações significativas deste neurotransmissor. Alguns dos

mecanismos responsáveis pela homeostase funcionam para todos os neurotransmissores, mas para o glutamato os sistemas de tamponamento parecem distintos e bastante eficazes. Como exemplo, pode-se mencionar a função dos astrócitos (Volterra, 2005; Stipursky e cols., 2010) e dos sistemas de inibição da recaptação de glutamato (Carvalho e cols., 2006). No entanto, os mecanismos de controle podem falhar em situações mais graves, p.ex. morte neuronal extensiva, como acontecem em fases avançadas de processos neurodegenerativos. Provavelmente, alterações nos níveis de glutamato devem ocorrer quando o insulto provoca lesões graves, o que parece não ter sido o caso do modelo utilizado no presente estudo.

Por outro lado, os níveis de GABA foram afetados pela DT, que aumentou os níveis desse neurotransmissor no tálamo dos animais DAT e DAP. Ao longo de uma semana, após os 30 dias de recuperação, parece que algum mecanismo de tamponamento atua e reverte esse efeito, considerando que os animais do grupo DAT, no final de uma semana, apresentam níveis similares ao dos animais controle (não deficientes). Para os animais do grupo DAP, também ocorre um aumento de GABA no tálamo detectada após os 30 dias de recuperação, e a execução da tarefa cognitiva parece manter os níveis deste neurotransmissor mais altos ao longo do treino. Esse efeito do treino em manter os níveis de GABA mais altos, pode ser também observado nos animais do grupo CAP.

No hipocampo, para os animais não deficientes (CAP) o treino tem efeito significativo diminuindo os níveis de GABA e para os animais deficientes (DAP), para os quais a DT afeta (diminuindo) os níveis de GABA, o treino tem efeito significativo

aumentando esses níveis. Até aonde pudemos verificar, essa interação entre os efeitos da DT e do treino sobre os níveis de GABA, tanto no tálamo quanto no hipocampo, é observado pela primeira vez. E o mais interessante, é que a relação significativa com o desempenho do animal na aquisição da tarefa espacial apenas se estabelece com os níveis de GABA no hipocampo. Além disto, essa relação é mais evidente para os animais deficientes. A variação dos níveis de GABA como um dos substratos neurobiológicos do aprendizado espacial se configura como um resultado relevante do presente estudo.

Outro achado importante é o fato da DT afetar o GABA e também o desempenho cognitivo espacial do animal. Uma das hipóteses levantadas é que a tiamina e/ou suas formas fosforiladas, importantes para o desempenho cognitivo espacial do animal, podem ter um papel na manutenção da homeostase do GABA, aqui evidenciado no tálamo e no hipocampo. Essa hipótese é corroborada por um dos resultados da análise proteômica realizada em estudo do nosso grupo (Nunes e cols., 2018), que mostrou efeito da DT na expressão da proteína enzimática L-ácido glutâmico descarboxilase (glutamate decarboxylase 1 (gene: Gad1 – accession: C9E895), responsável pela produção de GABA via glutamato. O fato da tiamina difosfato (TPP) também atuar no ciclo de Krebs, que é fonte do precursor de GABA, através do alfa-cetoglutarato, também reforça essa hipótese. Deve-se também considerar uma função específica da tiamina no SNC (Bettendorff, 1996, Houzen, 1998), como sendo responsável pela associação dessa vitamina com funções do GABA relacionadas com o tálamo e hipocampo.

O efeito da DT sobre o conteúdo de GABA pode estar relacionado a disfunções nos núcleos talâmicos que, por sua vez, podem ser responsáveis pelos déficits cognitivos (Mair, 1994; Langlais e Savage, 1995; Langlais e cols., 1996; Savage e cols., 2011). No entanto, não observamos correlação significativa entre os níveis de GABA no tálamo e o desempenho cognitivo. Portanto, esse efeito pode existir, mas de forma não linear. Essa disfunção GABAérgica talâmica pode afetar o hipocampo uma vez que a formação hipocampal está reciprocamente ligada aos núcleos talâmicos anteriores que, juntamente com outros núcleos, desempenham um papel importante na aprendizagem espacial e na memória (Groen e cols., 2002). Além disso, tem sido demonstrado que vários tipos de interneurônios hipocampais GABAérgicos têm um papel modulatório importante para a consolidação e modificação de diferentes tipos de memória dependente do hipocampo (Paulsen e Moser, 1998 Han e cols., 1993; Freund & Buzsáki, 1996).

Observamos que as etapas iniciais da aquisição requerem um aumento nos níveis de GABA no hipocampo, mas os camundongos DAP não apresentam um aumento, provavelmente, suficiente. Portanto, pode ser que o atraso na aquisição da tarefa, observado nesse grupo, esteja relacionado à um déficit nos níveis de GABA. Essa ideia é corroborada pela verificação da existência de uma correlação significativa entre os níveis de GABA no hipocampo e desempenho dos animais deficientes.

Alguns autores (Gao, 2014; Noebels, 2013) sugerem que mais importante do que as concentrações isoladas de glutamato e GABA, é o balanço entre eles, cuja disfunção poderia levar a apoptose neuronal relacionada com um pior desempenho cognitivo. Gao e cols. (2014) mostraram que ratos estressados apresentam prejuízo no



desempenho no LAM e uma taxa [GABA]/[glutamato] no hipocampo aumentada em relação ao grupo controle, ou seja, uma diminuição, se a taxa for inversamente expressa, como no presente trabalho: [glutamato]/[GABA]. Os nossos dados mostram uma diminuição da taxa [glutamato]/[GABA] no tálamo e um aumento no hipocampo, induzidas pela DT. Uma vez que o balanço entre esses sistemas é importante para a manutenção das funções cognitivas (Mishra, 2013; Liguz-Leczner e cols., 2013; Gao e cols., 2014), plasticidade sináptica, aprendizado e memória (McEntee, 1993; Toso e cols., 2007; McNally e cols., 2008), o distúrbio causado pela DT nesse fator, poderia ser também um dos responsáveis pelo atraso na aquisição da informação espacial. No entanto, não foi observada relação significativa entre o desempenho na aquisição da tarefa e a taxa [glutamato]/[GABA].

Um dado interessante é que a DT e o treino (AP) não afetam as concentrações de glutamato, mas afetam as de GABA. Era de se esperar então que a DT e o AP afetassem também a taxa, já que GABA está alterado. No entanto, a taxa só é afetada pela DT. E o fato da relação com o desempenho se estabelecer, de forma significativa, apenas com os níveis de GABA do hipocampo, sugere um papel específico do GABA, como componente neurobiológico do aprendizado espacial. Outro dado interessante, quando se compara o perfil das curvas de correlações entre GABA no hipocampo e o número de erros, dos grupos CAP e DAP, pode-se perceber que o efeito da DT induziu uma inversão na relação GABA x desempenho.

Como mencionado, uma importante questão do presente estudo é verificar o envolvimento de parâmetros neuroimunológicos nos processos de aprendizagem (treino cognitivo) e nos efeitos induzidos pela DT. Observamos que a DT causa uma

diminuição dos níveis de BDNF tanto no tálamo quanto no hipocampo. Em algumas doenças neurodegenerativas também é encontrada expressão reduzida do BDNF no tálamo, como a doença de Huntington (Samadi e cols., 2013) e a esquizofrenia (Lotto e cols., 2001). Em ratos idosos, Croll e cols. (1998) observaram uma diminuição de BDNF e de TrkB em várias áreas do cérebro, incluindo o tálamo e o hipocampo, e uma correlação entre essa perda e o desempenho no LAM.

Mostramos também que o treino aumenta os níveis de BDNF no hipocampo, mas não no tálamo nos animais deficientes. Essa observação de que a DT diminui níveis de BDNF no hipocampo e que ao longo do treino os níveis de BDNF, progressivamente aumentam, coincidindo com a melhora do desempenho cognitivo espacial dos animais deficientes é muito interessante. Esses efeitos são efetuados via transcrição genética, uma vez que os níveis de RNAm do gene *Bdnf* foram igualmente afetados pela DT e pelo treino. Esses achados levantam a questão sobre um possível papel da tiamina e/ou seus derivados na modulação, direta ou indireta, do processo de transcrição do gene *Bdnf*. Existe ainda correlação negativa entre o desempenho dos animais dos grupos CAPDAP ou DAP, separadamente, e os níveis de BDNF no hipocampo. Isso significa que os camundongos que erraram menos na tarefa no LTR exibiam maiores níveis de BDNF. Uma possível explicação para esse efeito sobre a transcrição gênica pode ser através do mecanismo de tradução de sinal dependente de AMP-c, que envolve a fosfoproteína ligante do elemento de resposta ao AMPc, denominada CREBp. Uma vez que Luo e colaboradores (2017) mostraram que ratos submetidos a estresse crônico brando e imprevisível, com prejuízo no desempenho no LAM apresentaram menores níveis de BDNF e de

CREBp/CREB no hipocampo, e que essa diminuição estava relacionada a ativação da via AMPc/PKA-CREB-BDNF.

Ainda considerando os animais dos grupos que passaram pelo processo de aprendizado (CAPDAP), um outro achado interessante é que a DT diminui os níveis de BDNF e aumenta os níveis de GABA no **tálamo**, comparado com os respectivos controles, e nenhum desses dois parâmetros é afetado ao longo do processo de aprendizado. Provavelmente, outros aspectos comportamentais dependentes do tálamo, não avaliados no presente estudo, possam estar alterados. Quando se avalia a relação entre BDNF e GABA no tálamo, observa-se que o efeito da DT gera uma distribuição distinta entre os animais deficientes e os controles. Esta distribuição resulta em uma relação significativa entre esses dois parâmetros no tálamo. Ou seja, os sistemas cerebrais de indivíduos que passaram por um episódio de DT respondem de forma diferente, e dependentes da região cerebral, aos estímulos que dependem de uma função associada entre BDNF e GABA.

Por outro lado, quando se estuda a relação desses dois parâmetros (BDNF e GABA) no hipocampo, os quais foram afetados pelo processo de aprendizagem espacial, observa-se uma correlação significativa, gerada, principalmente, pelo efeito do processo de aprendizagem nos animais deficientes, que aumenta de forma significativa e associada, os níveis de BDNF e GABA no hipocampo. Este efeito é pronunciado nos animais deficientes e não aparece nos animais controles. Ou seja, o processo de aprendizagem nos animais deficientes induz, de forma associada (relacionada) um aumento de BDNF e GABA, os quais foram diminuídos pela DT.

Já foi demonstrado que BDNF é capaz de modular a excitabilidade de um via neural através da diminuição do efeito do GABA. BDNF-TrkB sinaliza uma regulação negativa do cotransportador de potássio e cloreto 2 (KCC2) que leva a um colapso do gradiente de cloreto (Cl). Assim, a ação inibitória do GABA é pouco efetiva, uma vez que ele atua nos canais de cloreto. Essa alteração da excitabilidade da via no hipocampo poderia estar relacionada ao atraso na aquisição da tarefa cognitiva, observada nos animais deficientes (Ferrini e Koninck, 2013).

Os achados dos papéis do BDNF e do GABA no processo de aprendizagem espacial e dos mesmos serem alvos de insultos que afetam a cognição, como a DT, são inéditos e corroborados por evidências da existência de um efeito do BDNF em sinapses inibitórias da região CA1 do hipocampo (Rajamani e cols, 2019). Outros autores também mostraram dados sobre uma relação entre sistema Gabaérgico e BDNF no hipocampo (Maejima e cols., 2018, Brady e cols., 2018).

Sabe-se que, em certas condições o BDNF não é produzido no SNC somente por neurônios, mas também pelas micróglia (Trang e cols., 2011). Essas células da imunidade inata, também são responsáveis pela produção das citocinas analisadas aqui, como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ . Os níveis de IL-1  $\beta$  são afetados pela DT tanto no tálamo quanto no hipocampo. O possível déficit na produção de IL-1 $\beta$  parece estar relacionado à dificuldade de aprendizado exibido pelo grupo DAP, nas fases iniciais do treino, uma vez que há correlação negativa entre os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo e o número de erros praticados pelos animais durante o treino. Ou seja, camundongos que apresentaram maior concentração de IL-1 $\beta$  exibiram um melhor desempenho na tarefa. Este achado está de acordo com a literatura, uma vez que o

prejuízo na produção dessa citocina acarreta déficits na memória dependente de hipocampo e na plasticidade neuronal (Avital e cols., 2003).

Com relação aos efeitos sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , a deficiência levou a um aumento dos níveis dessa citocina no tálamo e no hipocampo. Esses achados fazem sentido, sabendo-se que essa citocina está relacionada a processos inflamatórios e fenótipos deletérios para neurogênese (Ziv e cols., 2008) e o tálamo e o hipocampo são regiões afetadas pela DT. Esses dados sugerem que os efeitos dessa citocina podem estar relacionados ao prejuízo em sistemas neurobiológicos associados à neurodegeneração, como por exemplo, uma reação inflamatória. Esse fator não se correlaciona com o desempenho cognitivo dos animais na tarefa avaliada no presente estudo, em nenhuma das condições estudadas.

Segundo McGeer e McGeer (2001) toda doença neurodegenerativa está associada a células da imunidade inata (p. ex. micróglia) ativadas dentro do tecido neural e produzindo moléculas tóxicas. Nesse contexto, os resultados encontrados para BDNF, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  sugerem uma participação das micróglia e seus produtos na disfunção causada pela DT, corroborando dados da literatura que mostraram que a micróglia em seu estado ativado é a principal responsável pela disfunção neurológica em animais com DT (Wang & Hazell, 2010, Qin & Fulton, 2014). Parece também, que os produtos secretados por essa célula (como o BDNF e IL-1 $\beta$ ) podem participar de processos fisiológicos em cérebros saudáveis.

Um dos dados inéditos obtidos no presente estudo é que os efeitos do processo de aprendizado sobre componentes neuroimunológicos, no hipocampo de

camundongos deficientes, dependem da etapa desse processo. Por exemplo, os parâmetros, BDNF, RNAm de Bdnf e IL-1 $\beta$ , que se encontram significativamente diminuídos devido ao efeito da DT foram gradativamente aumentados, ou seja, recuperados ao longo do processo de aprendizado (treino). Esses achados sugerem a importância do papel desses componentes neuroimunológicos e, possivelmente da micróglia, como parte das bases moleculares do aprendizado espacial. Um fato interessante é que as alterações não são observadas no tálamo e sim no hipocampo, que é a região que desempenha um papel funcional importante na cognição espacial (Squire e Zola-Morgan, 1991; Amaral & Witter, 1989; Knowles, 1992).

Os dados obtidos aqui levantam novas questões sobre as bases neurobiológicas do aprendizado espacial e abrem novas perspectivas para estudos futuros que possam explorar melhor esses fenômenos.

## 7. CONCLUSÕES

As variações nos níveis de GABA, BDNF e IL-1 $\beta$  no hipocampo representam componentes dos substratos neurobiológicos do aprendizado espacial, exercendo funções relacionadas a esse processo, principalmente, após um episódio de DT.

A tiamina e/ou suas formas fosforiladas, importantes para o desempenho cognitivo espacial do animal, podem ter um papel na manutenção da homeostase do GABA e do BDNF.

A tiamina e/ou suas formas fosforiladas podem exercer uma função, direta ou indireta, na modulação da transcrição do gene *Bdnf* e, conseqüentemente, na produção de BDNF.

Componentes neuroimunológicos do hipocampo podem ser modulados durante a execução de uma tarefa cognitiva espacial e podem ser afetados por insultos neurodegenerativos, como a DT.

A DT causa disfunções neurobiológicas crônicas em componentes neuroimunológicos associados ao processo de aprendizagem espacial.

## **COMPROVAÇÃO DA HIPÓTESE CENTRAL DO ESTUDO:**

A atividade cognitiva pode reverter os níveis de GABA e BDNF do hipocampo (que foram diminuídos pela DT ou outro insulto) ao longo das sessões de treino. À medida que os níveis de GABA e BDNF se elevam durante o treino, em direção aos níveis dos animais controle, o desempenho também melhora e, com a repetição da tarefa, o animal atinge um desempenho similar aos dos animais controles. Como encontramos uma relação fortemente significativa entre GABA e BDNF no hipocampo ( $r=0,76$ ,  $p=0,0001$  e  $r^2=0,58$ , Figura 24), e existem dados da literatura (Maejima, 2018; Ferrini e Koninck,2013) indicando a possível existência de um mecanismo de interface entre esses dois componentes moleculares no hipocampo, os achados do presente estudo, sobre a associação entre essa modulação e o desempenho cognitivo espacial é relevante e representa um dado inédito neste campo do conhecimento sobre as bases neurobiológicas do aprendizado em condições fisiológicas e patológicas.



## 8 REFERÊNCIAS

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S. e cols. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21(3): 383-421. 2000.

Aleshin VA, Mkrtchyan GV, Bunik VI. Mechanisms of Non-coenzyme Action of Thiamine: Protein Targets and Medical Significance. *Biochemistry (Mosc)*, 84(8):829-850. 2019.

Amaral, D.G., Witter, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3):571-91.1989.

Andrade, P.R. Níveis de GABA e Glutamato Centrais e Aspectos Cognitivos em Modelo Experimental de Deficiência Grave de Tiamina. 2011. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – UFMG, Belo Horizonte, 2011.

Aristóteles. On memory and recollection (W. S. Hett, trad.). Londres: William Henemann. (Original de séc. IV a.C.) 1957.

Avital, A., Goshem, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., Yrmiya, R. Impaired Interleukin-1 signalling is associated with deficits in hippocampal memory process e neural plasticity. *Hippocampus*, 13(7):826-834. 2003.

Baldelli, P., Novara, M., Carabelli, V. , Hernández-Guijo, J. M. and Carbone, E. BDNF up-regulates evoked GABAergic transmission in developing hippocampus by potentiating presynaptic N and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels signaling. *European Journal of Neuroscience*, 16(12):2297–2310, 2002.

Baldelli, P., Hernandez-Guijo, J.-M. Carabelli, V. and E.Carbone. Brain-derived neurotrophic factor enhances GABA release probability and nonuniform distribution of N- and P/Q-type channels on release sites of hippocampal inhibitory synapses. *Journal of Neuroscience*, 25(13):3358–3368, 2005.

Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H., Feldon, J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 273-283. 2004.

Barnes, C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93:74–104. 1979.

Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, 19:1708 –1716. 1999.

Bettendorff, L. A non-cofactor role of thiamine derivatives in excitable cells? *Arch Physiol Biochem*, 104(6):745-51. 1996.

Béchade, C., Cantaut-Belarif, Y. and Bessis, A. Microglial control of neuronal activity. *Cellular Neuroscience*, 2013.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J.I., Goldin, A., Izquierdo, I., Medina, J.H. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(7):2711-6. 2008.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist*, 12(2):147-56. 2008.

Bianchi, M.; P. Sacerdote; L. Locatelli; P. Mantegazza; A. E. Panerai. Corticotropin releasing hormone, interleukin-1 alpha, and tumor necrosis factor-alpha share characteristics of stress mediators. *Brain Res*, 546:139-42. 1991.

Biel, W. C. Early age differences in the maze performance of the albino rat. *J Genet Psychol*, 56: 439—453. 1940.

Black, P.H. Psychoneuroimmunology: brain and immunity. *Scientific American-Science & Medicine*, 29:16-25.1995.

Bramham, C.R. e Messaoudi, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Neurobiology*, 76:99–125. 2005.

Buchanan, R.J.; Darrow, D.P.; Meier, K. T.; Erobinson, J.; Eschiehser, D.; Eglahn, D.; Enadasdy, Z.; Changes in GABA and Glutamate concentrations during Memory Tasks in Patients with Parkinson's disease undergoing DBS Surgery. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8:34-42 . 2014.

Buckingham, J.C., Loxley, H.D., Christian, H.C., Philip, J.G. Activation of the HPA axis by immune insults: role and interactions of cytokines, eicosanoids, and glucocorticoids. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1):285-98.1996.

Bueno, K.O. e cols. Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome are related to changes in thalamic VDAC protein concentrations. *Neuroscience*, 294:29-37. 2015.

Burbaeva, G. ; Boksha, I. ; Tereshkina, E. ; Savushkina, O. ; Prokhorova, T. ; Vorobyeva, E. Glutamate and GABA-Metabolizing Enzymes in Post-mortem Cerebellum in Alzheimer's Disease: Phosphate-Activated Glutaminase and Glutamic Acid Decarboxylase. *The Cerebellum*, 13(5):607-615. 2014

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

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

Cacci, E., Claasen, J.H., and Kokaia, Z. Microglia - derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of new born hippocampal progenitor cells in vitro. *J. Neurosci. Res*, 80, 789–797. 2005.

Carrillo-Mora, P., Giordano, M., Santamaria A. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research* 203, 151–164. 2009.

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.* 83: 481-489. 2006.

Chen F, Zhou CC, Yang Y, Liu JW, Yan CH. GM1 Ameliorates Lead-Induced Cognitive Deficits and Brain Damage Through Activating the SIRT1/CREB/BDNF Pathway in the Developing Male Rat Hippocampus. *Biol Trace Elem Res.* 23: 123-127 2018.

Choi, S. e cols. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science*, 361(6406): 231-234. 2018.

Ciccia, R. M.; Langlais, P. J. An examination of the synergistic interaction of ethanol and thiamine deficiency in the development of neurological signs and long-term cognitive and memory impairments. *Alcohol Clin Exp Res*, 24(5):622-34. 2000.

Cohen, N.J., Squire LR. Preserved learning and retention of pattern analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210:207–210. 1980.

Colton, C.A., Gilbert, D.L. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the micróglia. *FEBS Lett*, 223:284 –288. 1987.

Croll, S.D., Ip, N.Y., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res*, 23;812(1-2):200-8. 1998.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kin JV, Zuo Y, Jung S e cols. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*, 8(6):752-758. 2005.

Deacon, R.M.J. Shallow Water (Paddling) Variants of Water Maze Tests in Mice. *J Vis Exp* (76), 2013.

Deacon, R.M.J. and Rawlins, J.N.P. Learning Impairments of Hippocampal-Lesioned Mice in a Paddling Pool. *Behavioural Neuroscience*, 116(3):472-478. 2002.

de Freitas-Silva, Danielle Marra ; Resende, Letícia de Souza ; Pereira, Silvia Rejane Castanheira ; Franco, Glaura Conceição ; Ribeiro, Angela Maria Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring *Behavioural Brain Research*, 211(1):33-40. 2010.

De Pins, B. e cols. Conditional BDNF Delivery from Astrocytes Rescues Memory Deficits, Spine Density, and Synaptic Properties in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer Disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(13):2441-2458. 2019.

Derecki, N.C., Cardani, A.N., Yang, C.H., Quinlins, K.M., Cirifield, A., Lynch, K.R. e cols. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med*, 207: 1067–1080. 2010.

Dinarello, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87:2095-147. 1996.

Dror, V. e cols. Rasagiline prevents neurodegeneration in thiamine deficient rats-a longitudinal MRI study. *Brain Res*, 1557: 43-54. 2014.

Ebbinghaus, H. *Memory: A contribution to experimental psychology* (H. A. Huber & C. Bussenius, Trad., 2005). 1885.

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

El Hayek, L. e cols. Lactate Mediates the Effects of Exercise on Learning and Memory through SIRT1-Dependent Activation of Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *Neuroscience*, 39(13):2369-2382. 2019.

Ferrer I, e cols. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58:729–739. 1999.

Ferrini, F & Koninck, Y. Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plasticity*. 2013.

Foster, A.C. & Kemp, J.A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*, 6: 7-17.2006.

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*, 177: 289-293. 2010.

Frerking, M., Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) modulates inhibitory, but not excitatory, transmission in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 80(6):3383–3386. 1998.

Freund, T.F. & Buzsáki, G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6: 347-470. 1996.

Fyhn, M., Molden, S., Witter, M.P., Moser, E.I., Moser, M.B. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*, 305:1258 –1264. 2004.

Gao, J. e cols. Sulforaphane Alleviates Lipopolysaccharide-induced Spatial Learning and Memory Dysfunction in Mice: The Role of BDNF-mTOR Signaling Pathway. *Neuroscience*, 388:357-366. 2018.

Gibson, G. E. e cols. Vitamin B1 (thiamine) and dementia. *Ann N Y Acad Sci*, 1367(1):21-30. 2016.

Gibson, G.E., Park, L.C.H., Zhang, H., Sorbi, S., Calingasan, N.Y. Oxidative stress and a key metabolic enzyme in Alzheimer brains, cultured cells, and an animal model of chronic oxidative deficits. *Neurodegenerative Disorders*, 893:79-94. 1999.

Gladkevich, A., Kauffman, H.F., Korf, J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorder. *Prog Neuro-psychopharmacol. Biol Psychiatry*, 28: 559-576.2004.

Gonçalves, M.P.; Tomaz, C.; Sangoi, C. Considerações sobre envelhecimento, memória e atividade física. *R. bras. Ci e Mov*, 14(1): 101-108. 2006.

Gong, Y.S. e cols. Comparative effects of EtOH consumption and thiamine deficiency on cognitive impairment, oxidative damage, and  $\beta$ -amyloid peptide overproduction in the brain. *Free Rad Bio Med*, 108: 163-173. 2017.

Goshen, I., Kreisel, T., Ben-Menachem-Zidon, O., Licht, T., Weidenfeld, J., Ben-Hur, T., et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol. Psychiatry*, 13:717–728. 2008.

Gottmann, K., Mittmann, T., and Lessmann, V. “BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses,” *Experimental Brain Research*, 199(3-4):203–234, 2009.

Gray, J.A. The neuropsychology of anxiety: an inquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford University Press, Oxford. 1982.

Gray, J.A., McNaughton, N. The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system (2nd ed.) New York: Oxford University Press. 2000.

Haas RH. Thiamin and the brain. *Ann Ver Nutr*, 8: 483-515.1988.

Hafting, T. e cols. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436:801-806. 2005.

Hagino, Y., Kariura, Y., Manago, Y., Amano, T., Wang, B., Sekiguchi, M., Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K. e Noda, M. Heterogeneity and potentiation of AMPA type of glutamate receptors in rat cultured micrógliia. *Glia*, 47: 68–77, 2004.

Hakim, A.M. & Pappius, H.M. Sequence of metabolic, clinical and histological events in experimental thiamine deficiency. *Ann. Neurol*, 13: 365-375.1983.

Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci*, 3:533–535. 2000.

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

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

Hazell, A.S.; Butterworth, R.F. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol*. 44(2):141-7. 2009.



Henry, J.P. Psychological and physiological responses to stress: the right hemisphere and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, an inquiry into problems of human bonding. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161(640):10-25. 1997.

Henze, D.A., Urban, N.N. e Barrionuevo, G. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience*, 98:3,407-27. 2000.

Héroux, M., Butterworth, R.F. Reversible alterations of cerebral gamma-aminobutyric acid in pyriethamine-treated rats: implications for the pathogenesis of Wernicke's encephalopathy. *J Neurochem*, 51(4):1221-6.1988.

Houzen, H., Kanno, M. Thiamine and its derivatives inhibit delayed rectifier potassium channels of rat cultured cortical neurons. *Neuropharmacology*, 37(3):313-22. 1988.

Huang, E.J., e Reichardt, .LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci*, 24:677–736. 2001.

Inaba, H., Kishimoto, T., Oishi, S., Nagata, K., Hasegawa, S., Watanabe, T. & Kida, S. Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke–Korsakoff syndrome. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1347-6947. 2016.

James, W. *The principles of psychology*. Chicago: Encyclopaedia Britannica. (Trad. 1990). 1890.

Jhala, S.S., Wang, D. and Hazell, A.S. Thiamine deficiency results in release of soluble factors that disrupt mitochondrial membrane potential and downregulate the glutamate transporter splice-variant GLT-1b in cultured astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 448(3): 335-341. 2014.

Kanchan, B., Kaushik, S., Tremblay, M. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. *Neurobiology of Stress*, 9:9-21. 2018.

Kang, H., Schuman, E.M. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*, 273:1402–1406. 1996.

Kernie, S. G, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J.* 19:1290–1300. 2000.

Kerschensteiner, M., Meinl, E., Hohlfeld, R. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience*. 158(3):1122-1132. 2009.

Kessels, R.P.C., Haan, E.H.F., Kappelle, I.J., Postma, A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Rev*, 35: 295- 303. 2001.

Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M. 2004. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 101:8180-8185. 2004.

Kipnis, J., Derecki, N.C., Yang, C., Scrable, H. 2008. Immunity and cognition: what do age-related dementia, HIV-dementia and “chemo-brain” have in common? *Trends Immunol*, 29:455-463. 2008.

Kokaia, M. e cols. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. *Exp Neurol*, 133:215–224. 1995.

Koo, J.W., and Duman, R.S. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and an hedonic effects of stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 751–756. 2008.

Kopelman, M. D. e cols. The Korsakoff syndrome: clinical aspects, psychology and treatment. *Alcohol Alcohol*, 44(2);148-54. 2009.

Krebs, J. R., Erichsen, J. T., Bingman, V. P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the Dorsomedial Telencehalon of the pigeon. *J. Comp. Neurol*, 314:467-477. 1991.

Kuhn, S.A., van Landeghem, F.K., Zacharias, R., Farber, K., Rappert, A., Pavlovic, S., Hoffmann, A., Nolte, C., Kettenmann, H. Microglia express GABAB receptors to modulate interleukin release. *Mol Cell Neurosci*, 25: 312–322. 2004.

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 Chromatogr A*, 987(1):311-22. 2003.

Kuzumaki, N., Ikegami, D., Imai, S., Narita, M., Tamura, R., Yajima, M., e cols. Enhanced IL-1beta production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. *Synapse*, 64:721–728. 2010.

Kwon, O., Feng, L., Druckmann, S., Kim, J. Schaffer Collateral Inputs to CA1 Excitatory and Inhibitory Neurons Follow Different Connectivity Rules, *30;38(22):5140-5152*. 2018.

Langlais, P.J. e cols. Long-lasting changes in regional brain amino acids and monoamines in recovered pyriethamine treated rats. *Neurochem Res*, 13(12):1199-206. 1988.

Langlais, P.J., Mair, R.G., Anderson, C.D., Mcintee, W.J. Monoamines and metabolites in cortex and subcortical structures: normal regional distribution and the effects of thiamine deficiency in the rat. *Brain Research*, 421(1):140-149. 1987.

Langlais, P. J.; Mandel, R. J.; Mair, R. G. Diencephalic lesions, learning impairments, and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. *Behav Brain Res*, 48(2):177-85.1992.

Langlais, P.J., Savage, I.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*, 68(1):75-89. 1995.

Langlais PJ, Zhang SX, Savage LM. Neuropathology of thiamine deficiency: an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metab Brain Dis*, 11:19-37. 1996.

Leal, G., Comprido, D., Duarte, C.B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacol*, 76:639– 656. 2014

Liguz-Leczna, M., Lehner, M., Kaliszewska, A., Zakrzewska, R., Sobolewska, A. e Kossut, M. Altered glutamate/GABA equilibrium in aged mice cortex influences cortical plasticity. *Brain Struct Funct*, 2014.

Linnarsson, S., Bjorklund, A., Ernfors, P. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci*. 9:2581–2587, 1997.

Liu, M. e cols. Thiamine deficiency induces anorexia by inhibiting hypothalamic AMPK. *Neuroscience*, 267:102-13. 2014.

Luo Y., Kuang S., Li H., Ran D., Yang J. (2017). cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Oncotarget* 8, 35558.

Lyons W. E, e cols. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:15239–15244. 1999.

Maejima, H., Ninuma, S., Okuda, A., Inoue, T., Hayashi, M. Exercise and low-level GABAA receptor inhibition modulate locomotor activity and the expression of BDNF accompanied by changes in epigenetic regulation in the hippocampus. *Neuroscience Letters*, 685:18-23. 2018.

Magalhães, T. A., Correa, D., Carvalho, L. M., Damasceno, S., Godard, A. L. B. Maternal separation affects expression of stress response genes and increases vulnerability to ethanol consumption. *Brain and Behavior*, 8(1):841. 2017.

Mair, R. G. On the role of thalamic pathology in diencephalic amnesia. *Rev Neurosci*, 5(2):105-40. 1994.

Martin, I.A. and Kipnis, J. Central Nervous System: (Immunological) Ivory Tower or Not? *Neuropsychopharmacology Reviews*, 42:28–35. 2017.

Martin, P.R., Singleton, C.K., Hiller-Sturmhöfel, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res. Health*, 27(2):134-42. 2003.

Matcovitch-Natan, O., Winter, D.R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H. e cols. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science*, 353(6301):8670. 2016.

Mayr, J. A. e cols. Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway. *Am J Hum Genet*, 89(6):806-12. 2011.

Mattson, M. P. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1144:97–112. 2008.

McEwen, B.S., Biron, C.A., Brunson, K.W, Bulloch, K., Chambers, W.H., Dhabhar, F.S., Goldfarb, R.H., Kitson, R.P., Miller, A.H., Spencer, R.L., Weiss, J.M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*, 23:79-133.1997.

McEntee, W.J., Crook TH. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*, 111:391–401.1993.

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

McGeer, P.L. and McGeer, E.G. Polimorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Arch. Neurol*, 58:1790-1792. 2001.

McNally, G.P., Augustyn, K.A., Richardson, R. GABA(A) receptors determine the temporal dynamics of memory retention. *Learn Memory*, 15(3): 106-111. 2008.

Mengerink, Y. e cols. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and ophthaldialdehyde/ N-acetyl-L-cysteine reagents. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry study. *J Chromatogr A*, 949(1-2): 99-124. 2002.

Merighi, A., Salio, C., Ghirri, A. e cols. BDNF as a pain modulator. *Neurobiology*, 85(3): 297–317. 2008.

Morris, R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*, 12:239–60. 1981.

Moser, E.I., Kropff, E., Moser, M.B. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci*, 31:69 – 89. 2008.

Mott, D.D., Lewis, D.V. Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABA receptors. *Science*, 252: 1718-1720. 1991.

Mousseau, D. D; Rao, V. L.; Butterworth, R. F. Alterations in serotonin parameters in brain of thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. *J Neurochem*, 67(3):1113-23. 1996.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 63:71–124. 2001.

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*, 5759: 1-12. 2002.

Nakajima, K. e Kohsaka, S. Micróglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 4:65– 84. 2004.

Nilson, O.G., Shapiro, M.L., Gage, F.H., Olton, D.S. Bjorklund, A. Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. *Exp. Brain Research*, 67(1):195-215. 1987.

Noebels, J.L. The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci*, 26: 599-625. 2003.

Nunes, P.T. Efeitos da deficiência de tiamina sobre aspectos cognitivos espaciais e perfil do proteoma talâmico de ratos wistar. Tese de doutorado em neurociências. UFMG. 2016.

Nunes, P.T. ; Gómez-Mendoza, D.P. ; Rezende, C.P.; Figueiredo, H.C.P.; RIBEIRO, A.M. . Thalamic proteome changes and behavioral impairments in thiamine-deficient rats. *Neuroscience*, 181-197, 2018.

Oliveira-Silva, I.F., Pinto, L., Pereira, S.R.C., Ferraz, V.P., Barbosa, A.J.A., Coelho, V.A.A., Gualberto, F.F.A.S., Souza, V.F., Faleiro, R.R.M., Franco, G.C., Ribeiro, A.M. Age-related deficit in behavioural extinction is counteracted by long-term ethanol consumption: Correlation between 5-HIAA/5HT ratio in dorsal raphe nucleus and cognitive parameters. *Behav Brain Res*, 180: 226-234. 2007.

Olton, D.S., Becker, J.T., Handelmann, G.E. Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci*, 2: 313-365. 1979.

Olton, D.S., Samuelson, R.J. Remembrance of place passed. Spatial memory in rats. *J Exp Psychol: Anim Behav Process*, 2:97–116. 1976.

Okazaki, M. e cols. Changes in brain lipid composition in thiamine deficient rats. *Jpn J Pharmacol*, 54(2): 171-8. 1990.

O'Keefe, J., Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Behavioral Research*, 34:171-175. 1971.

Ortiz, J.B., Anglin, J.M., Daas, E.J. Paode, P.R., Nishimura, K., Conrad, C.D. BDNF and TrkB Mediate the Improvement from Chronic Stress-induced Spatial Memory Deficits and CA3 Dendritic Retraction. *Neuroscience*, 388:330-346. 2018.

Panja, D., Bramham, C.R. BDNF mechanisms in late LTP formation: a synthesis and breakdown. *Neuropharmacol* 76 [Pt C]:664–676. 2014.

Pastalkova, E., Itskov, V., Amarasingham, A., Buzsa, Áki.G. Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science*, 321:1322–1327. 2008.

Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*, 11:272–280. 2001.

Phillips HS, e cols. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*, 7:695–702. 1991.

Pires RG e cols.. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Behav Brain Res*, 162(1):11-21. 2005.



Pires RG e cols. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. *Pharmacol Biochem Behav*, 70(2-3):227-35, 2001.

Qin, Liya and Fulton, T. C. Focal thalamic degeneration from ethanol and thiamine deficiency is associated with neuroimmune gene induction, microglial activation, and lack of monocarboxylic acid transporters. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(3): 657-671. 2014.

Ransohoff, R.M. & Perry, V.H. Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 27: 119-145. 2009.

Resende, L.S., Ribeiro, A.M., Werner, D., Hall, J.M., Savage, L.M. Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. *Behav. Brain. Research*. 232: 421-425. 2012.

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

Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., e cols. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci*, 31:16241–16250. 2011.

Rudy, J.W., Stadler-Morris, S., Albert, P. Ontogeny of spatial navigation behaviors in the rat: dissociation of “proximal”- and “distal”-cue-based behaviors. *Behav Neurosci*, 101, 62–73.1987.

Said, H. M. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J*, 437(3):357-72. 2011.

Sankowski, R., Huerta, T.S., Kalra, R., Klein, T.J., Strohl, J.J., Al-Abed, Yousef, R.S., Huerta, P.T. Large-Scale Validation of the Paddling Pool Task in the Clockmaze for Studying Hippocampus-Based Spatial Cognition in Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2019.

Santos, A. R., Comprido, D.e Duarte, C. B. Regulation of local translation at the synapse by BDNF. *Neurobiology*, 92(4): 505–516. 2010.

Savage, L. M. Sustaining high acetylcholine levels in the frontal cortex, but not retrosplenial cortex, recovers spatial memory performance in a rodent model of diencephalic amnesia. *Behav Neurosci*, v. 126, n. 2, p. 226-36. 2012.

Savage, L.M., Hall, J.M., Vetreno, R.P. Anterior thalamic lesions alter both hippocampal-dependent behavior and hippocampal acetylcholine release in the rat. *Learn Mem*, 18(12):751-8. 2011.

Scalzo, S. J. e cols. Wernicke-Korsakoff syndrome not related to alcohol use: a systematic review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(12):1362-8. 2015.

Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama,R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., e cols. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *74:691–705*. 2012.

Schousboe e cols. Energy Substrates to Support Glutamatergic and GABAergic Synaptic Function: Role of Glycogen, Glucose and Lactate. *Neurotoxicity Research*, 12(4):263-268. 2007.

Schratt, G.M., Nigh, E.A., Chen, W.G., Hu, L., Greenberg, M.E. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci*, 24:7366–7377. 2004.

Scoville, W. B. e Milner, Brenda. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 20, 11-21, 1957.

Sechi, G.; Serra, A. Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. *The Lancet Neurology*, 6(5):442-455. 2007.

Sena, I.C. O aprendizado de uma tarefa de navegação espacial altera os níveis de gaba no Hipocampo de camundongos Swiss. 2013. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – UFMG, Belo Horizonte, 2013.

Šišková, Z. and Tremblay, M. Microglia and Synapse: Interactions in Health and Neurodegeneration. Article ID 425845. 2013.

Smith, E.E. and Grossman, M. Multiple systems of category learning. *Neurosc Behavior Reviews*, 32:249-264. 2008.

Solari, N.; Hangya, B. Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. *European Journal of Neuroscience*, 48(5):2199-2230. 2018.

Squire, R.L. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82:171–177. 2004.

Squire, R.L. Memory and Brain Systems: 1969–2009. *The Journal of Neuroscience*, 29(41):12711–12716. 2009.

Stadelmann, C., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Brck, W., Hohlfeld, R., Lassmann, H. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain*, 125(1):75-85. 2002.

Steward, O. Topographic organization of projections from entorhinal area to hippocampal formation of rat. *Journal of Comparative Neurology*, 167:(3):285-314. 1976.

Stipursky, J. e cols. Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the central nervous system. In: ULRICH, A.H. (Org.). Stem Cells: from tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy. Springer, 1:145-164. 2010.

Sullivan, E. V.; Pfefferbauns, A. Neuroimaging of the Wernicke–Korsakoff syndrome. Alcohol and Alcoholism, 44: (2):155-165. 2009.

Sun e cols. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer’s Disease Cell Stem Cell, 5:624–633, 2009

Sunyer, B., Patil, S., Hoger, H., Lubec, G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. Nat Protoc, 390:10–38. 2007.

Takács, V.T. e cols. Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. Nature Communications, 9(1):1-15. 2018.

Tamamaki, N., Abe, K. e Nojyo, Y. Three-dimensional analysis of the whole axonal arbors originating from single CA2 pyramidal neurons in the rat hippocampus with the aid of a computer graphic technique. Brain Research, 452(1-2): 255-72. 1988.

Tanaka, T., Saito H. and Matsuki, N. Inhibition of GABA(A) synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. Journal of Neuroscience, vol. 17, no. 9, pp. 2959–2966, 1997.

Taupin, Philippe. Neurogenesis in the adult central nervous system. Comptes Rendus Biologies, 329(7):465-476. 2006.

Thomson, A. D.; Baker, H.; Leevy, C. M. Patterns of 35S-thiamine hydrochloride absorption in the malnourished alcoholic patient. J Lab Clin Med, 76(1):34-45. 1970.

Timmusk T, e cols. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. Neuron, 10:475–489. 1993.

Tobinick, E. Tumor Necrosis Factor modulation for treatment Alzheimer's disease: rationale and current evidence. *CNS Drugs*, 23(9): 703-25. 2009.

Todd, K.G. & Butterworth, R.F. In Vivo Microdialysis in an Animal Model of Neurological Disease: Thiamine Deficiency (Wernicke) Encephalopathy. *Methods*, 23(1):55-61. 2001.

Tolman, E. C. Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev*, 55:189–208. 1948.

Torvik, A. Topographic distribution and severity of brain lesions in Wernicke's encephalopathy. *Clinical Neuropathology*, 6(1):25-29. 1986.

Toso, L., Johnson, A., Bissell, S., Roberson, R., Abebe, D., Spong, C.Y. Understanding the mechanism of learning enhancement: NMDA and GABA receptor expression. *Am J Obstet Gynecol*, 197(3): 267 e1-4. 2007.

Trang, T., Beggs, S. and Salter, M. W. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biology*, 7(1): 99–108. 2011.

Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., and Majewska, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol.* 8:e1000527. doi: 10.1371/journal.pbio.1000527. 2010.

Tremblay, M. -È. The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies," *Neuron Glia Biology*, 7:67–76. 2011.

Tulving, E. *Elements of episodic memory*. Oxford: Clarendon Press. 1983.

Vedder, L.C., e cols. "Interactions between chronic ethanol consumption and thiamine deficiency on neural plasticity, spatial memory, and cognitive flexibility." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(11):2143-2153. 2015.

Vedder, L.C. & Savage L.M. BDNF regains function in hippocampal long-term potentiation deficits caused by diencephalic damage. *Learning & Memory*. 24: 81-84. 2017.

Vetreno, R.P., Hall, J.M., Savage, L.S. Alcohol-related amnesia and dementia: Animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96:596–608. 2011.

Vetreno, R.P., Ramos, R.L., Anzalone, S., Savage, L.M. Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke–Korsakoff Syndrome. *Brain Research*, 1436:178-192. 2012.

Vigil, F.A., Oliveira-Silva, I.F., Ferreira, L.F., Pereira, S.R., Ribeiro, A.M. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behav Brain Res*, 210(1): 140-142. 2010.

Victor, M.; Adams, R.D.; Collins G. H. *The Wernicke–Korsakoff Syndrome and Related Neurologic Disorders Due to Alcoholism and Malnutrition*. Philadelphia. F. A. Davis Company, 231. 1989.

Volterra, A.; Meldolesi, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6(8):626-40, 2005.

Vorhees, C.V. Influence of early testing on postweaning performance in untreated F344 rats, with comparisons to Sprague-Dawley rats, using a standardized battery of tests for behavioral teratogenesis. *Neurobehav Toxicol Teratol*, 5(5):587-91. 1983.

Vortmeyer AO, Colmant HJ. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 414(1):61-7. 1988.

Xavier, G.F. & Costa, V.C.I. Dentate gyrus and spatial behavior. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33(5):762-773. 2009.

Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of its chemic terminals. *J. Neurosci*, 29, 3974–3980. 2009.

Wang, D. & Hazell, A.S. Microglial activation is a major contributor to neurologic dysfunction in thiamine deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402,123–128. 2010.

Wang, X., Pan, W., Xu, N., Zhou, Z., Zhang, G., Shen, J. Environmental enrichment improves long-term memory impairment and aberrant synaptic plasticity by BDNF/TrkB signaling in nerve-injured mice. *Neuroscience Letters*, 694:93-98. 2019.

Wendeln, A. e cols. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*, 556(7701):332-338. 2018.

Wesche, H.; W. J. Henzel; W. Shillinglaw; S. Li; Z. Cao. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7:837-47.1997.

Williams, R. R.; Cline, J. Synthesis of vitamin B1. *Journal of the American Chemical Society*, 58(8);1504-1505. 1936.

Wishaw, I.Q. A Comparison of Rats and Mice in a Swimming Pool Place Task and Matching To Place Task: Some Surprising Differences. *Physiology & Behavior*, 58(4): 687-693. 1995.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790): 1093-1097. 2006.

Wolf, S.A., Steiner, B., Akpinarli, A., Kammertoens, T., Nassenstein, C., Blankenstein, T., Kempermann, G. CD4-positive T lymphocytes provide a

neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J Immunol*, 182:3979-3984. 2009.

Wu, M.D., Hein, A.M., Moravan, M. J., Shaftel, S.S., Olschowka, J.A., and O'Banion, M.K. Adult murine hippocampal neurogenesis is inhibited by sustained IL-1beta and not rescued by voluntary running. *Brain Behav. Immun.* 26, 292–300. 2012.

Yamamoto, M., Kiyota, T. e cols. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am. J. Pathol*, 170(2): 680-92. 2007.

Yaniv, A. New dimensions for brain mapping. *Science*, 362(6418). 2019.

Zahavi, E., Steinberg, N., Altman, T., Chein, M., Joshi, Y., Gradus-Pery, T., Perlson, E. The receptor tyrosine kinase TrkB signals without dimerization at the plasma membrane. *Science signaling*, 11(529). 2018.

Zhang, X. e cols. Excitotoxic cytopathology, progression, and reversibility of thiamine deficiency-induced diencephalic lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 54(2):255-67. 1995.

Zhang, X., Sliwowska, J.H., Weinberg, J. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Exp Biol Med*, 230(6):376-388. 2005.

Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645–660. 2008.

Zhao, R. & Goldman, I.D. Folate and Thiamine Transporters mediated by Facilitative Carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and Folate Receptors. *Mol Aspects Med*, 34. 2013.



Zhong, Yu ; Chen, Jing ; Li, Li ; Qin, Yi ; Wei, Yi ; Pan, Shining ; Jiang, Yage ; Chen, Jialin ; Xie, Yubo. PKA-CREB-BDNF signaling pathway mediates propofol-induced long-term learning and memory impairment in hippocampus of rats. *Brain Res*, 1691:64-74. 2018.

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J. & Schwartz, M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in the adulthood. *Nat Neurosci*, 9:268-275. 2006.

Ziv, Y., Schwartz, M. Immune-based regulation of adult neurogenesis: implications for learning and memory. *Brain, Behaviour and Immunity*, 22(2): 167-176. 2008.

Zubaran, C.; Fernandes, J. G.; Rodnight, R. Wernicke-Korsakoff syndrome. *Postgrad Med J*, 73(855):27-31. 1997.

Zun-Ji Ke, Lorraine A, Bruce T, Gary E. Reversal of Thiamine Deficiency-Induced Neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. Vol. 62, No. 2. pp. 195-207. 2003.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Certificado do CEUA

 <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p><b>CERTIFICADO/CERTIFICATE</b></p>	
<p><b>CERTIFICADO</b></p>	
<p>Certificamos que o Protocolo nº. 73/2015, relativo ao projeto intitulado “<i>Avaliação de parâmetros neuroquímicos e imunológicos em camundongos Swiss durante as etapas do processo de aprendizado espacial</i>”, que tem como responsável Angela Maria Ribeiro, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 27/04/2015. Este certificado expira-se em 26/04/2020.</p>	
<p><b>CERTIFICATE</b></p>	
<p>We hereby certify that the Protocol n°. 73/2015, related to the Project entitled “<i>Evaluation of neurochemical and immunological parameters in Swiss mice during the stages of spatial learning process</i>”, under the supervision of Angela Maria Ribeiro, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 04/27/2015. This certificate expires in 26/04/2020.</p>	
<p>Belo Horizonte, 15/06/2018.</p>	
<p>Marcelo Resende de Souza Coordenador da CEUA/UFMG</p>	
<p>Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha- Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil - Telefone: (31) 3408-4314</p>	
<p><a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:ceua@ufmg.br">ceua@ufmg.br</a></p>	

## 9.2 Gráficos de dispersão das correlações verificadas nos grupos CAPDAP, CAP e DAP

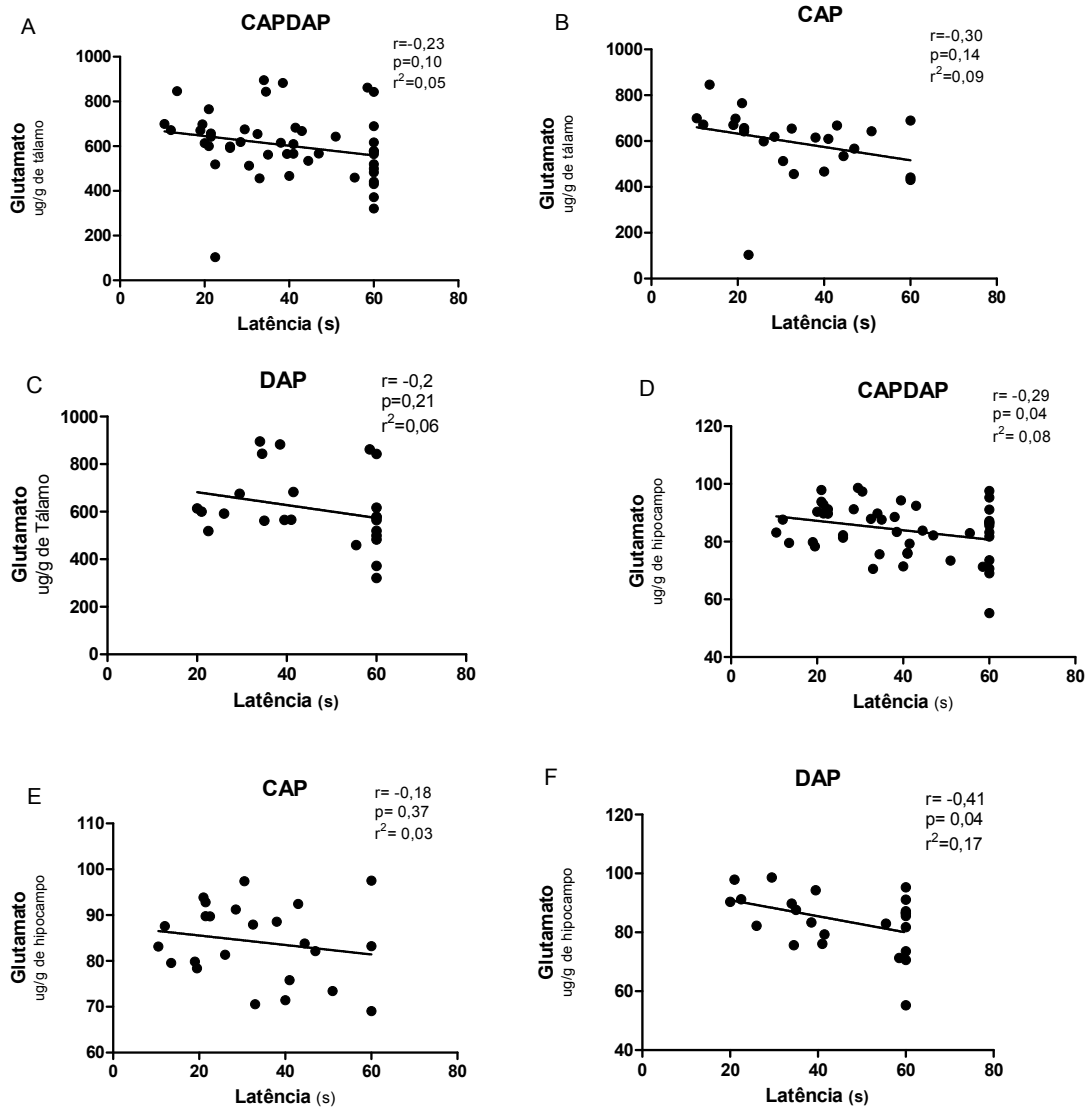


Figura 1: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de glutamato no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24)

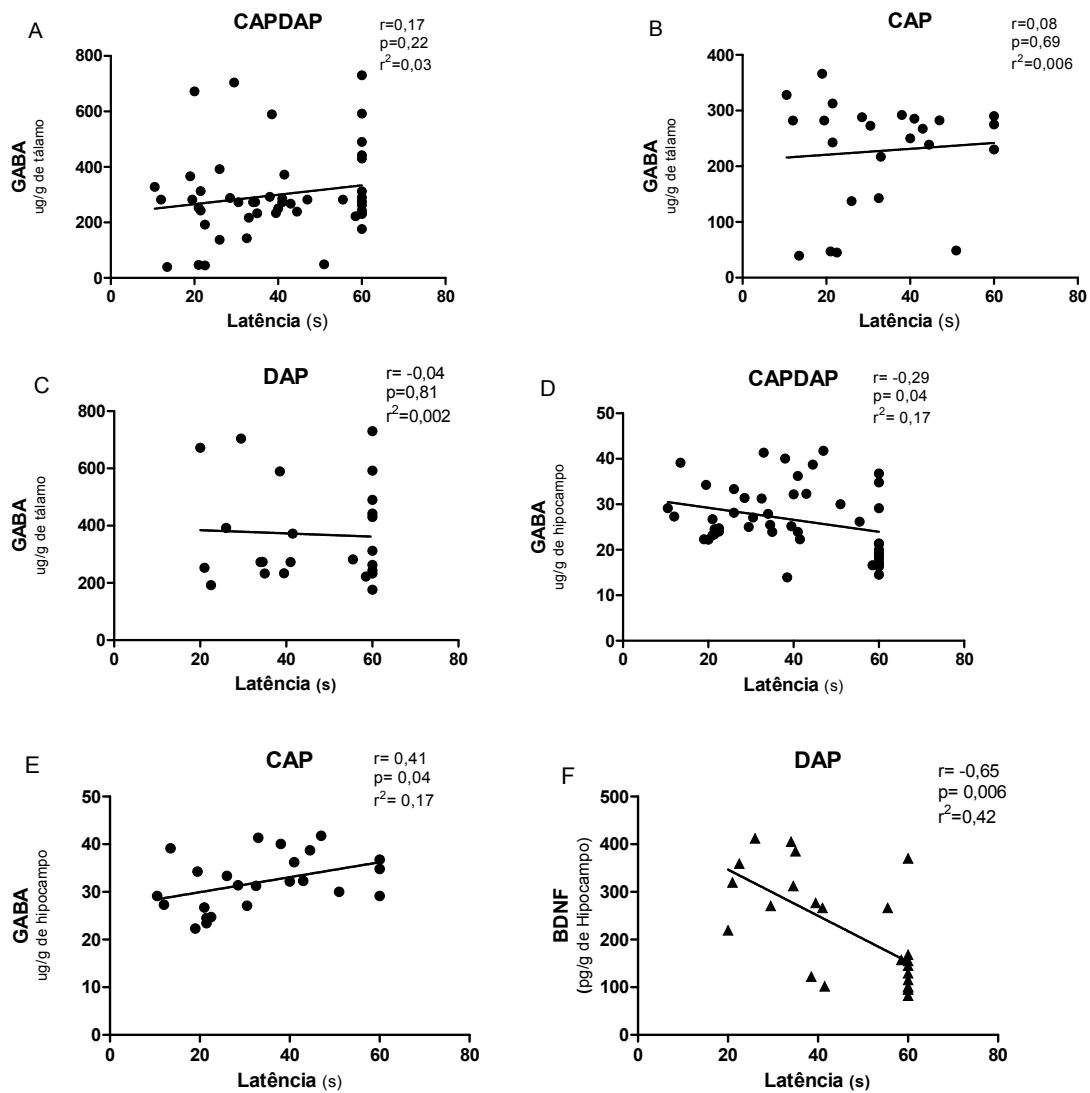


Figura 2: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de GABA no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

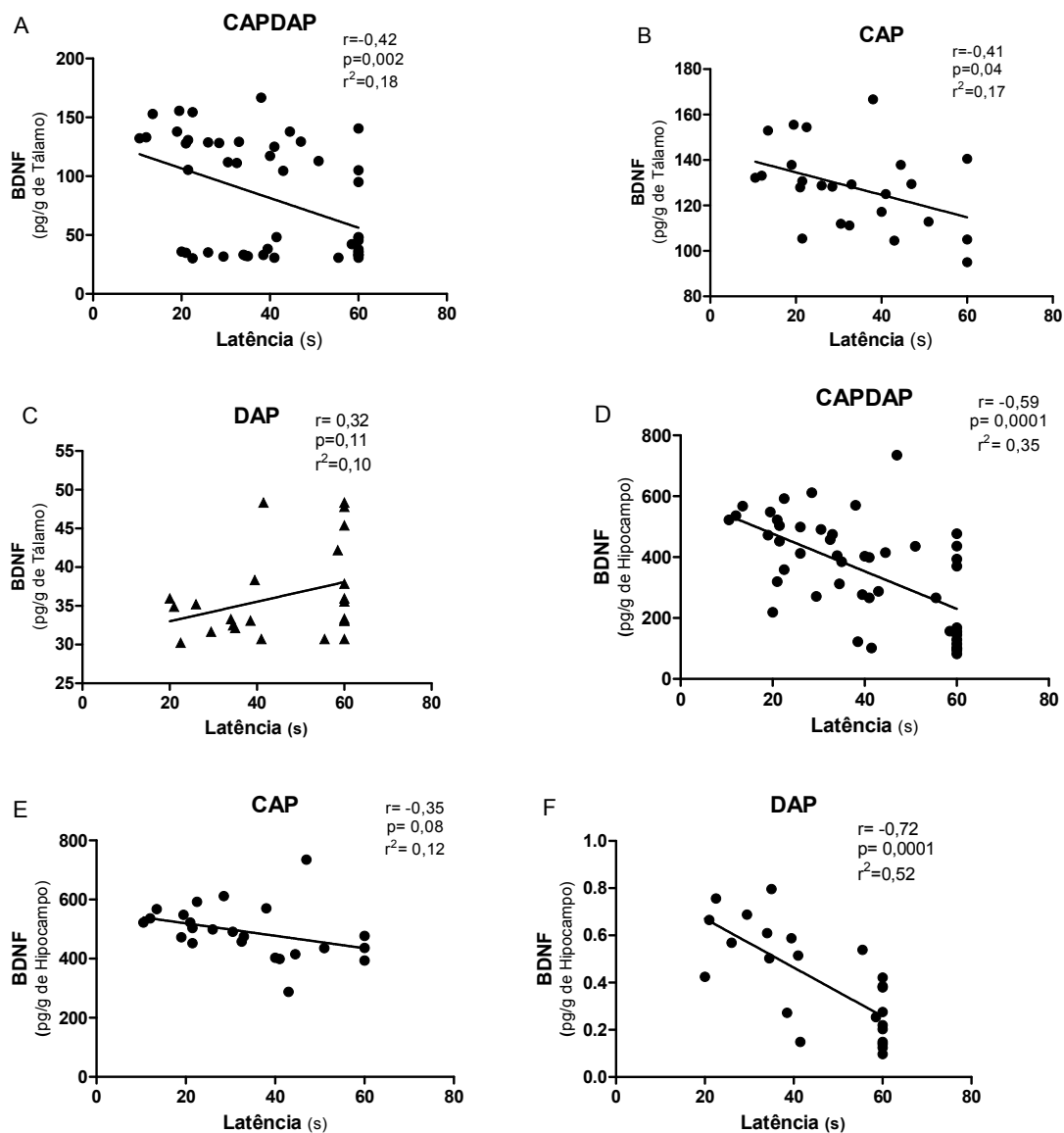
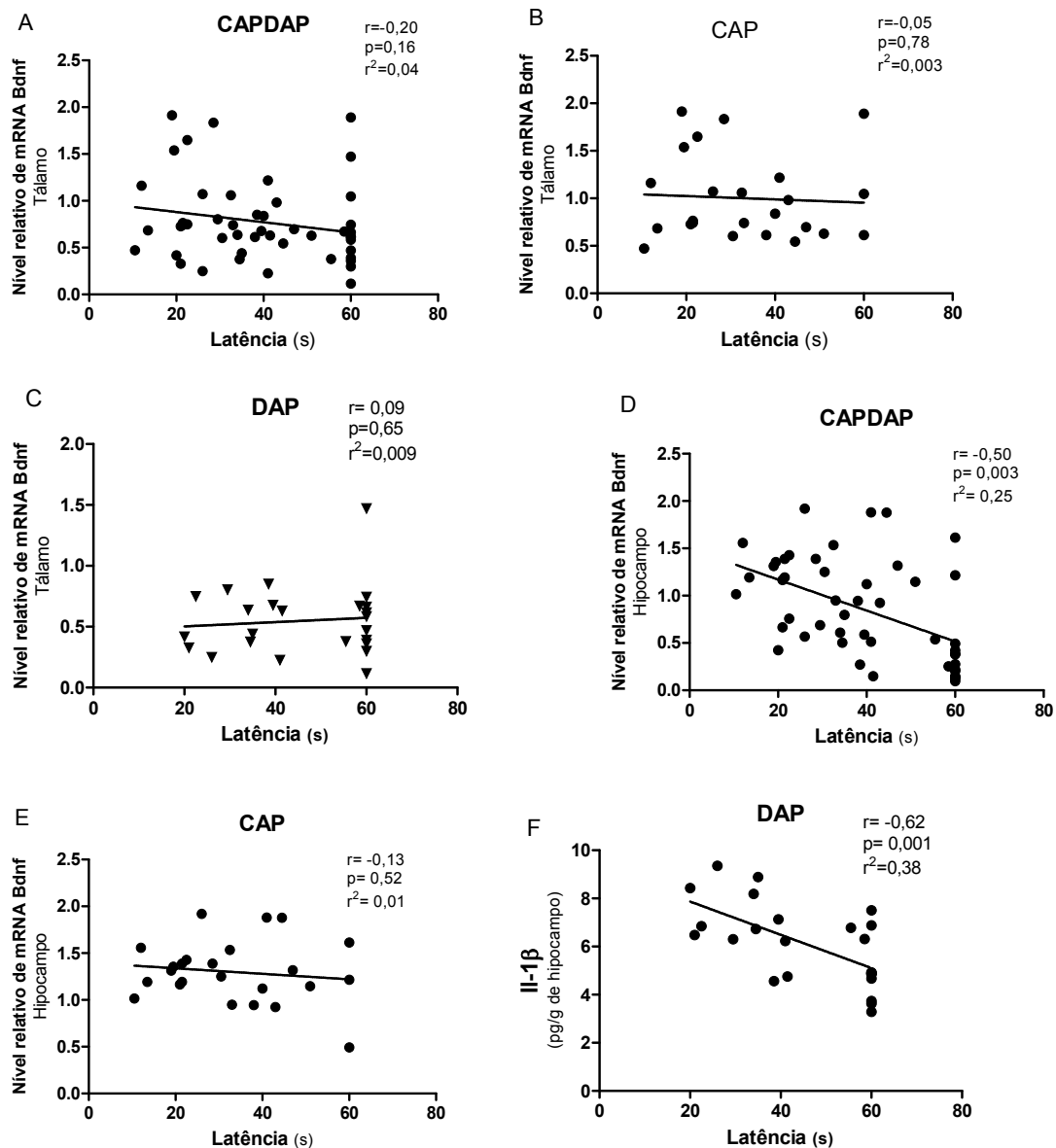
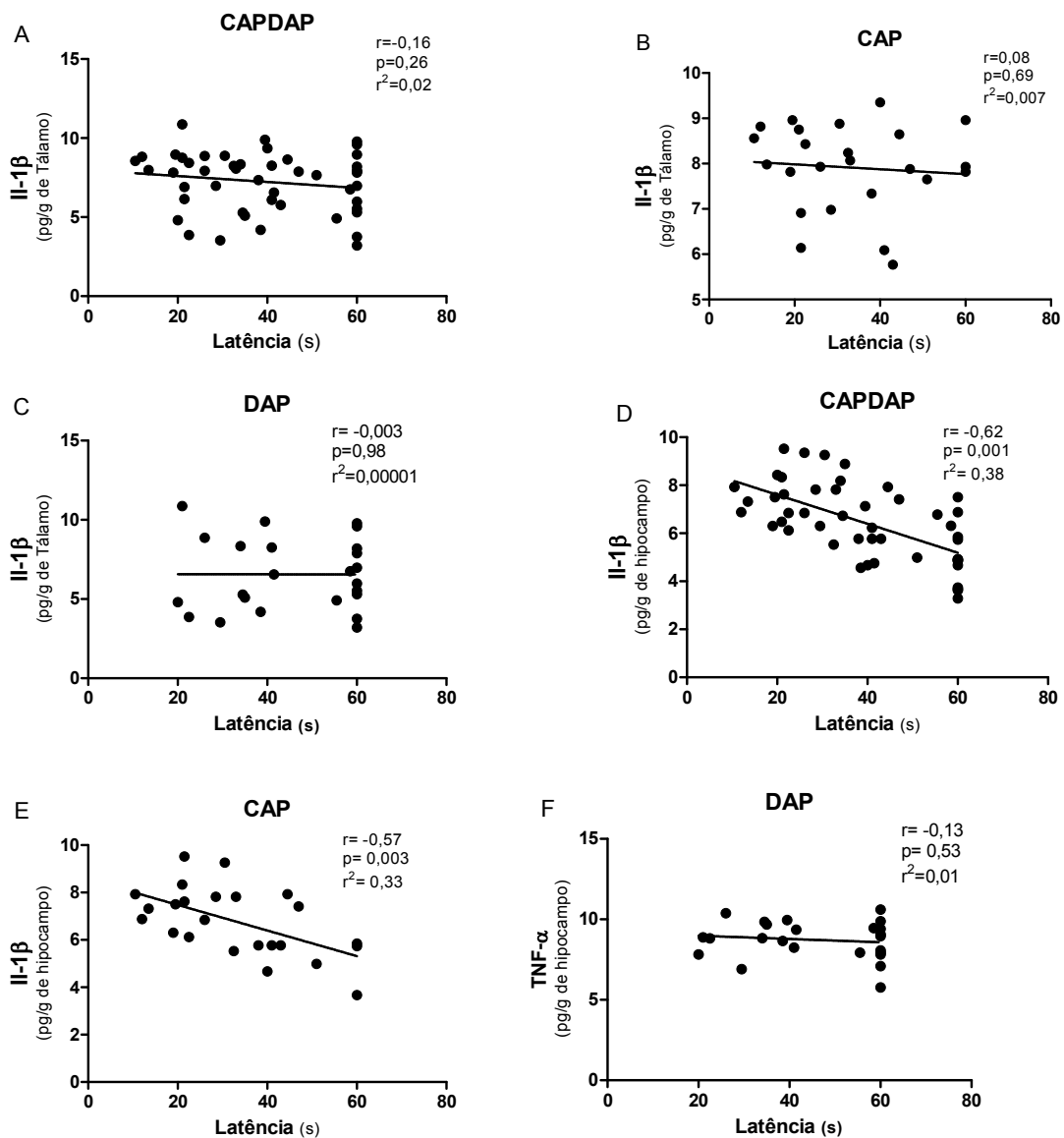


Figura 3: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).



**Figura 4:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis relativos de RNAm de Bdnf no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).



**Figura 5:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de IL-1 $\beta$  no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

## Grupo CAPDAP : Desempenho X TNF-a

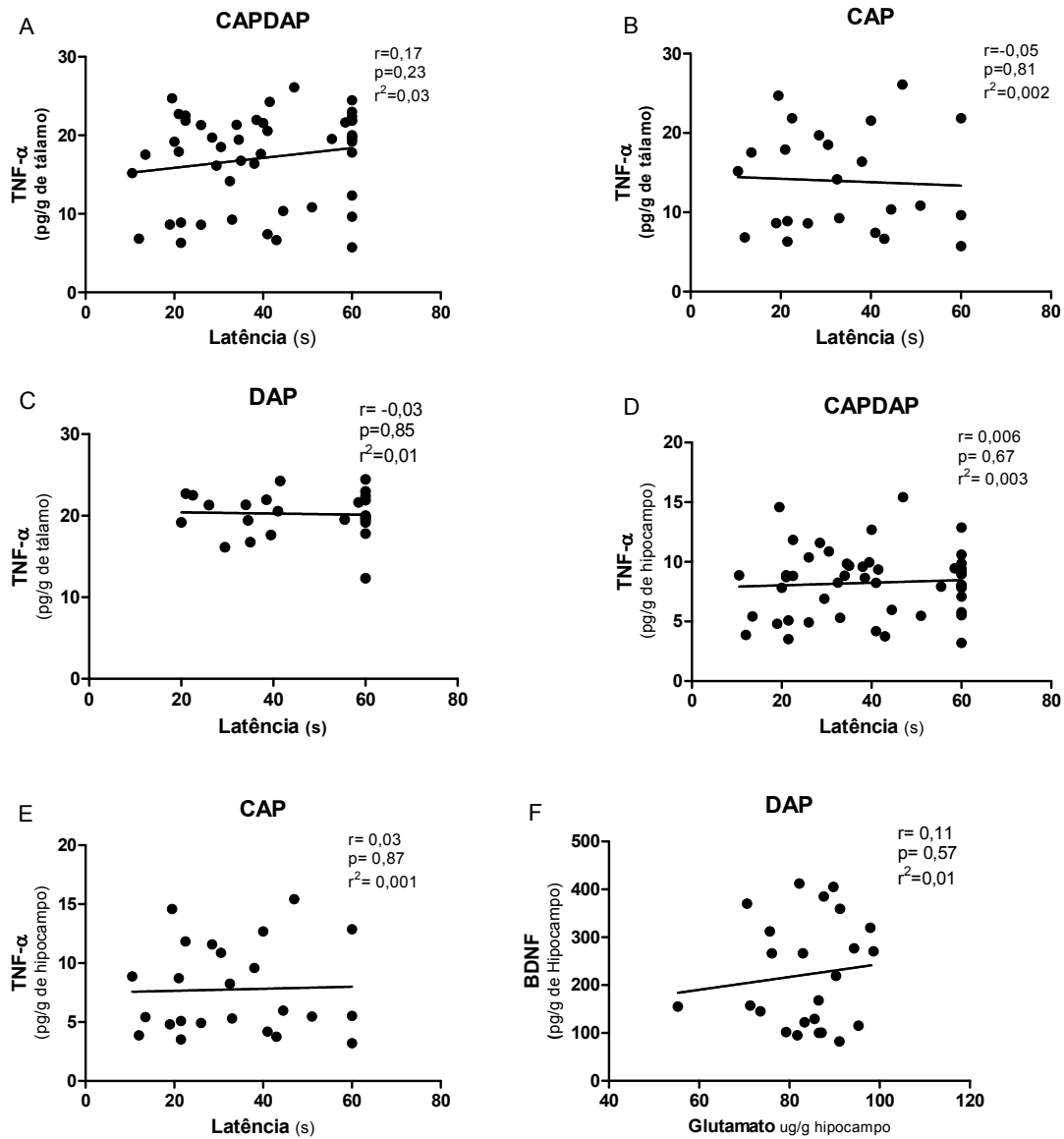
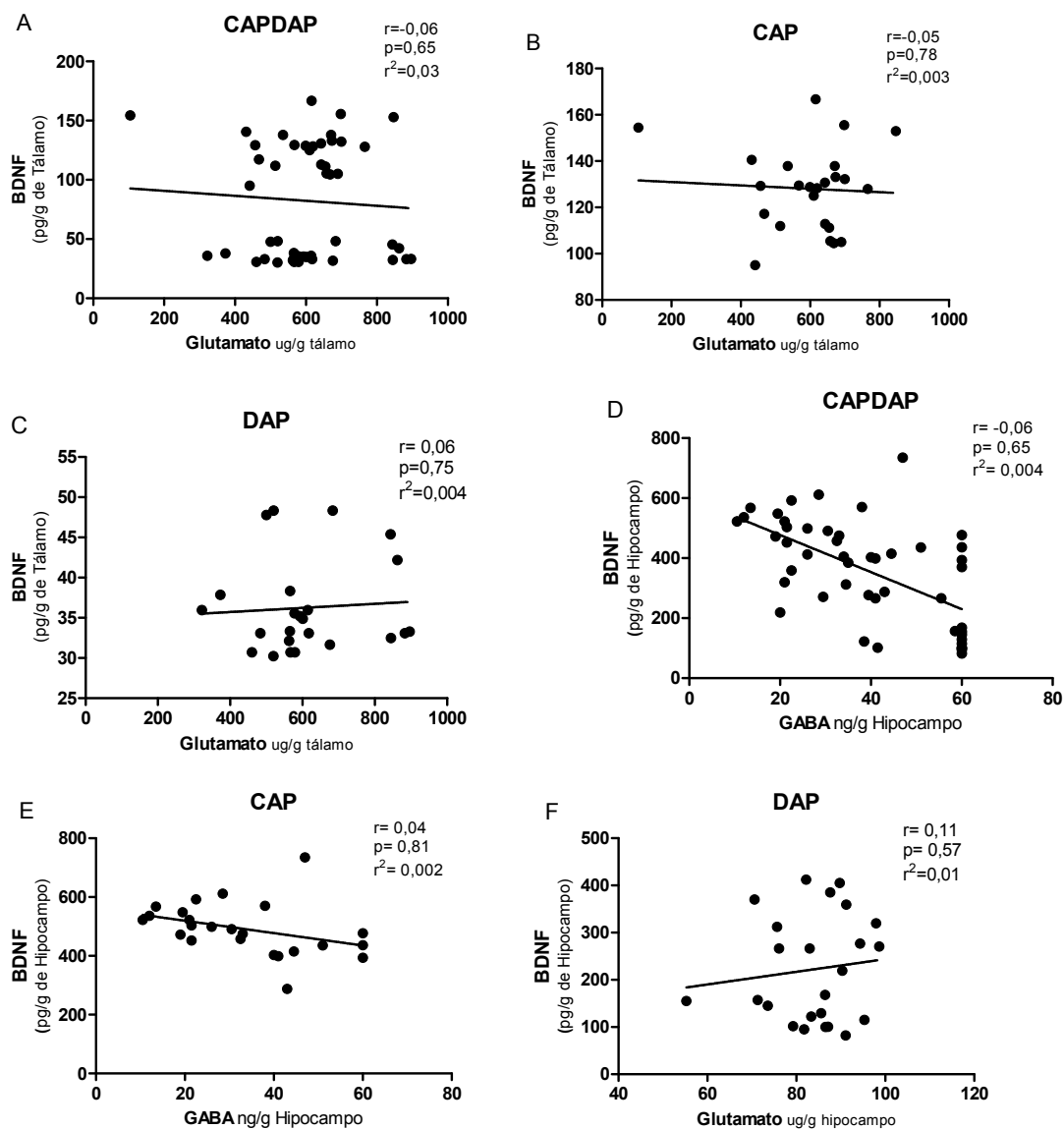
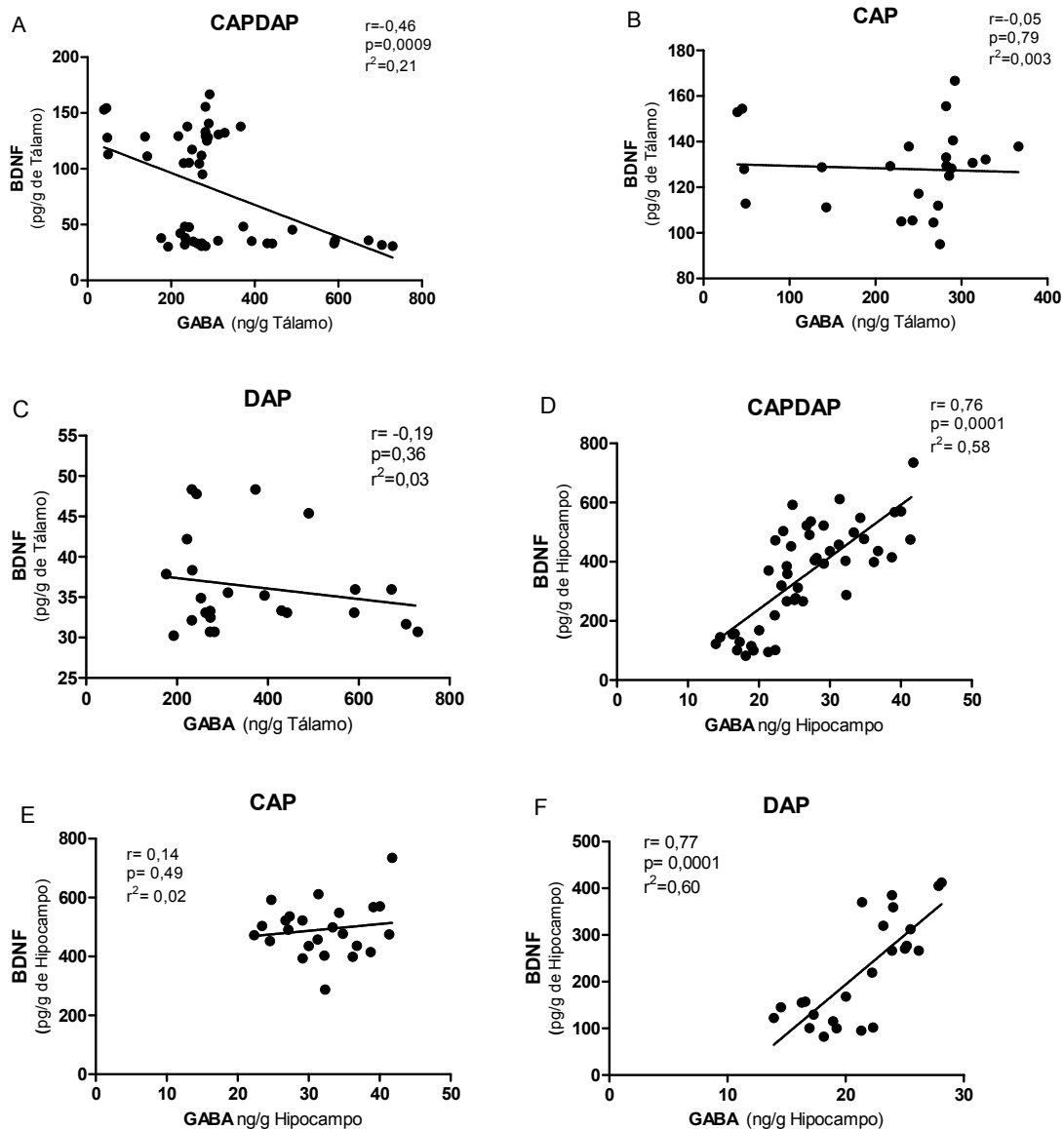


Figura 6: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de TNF- $\alpha$  no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

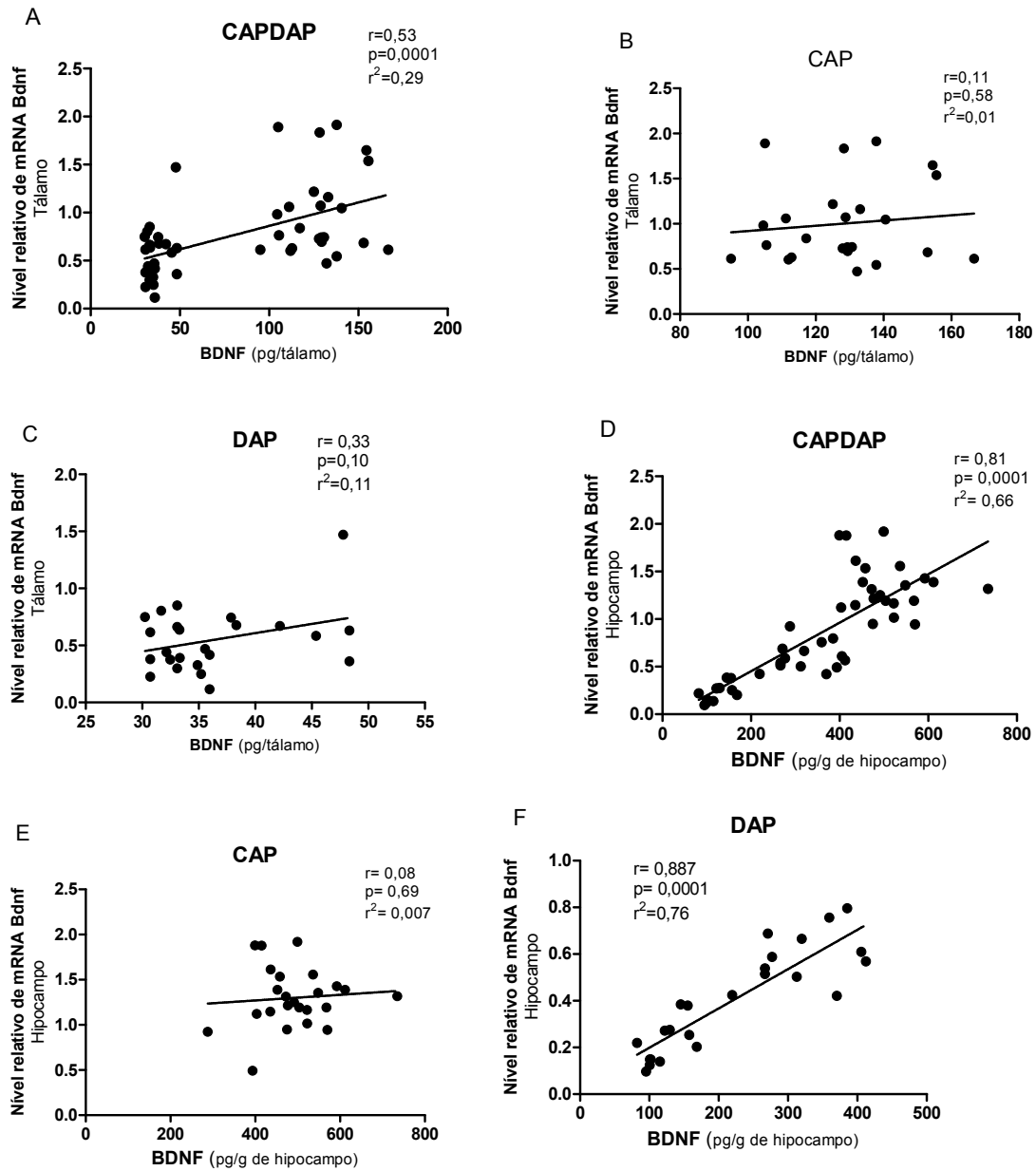




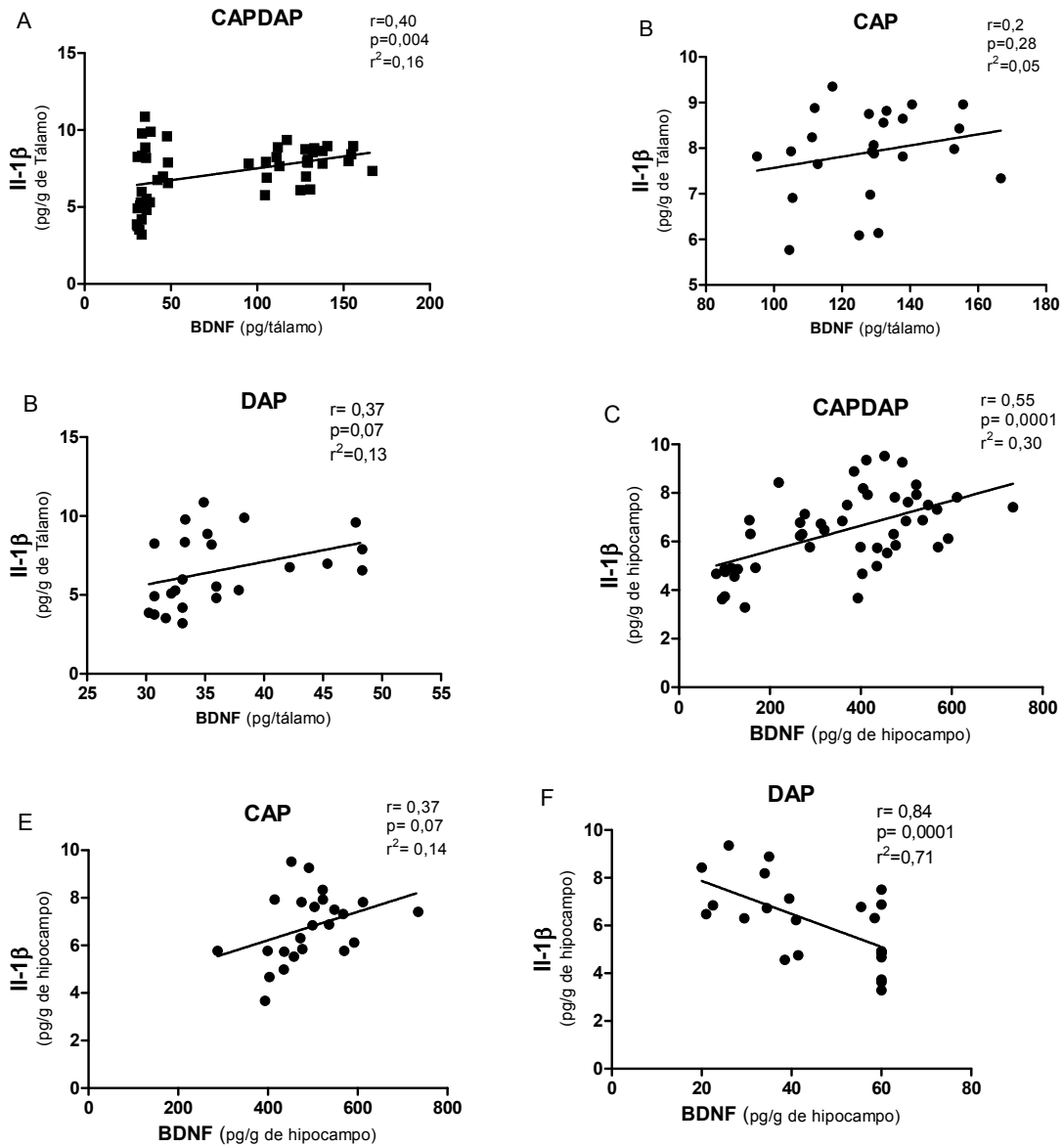
**Figura 7:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de BDNF e de glutamato no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).



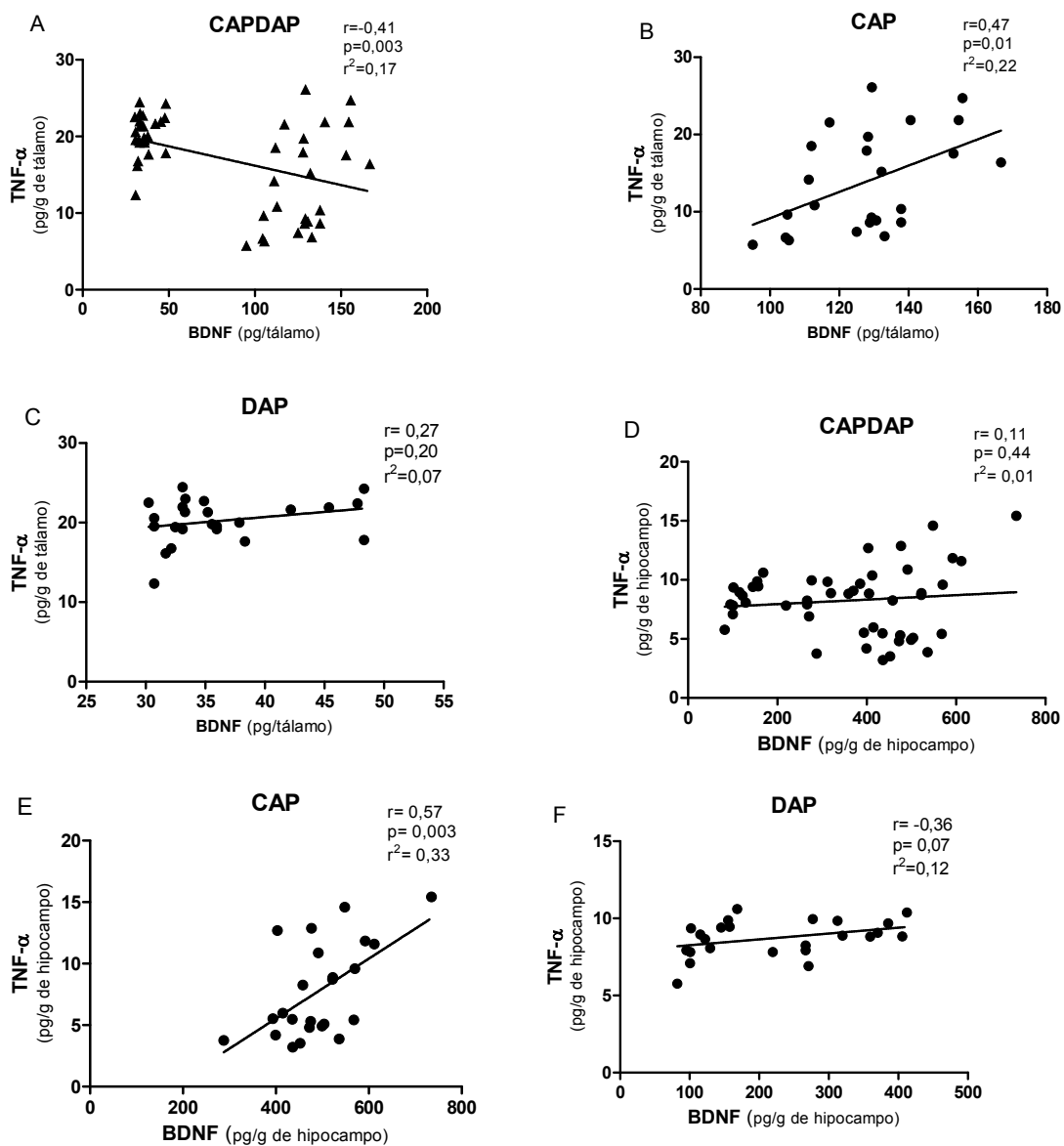
**Figura 8:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o desempenho e os níveis de glutamato no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).



**Figura 9:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre o nível relativo de RNAm de Bdnf e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p<0,05$  e  $r^2>0,19$  (n=48) ou  $r^2>0,25$  (n=24).



**Figura 10:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de IL-1 $\beta$  e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).



**Figura 11:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CAPDAP (n=48) (painéis A e D); CAP (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

### 9.3 Gráficos de dispersão das correlações verificadas nos grupos CATDAT, CAT e DAT.

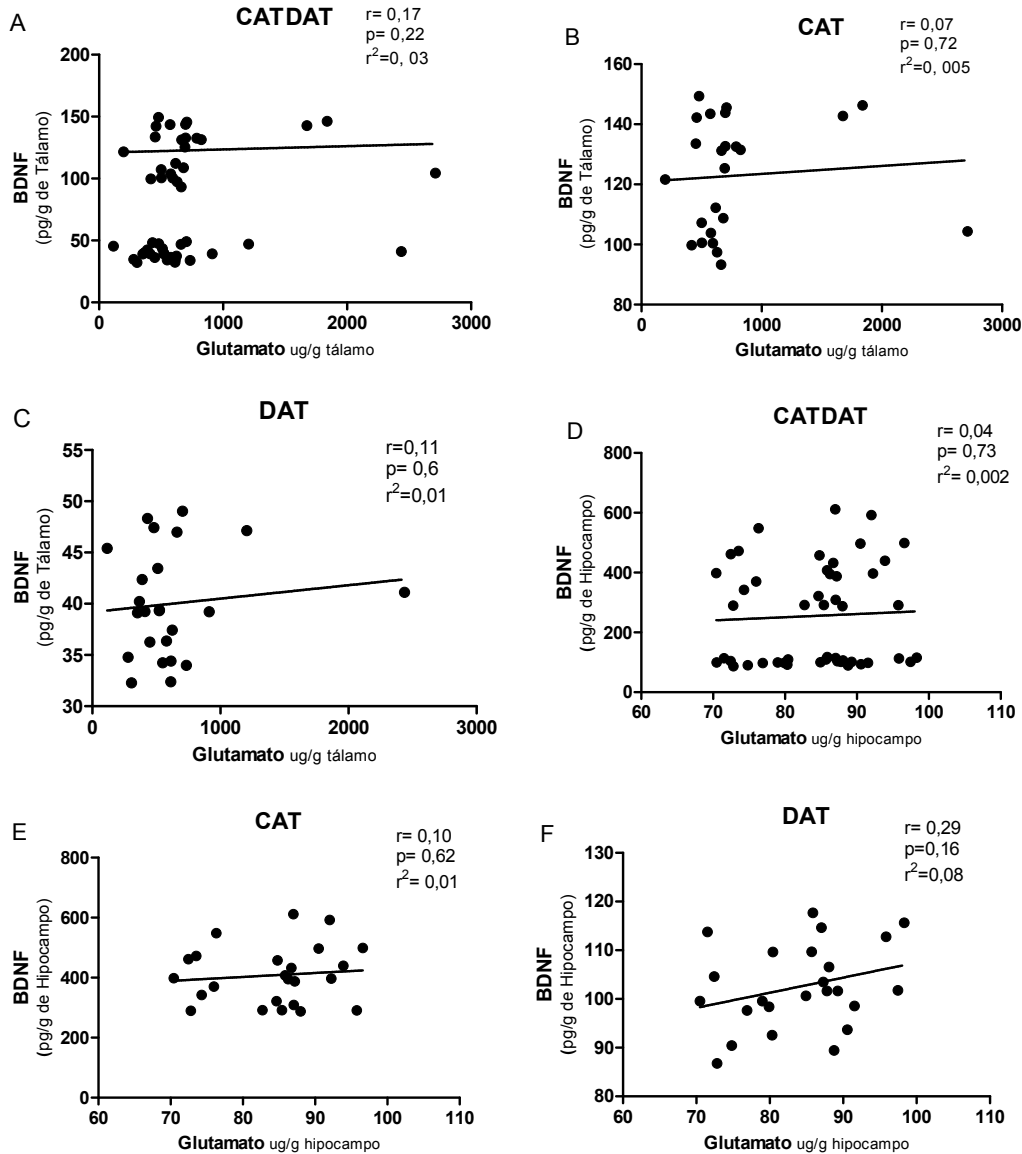
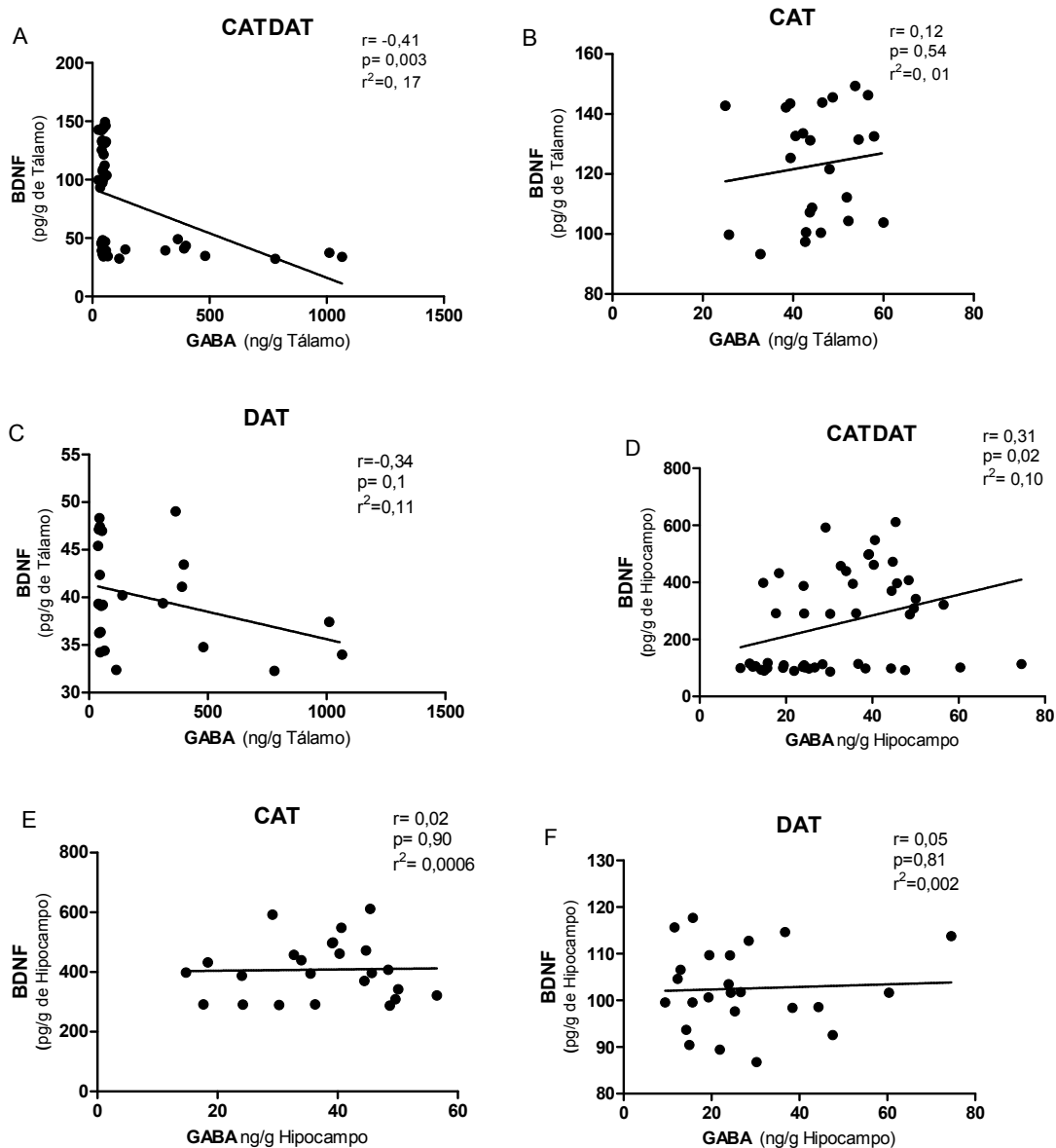
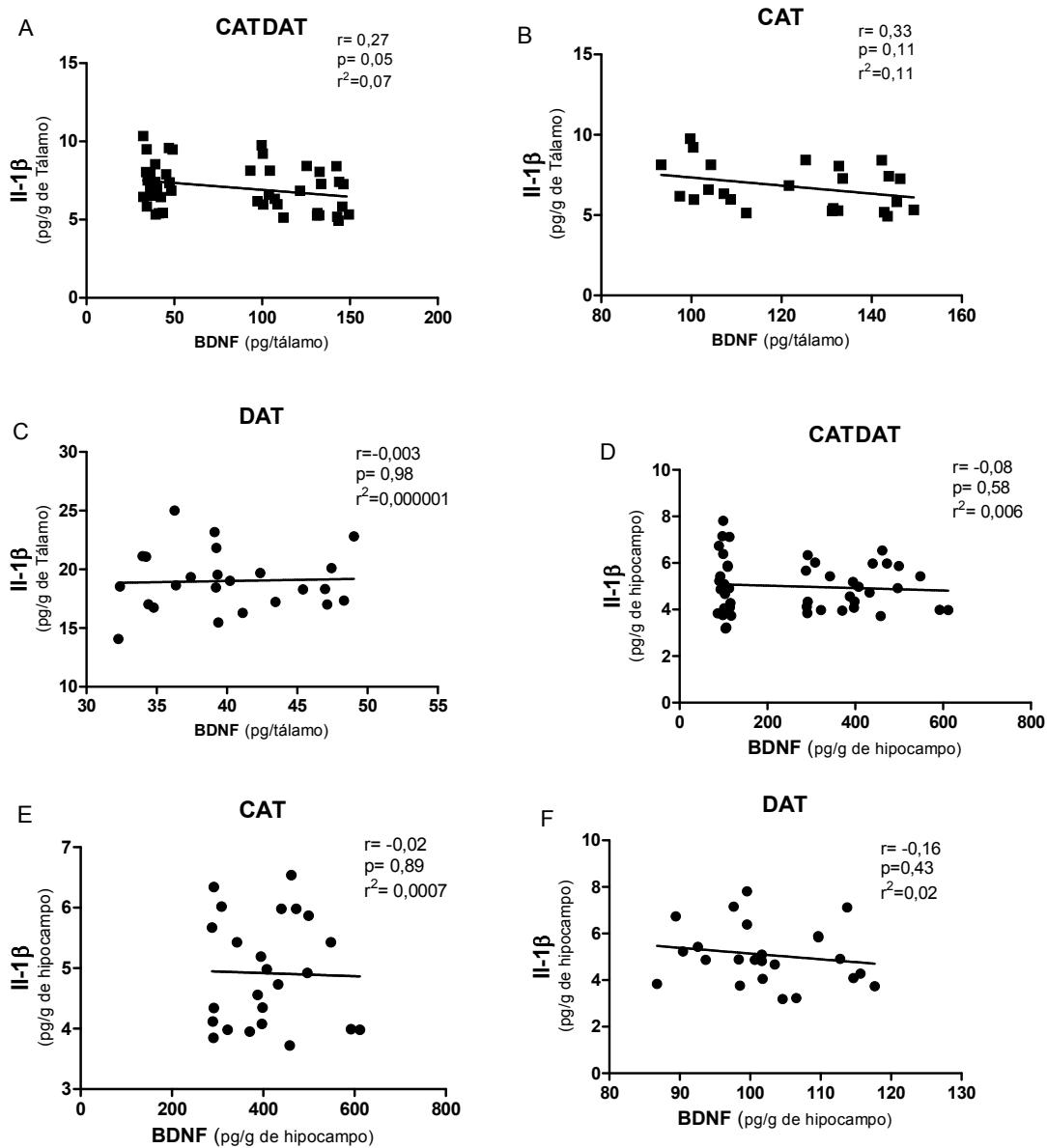


Figura 12: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de glutamato e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CATDAT (n=48) (painéis A e D); CAT (n=24) (painéis B e E) e DAT (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

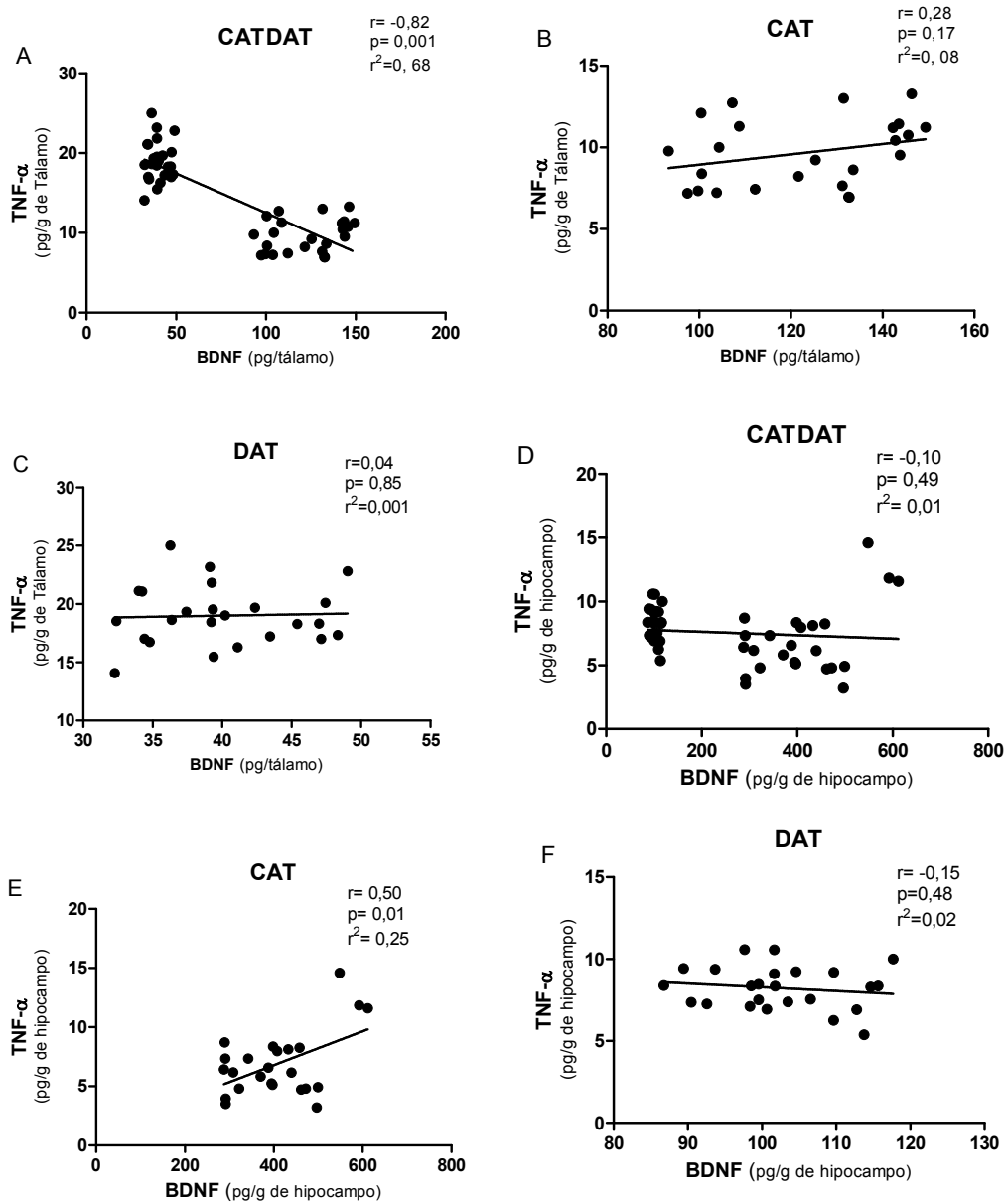


**Figura 13:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de GABA e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CATDAT (n=48) (painéis A e D); CAT (n=24) (painéis B e E) e DAT (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).



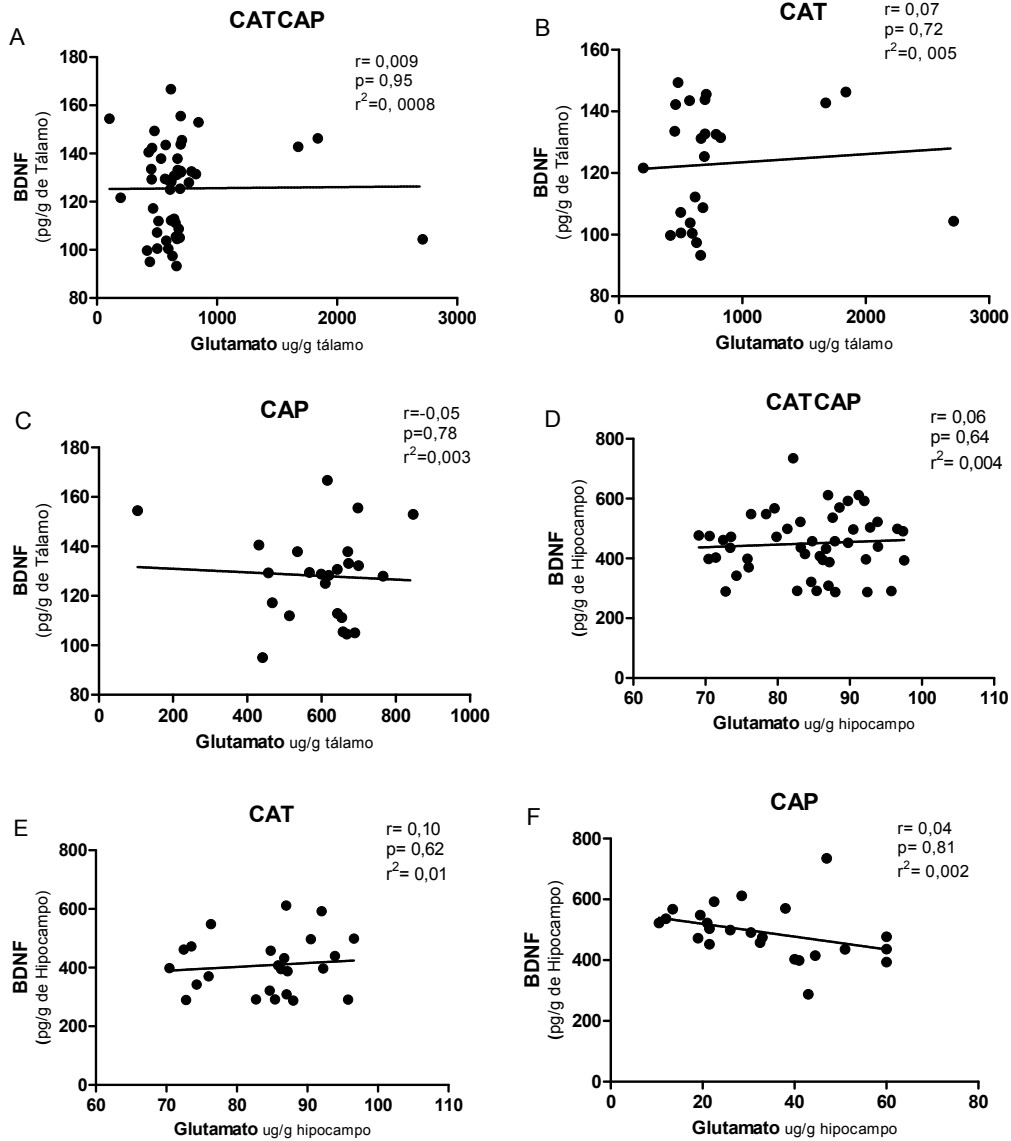
**Figura 14:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de IL-1 $\beta$  e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CATDAT (n=48) (painéis A e D); CAT (n=24) (painéis B e E) e DAT (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).



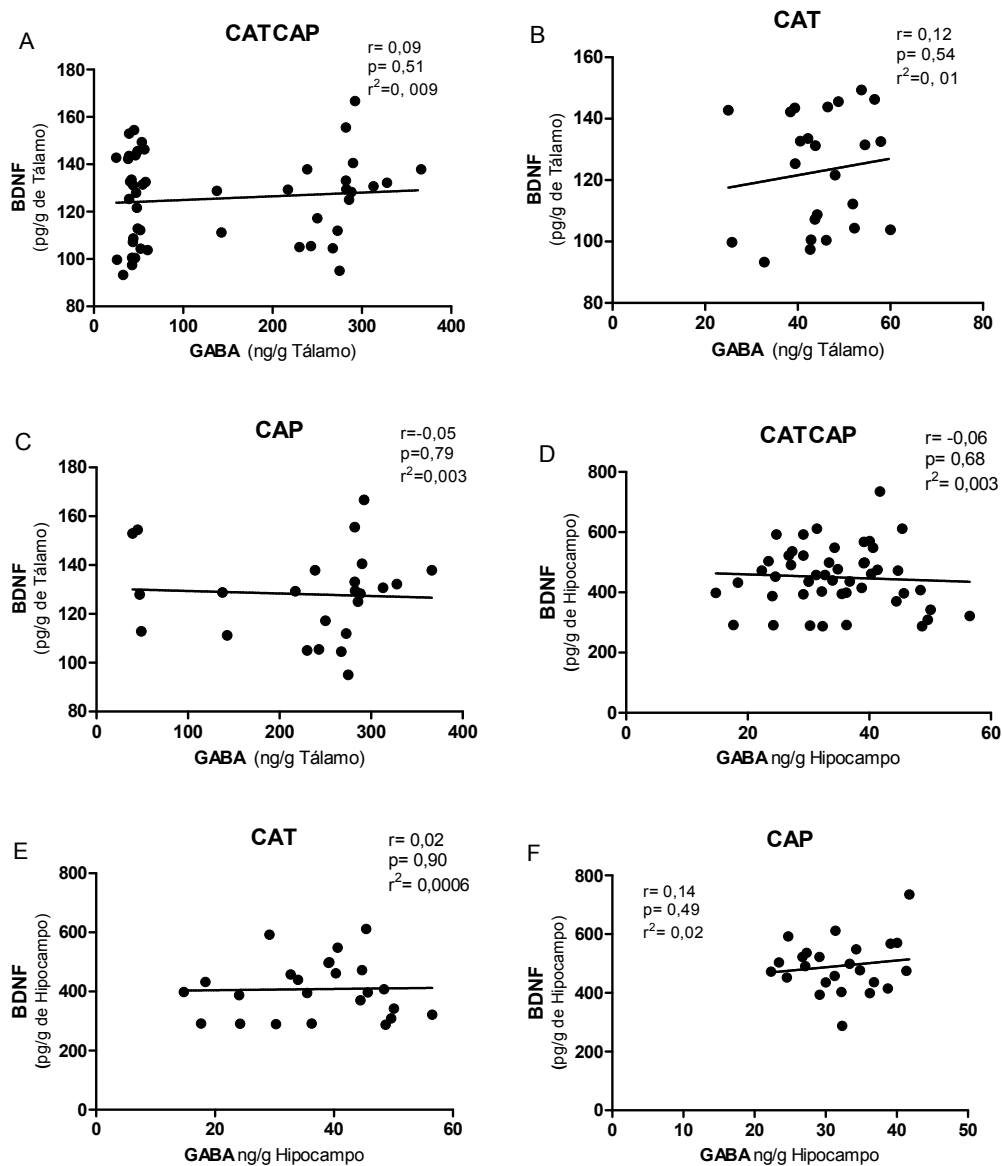


**Figura 15:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CATDAT (n=48) (painéis A e D); CAT (n=24) (painéis B e E) e DAT (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

**9.4 Gráficos de dispersão das correlações verificadas nos grupos CATCAP, CAT e CAP.**



**Figura 16:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de glutamato e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CATCAP (n=48) (painéis A e D); CAT (n=24) (painéis B e E) e CAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).



**Figura 17:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de GABA e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CATCAP (n=48) (painéis A e D); CAT (n=24) (painéis B e E) e CAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

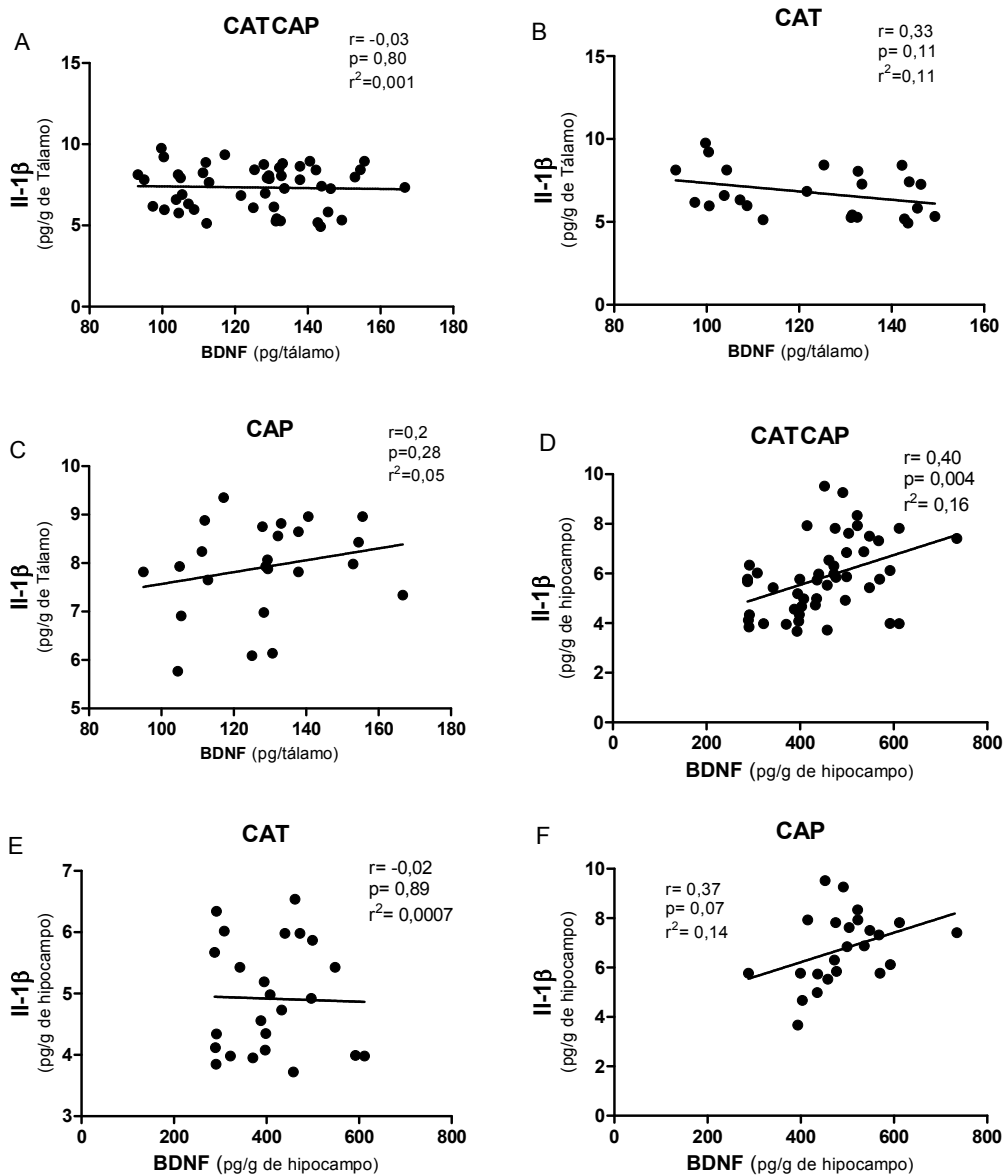
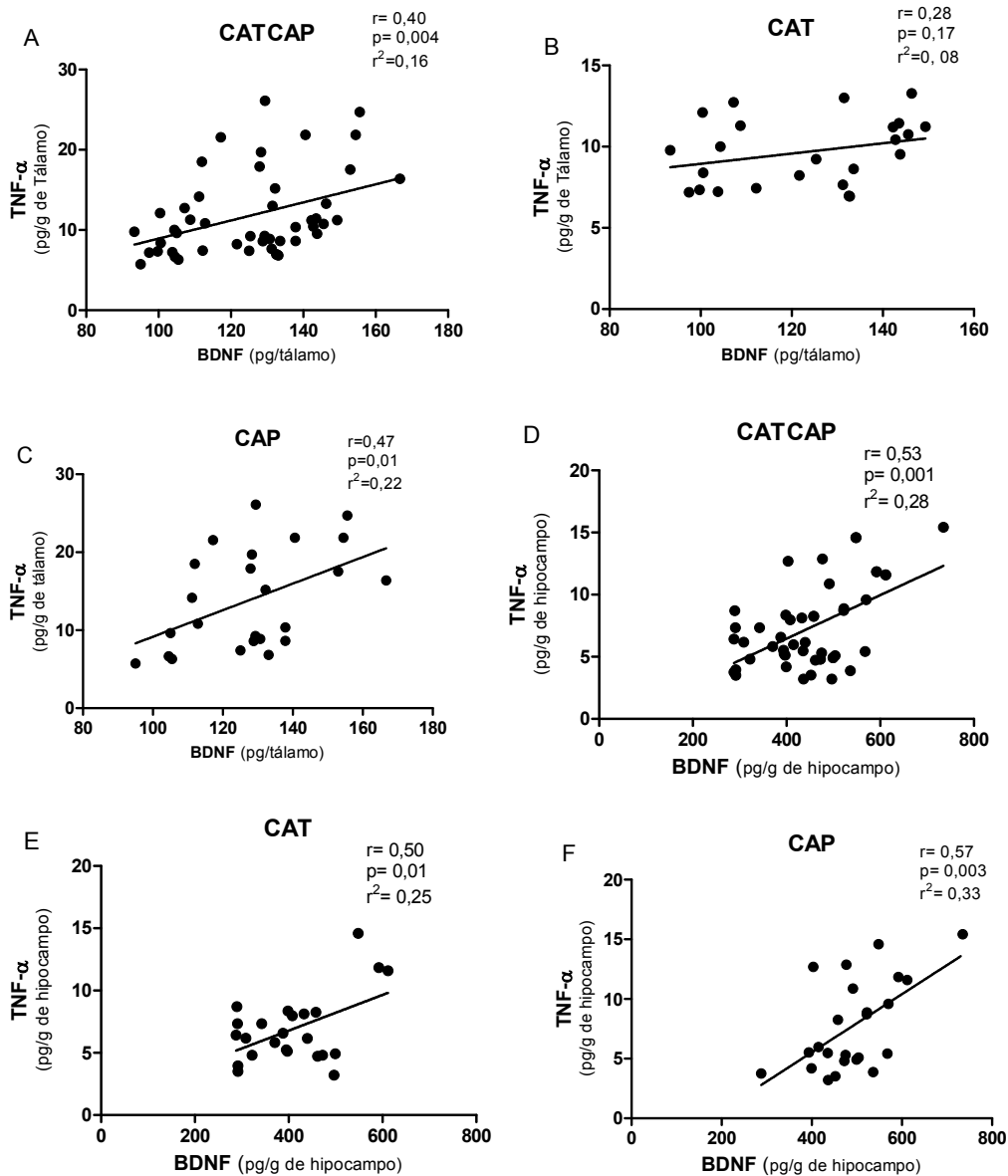
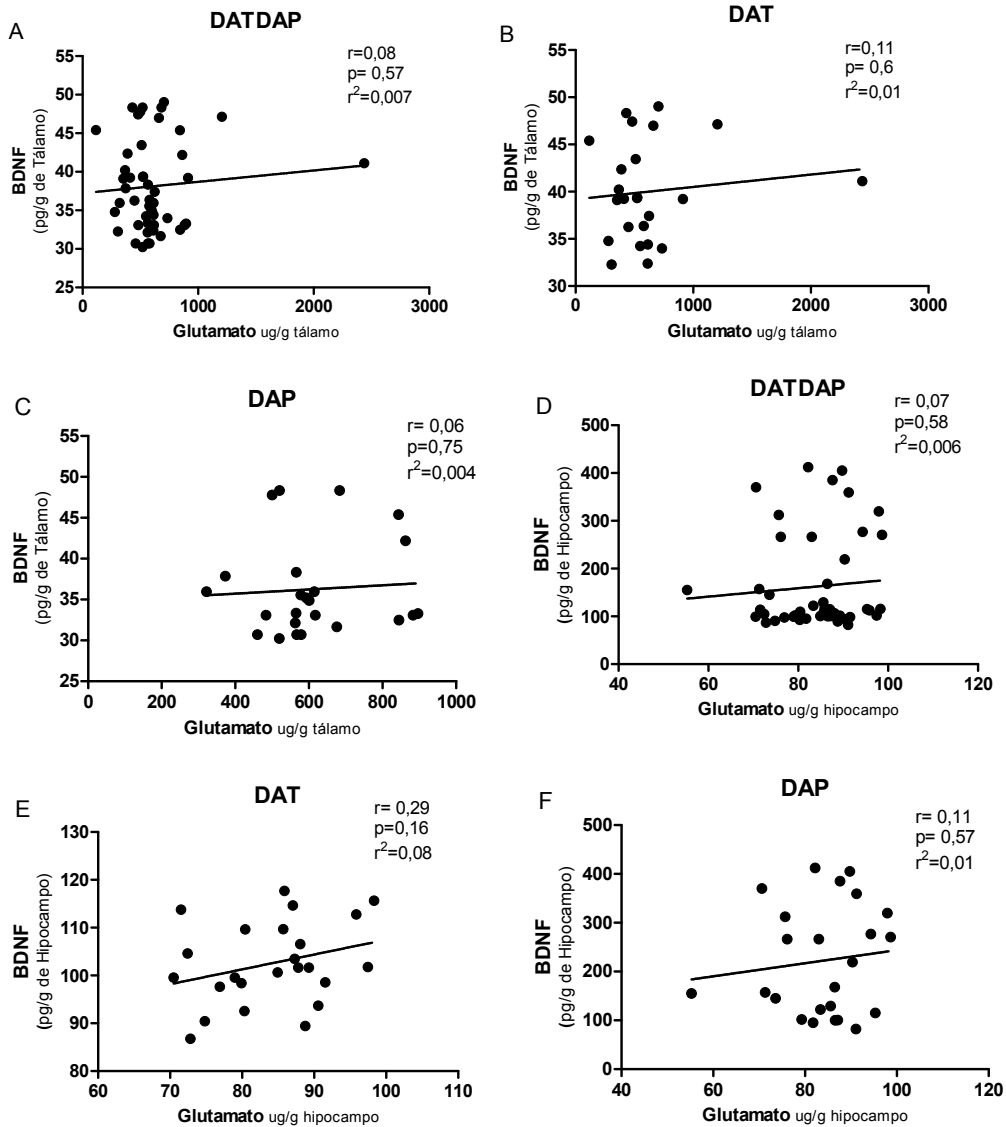


Figura 18: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de IL-1 $\beta$  e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CATCAP (n=48) (painéis A e D); CAT (n=24) (painéis B e E) e CAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

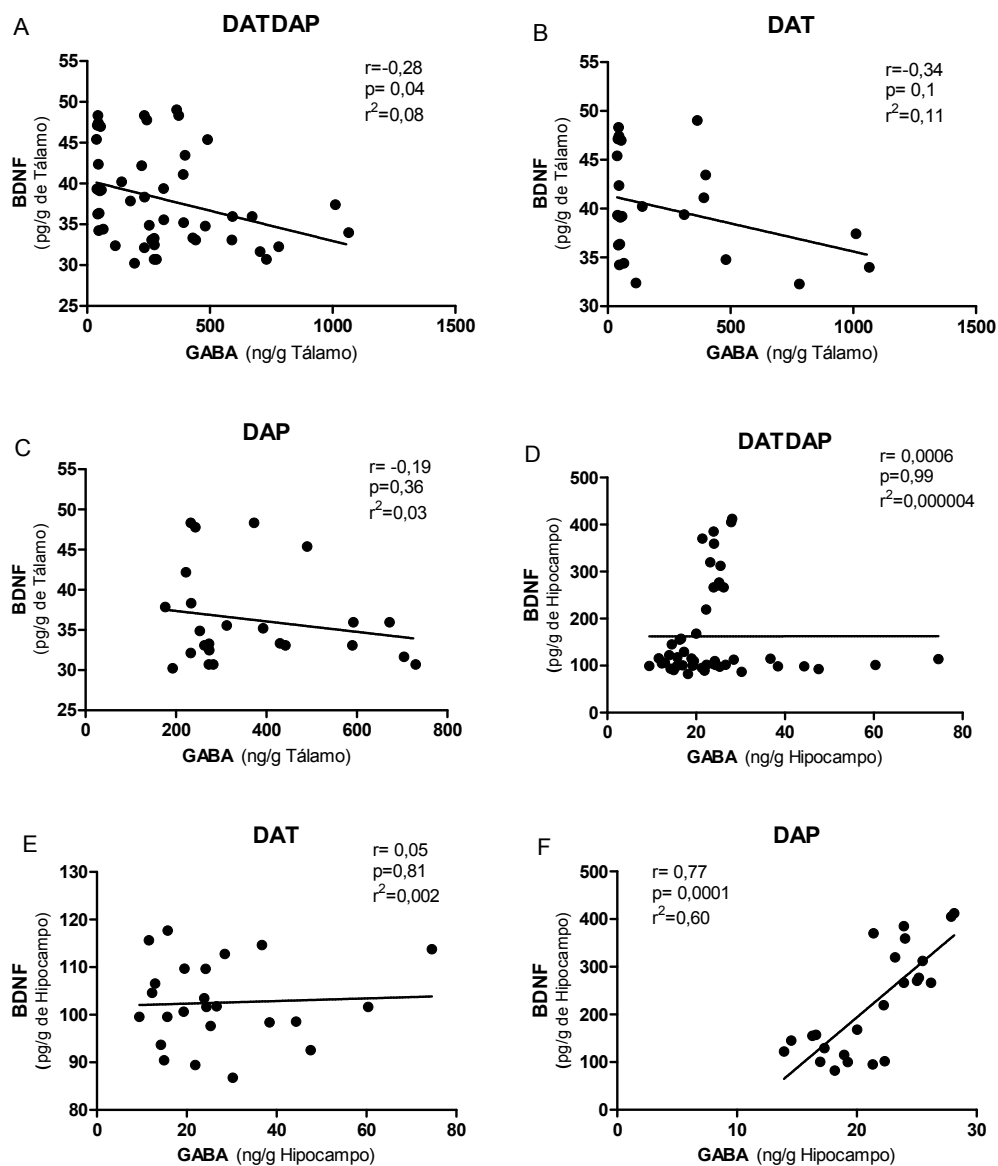


**Figura 19:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos CATCAP (n=48) (painéis A e D); CAT (n=24) (painéis B e E) e CAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

**9.5 Gráficos de dispersão das correlações verificadas nos grupos DATDAP, DAT e DAP.**



**Figura 20: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de glutamato e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos DATDAP (n=48) (painéis A e D); DAT (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p<0,05$  e o  $r^2>0,19$  (n=48) ou  $r^2>0,25$  (n=24).**



**Figura 21:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de GABA e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos DATDAP (n=48) (painéis A e D); DAT (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).

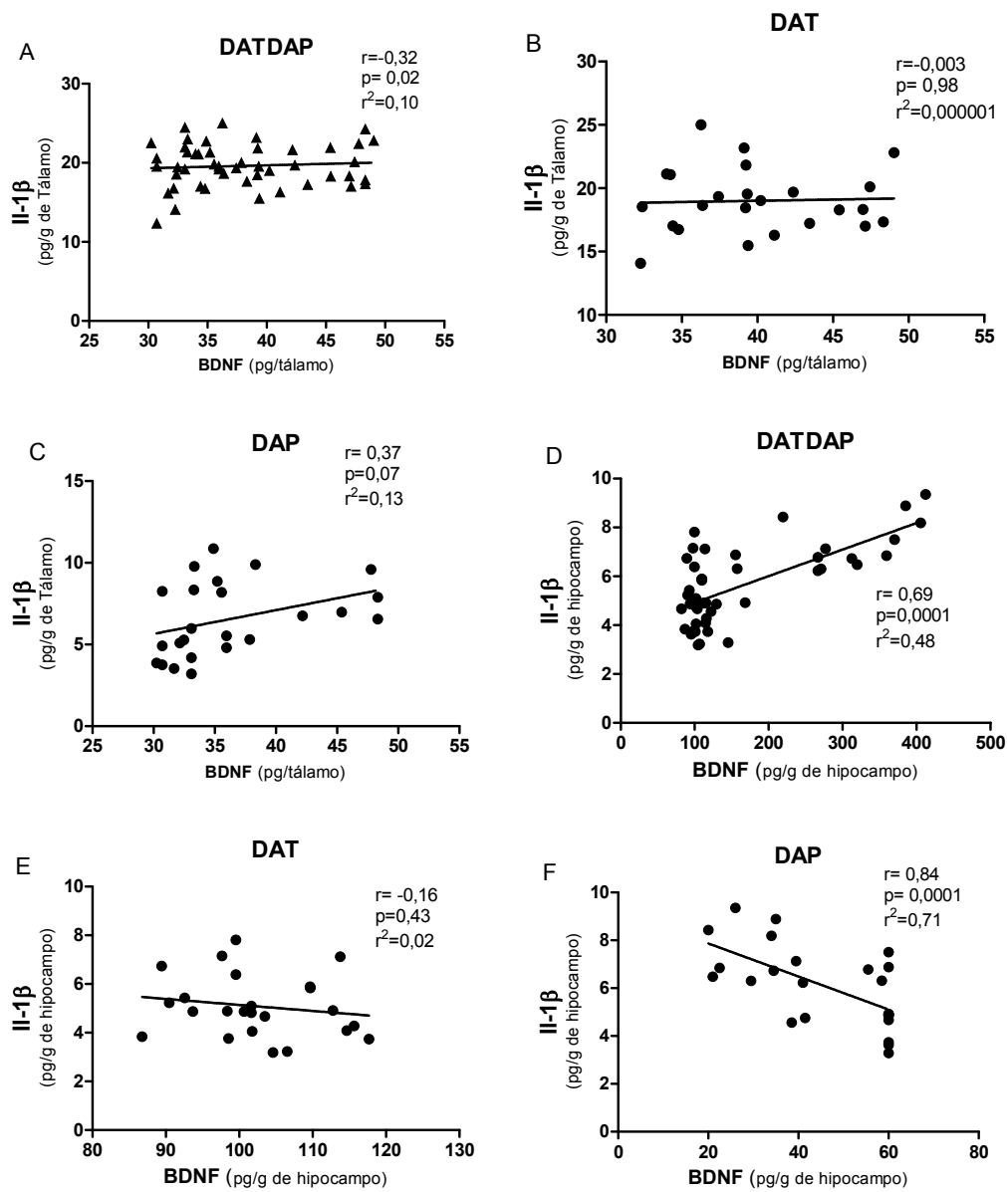
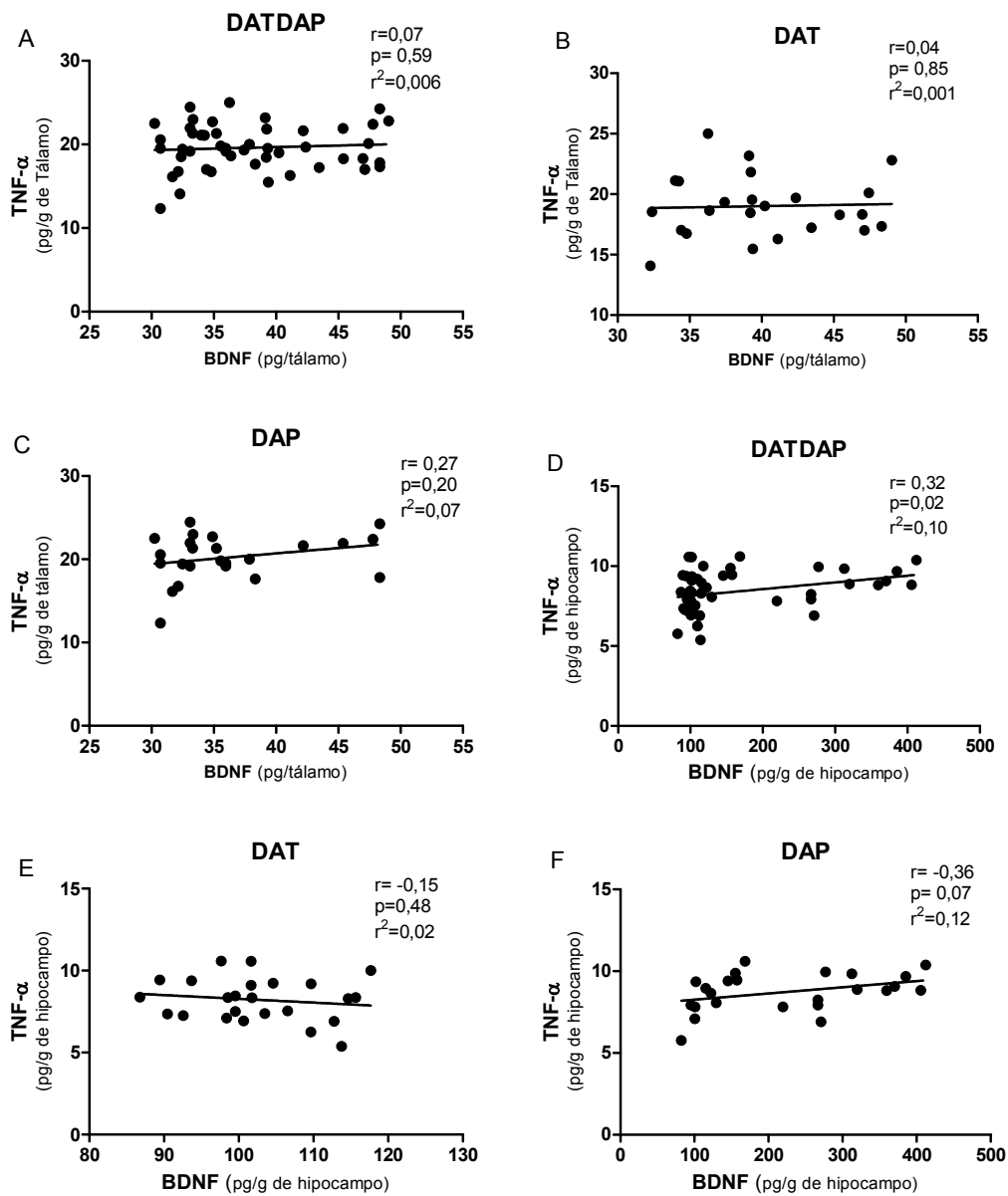


Figura 22: Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de IL-1 $\beta$  e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos DATDAP (n=48) (painéis A e D); DAT (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p < 0,05$  e o  $r^2 > 0,19$  (n=48) ou  $r^2 > 0,25$  (n=24).





**Figura 23:** Gráficos de dispersão das correlações verificadas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e os níveis de BDNF no tálamo (painéis A, C e E a esquerda) e hipocampo (painéis B, D e F a direita). Grupos DATDAP (n=48) (painéis A e D); DAT (n=24) (painéis B e E) e DAP (n=24) (Painéis C e F). Critérios de significância:  $p<0,05$  e o  $r^2>0,19$  (n=48) ou  $r^2>0,25$  (n=24).

