

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-graduação em Neurociências

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS
DECORRENTES DE UM EPISÓDIO DE RESTRIÇÃO DE TIAMINA ATRAVÉS DO
MÉTODO DE MODELAGEM AUTORREGRESSIVA.**

Ariomester Nascimento Daniel

Belo Horizonte

2013

Ariomester Nascimento Daniel

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS
DECORRENTES DE UM EPISÓDIO DE RESTRIÇÃO DE TIAMINA ATRAVÉS DO
MÉTODO DE MODELAGEM AUTORREGRESSIVA.**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador(a): Profa. Dra. Angela Maria
Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Ronald Dickman

Belo Horizonte

2013

- 043 Daniel, Ariomester Nascimento.
Avaliação de alterações metabólicas e comportamentais decorrentes de um episódio de restrição de tiamina através do método de modelagem autorregressiva [manuscrito] / Ariomester Nascimento Daniel. – 2013.
105 f.: il. ; 29,5 cm.
- Orientador(a): Profa. Dra. Angela Maria Ribeiro. Co-Orientador: Prof. Dr. Ronald Dickman.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Neurociências.
1. Neurociências. 2. Tiamina. 3. Serotoninérgicos. I. Ribeiro, Angela Maria. II. Dickman, Ronald. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO ARIOMESTER NASCIMENTO DANIEL

Realizou-se, no dia 13 de dezembro de 2013, às 09:00 horas, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 71ª defesa de dissertação, intitulada *RESTRIÇÃO MODERADA DE TIAMINA EM RATOS WISTAR ALTERA PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, SEROTONÉRGICOS CENTRAIS E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS FRENTE A ESTÍMULOS AVERSIVOS*, apresentada por ARIOMESTER NASCIMENTO DANIEL, número de registro 2012658665, graduado no curso de PSICOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Angela Maria Ribeiro - Orientador (UFMG), Prof(a). Cristiano Mauro Assis Gomes (UFMG), Prof(a). Fabrício de Araujo Moreira (UFMG), Prof(a). Ronald Dickman (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

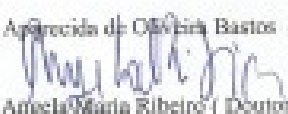
☒ Aprovada

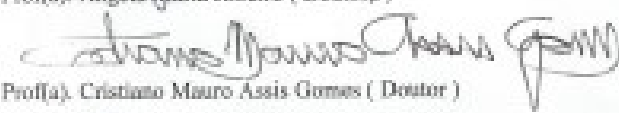
☐ Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2013.

Vanessa Aparecida de Oliveira Bastos - Secretário(a)


Prof(a). Angela Maria Ribeiro (Doutor)


Prof(a). Cristiano Mauro Assis Gomes (Doutor)


Prof(a). Fabrício de Araujo Moreira (Doutor)


Prof(a). Ronald Dickman (Doutor)

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colegas de laboratório (LaNeC – Laboratório de Neurociência Molecular e Comportamental – UFMG) por todo o auxílio na elaboração e execução deste trabalho. Em especial agradecemos à Profa. Silvia Rejane Castanheira Pereira (*in memoriam*), à doutoranda Patrícia da Silva Oliveira, à Doutora Andrea Fronzino Ribeiro e à então mestranda Ana Raquel Pereira Caixeta, pela imensa ajuda na elaboração, execução e discussão dos resultados deste trabalho. Agradecemos ao Prof. Carlos Julio Tierra Criollo (UFRJ) pelo apoio na elaboração do projeto que deu origem ao presente trabalho. Agradecemos à técnica Aparecida Guerra pelo inestimável apoio na execução deste trabalho.

Em particular, agradeço ao Programa de Pós Graduação em Neurociências por ter apoiado este trabalho e à Profa. Dra. Angela Maria Ribeiro pela orientação e excelentes considerações científicas e sociais. Ao Prof. Dr. Ronald Dickman pelas ótimas considerações científicas e interesse em ajudar no projeto que deu origem a este trabalho.

Finalmente e mais importante, agradeço à minha família pelos bons exemplos e companhia ao longo dos anos. Em especial ao meu pai, Prof. MSc. José Pereira Daniel, ao meu irmão Artênio Nascimento Daniel, sua companheira Andreza Ferreira Félix e principalmente à minha companheira Daniela Santos Malacco Soares, que tem me acompanhado ao longo de muitos anos, dividindo sonhos, ideias, alegrias, soluções e realizações comigo; elementos fundamentais na concretização deste e outros trabalhos. Muito obrigado.

Ariomester Nascimento Daniel.

RESUMO:

A tiamina é uma vitamina do complexo B e a sua restrição crônica leva a quadros clínicos graves, como o beri-beri, Encefalopatia de Wernicke e a Síndrome de Wernecke-Korsakoff. O uso de modelos experimentais de restrição de tiamina é importante no entendimento das alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais decorrentes da deficiência dessa vitamina. Os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos em parâmetros comportamentais, fisiológicos e serotoninérgicos centrais da restrição dietária de tiamina em ratos Wistar adultos. Trinta e dois ratos foram submetidos ou não a um episódio de 7 semanas de restrição moderada de tiamina, sendo, portanto, divididos de acordo com o tratamento em dois grupos: deficientes (DT, dieta restrita de tiamina, n=16) e Controles (C, dieta padrão, n=16), respectivamente. Após este período, a dieta padrão foi reestabelecida. Todos os animais foram submetidos a uma manipulação controlada (MC) três dias antes e três dias após o episódio de DT. Após a 2ª MC todos os animais foram expostos à exploração de campo aberto (por 4 dias). Uma semana após os animais foram sacrificados e amostras de regiões do cérebro (tálamo-TAL, hipocampo-HIP, substância cinzenta periaquedutal- PAG: *Periaqueductal Gray* e córtex pré-frontal-CPF) foram processadas e analisadas via cromatografia líquida de alto desempenho para a determinação das concentrações de serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). ANOVA com medidas repetidas mostrou que os animais DT estavam, após 49 dias, em média 40% mais leves do que os C ($F_{(1,25)}=39,973$; $p=0,001$), ingerindo 35% menos água ($F_{(1,25)}=7,116$; $p=0,037$) e 70% menos ração ($F_{(1,25)}=113,115$; $p<0,001$). Comparando-se a estereotipia comportamental antes e após a deficiência observou-se para o grupo DT aumento de 36% na imobilidade (IMB, $z=-3,41$; $p=0,0006$), reduções de 33% na ambulação (AMB, $t=-3,36$; $p=0,0007$), 12% na exploração vertical (EXP, $t=-2,48$; $p=0,013$) e 17% na resistência à captura (LUTA, $t=2,4$; $p=0,029$). Para o grupo C essas comparações foram não significativas. Os animais do grupo DT percorreram menores distâncias durante a exploração de campo aberto nos 4 dias, sendo significativo nos dias 1 ($t=2,601$; $p=0,014$), 3 ($t=3,762$; $p=0,001$) e 4 ($t=2,641$; $p=0,013$). Não houve diferença entre os grupos em relação à [5-HT], porém foi observado aumento significativo na [5-HIAA] na PAG de ratos do grupo DT em relação ao C ($t=-3,61$; $p=0,002$). Análises de correlações entre as [5-HT] e [5-HIAA] para cada uma das quatro regiões cerebrais

dos animais dos grupos C e DT, mostraram a ocorrência de uma alteração induzida pela DT no padrão de associação entre essas duas variáveis apenas no HIP ($R=0,54$; $p=0,03$). Observou-se atividade serotoninérgica aumentada na PAG de ratos deficientes ($z=-3,36$, $p<0,001$) e reduzida no CPF ($t=3,76$, $p=0,002$), avaliada a partir da taxa de renovação $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$. Também foram observadas correlações significativas entre a atividade serotoninérgica para o grupo C (HIP-TAL: $R=0,53$, $p=0,036$; HIP-CPF: $R=0,82$, $p=0,0001$), mas não para o grupo DT, onde as relações foram não significativas. As correlações de maior força observadas entre a taxa de renovação e os comportamentos mensurados na MC foram: grupo DT: IMB-TAL ($R=-0,74$; $p=0,001$) e AMB-TAL ($R=0,71$; $p=0,002$), grupo C: n/sig. Grupo C: HIP-LUTA ($R=0,74$; $p=0,001$), grupo DT: n/sig. Os resultados mostram que a deficiência parcial de tiamina altera o padrão de atividade de vias serotoninérgicas centrais e o estilo de enfrentamento emocional dos animais. Conclui-se que as alterações neuroquímicas, em respostas à condição de deficiência moderada de tiamina, podem levar a ajustes na rede neural. Essa adaptação dos circuitos neuronais ao estado de DT pode ser modulada para atender demandas comportamentais hierarquicamente importantes para a sobrevivência do indivíduo, como por exemplo, aquelas relacionadas com respostas a estímulos aversivos.

Palavras-chave: restrição parcial de tiamina, estilos de enfrentamento, sistema serotoninérgico, modelamento autorregressivo

ABSTRACT:

Thiamine is a B complex vitamin and its chronic restriction leads to severe clinical conditions such as beri-beri, Wernicke Encephalopathy and Werneck-Korsakoff Syndrome. The use of experimental models of thiamine restriction is important in understanding the molecular, physiological and behavioral changes resulting from the deficiency of this vitamin. The objectives of this study were to evaluate the effects on behavioral, physiological and serotonergic parameters of adult Wistar rats on dietary restriction of thiamine. Thirty two rats were submitted or not to an episode of 7 weeks moderate restriction of thiamine, and were therefore divided according to the two treatment groups: deficient (DT, thiamine restricted diet, $n = 16$) and controls (C, standard diet, $n=16$), respectively. After this period, the standard diet was reestablished. All animals underwent a controlled manipulation (MC) three days before and three days after the episode of DT. After the 2nd MC all animals were exposed to the exploration of the open field (for 4 days). A week after the animals were sacrificed and samples of brain regions (thalamus-TAL, hippocampus-HIP, periaqueductal gray-PAG, and prefrontal cortex-CPF) were processed and analyzed via high-performance liquid chromatography for determining concentrations of serotonin (5-HT) and 5-hydroxy-indoleacetic acid (5-HIAA). ANOVA with repeated measures showed that the animals were DT after 49 days, on average 40 % lighter than the C ($F_{(1,25)}=39.973$, $p=0.001$), eating 35% less water ($F_{(1, 25)}=7.116$, $p=0.037$) and 70% less feed ($F_{(1,25)}=113.115$, $p<0.001$). Comparing the behavioral display before and after the deficiency was observed for the group DT a 36% increase in immobility (IMB, $z=-3.41$, $p=0.0006$), 33% reduction in ambulation (AMB, $t=-3.36$, $p=0.0007$), 12% in vertical exploration (EXP, $t=-2.48$, $p=0.013$) and 17% in resistance to capture (FIGHT, $t=2.4$, $p=0.029$). For group C these comparisons were not significant. The animals in the DT group traveled shorter distances during open field exploration in the four days, with significant on days 1 ($t=2.601$, $p=0.014$), 3 ($t=3.762$, $p=0.001$) and 4 ($t=2.641$; $p=0.013$). There was no difference between groups with respect to [5-HT], but significant increase was observed in [5-HIAA] in the PAG of the DT group compared to C ($t=-3.61$, $p=0.002$). Analysis of correlation between [5-HT] and [5-HIAA] for each of the four brain regions in animals of Group C and TD showed the occurrence of an alteration induced by DT in standard association between these two variables only in HIP

($r=0.54$, $p=0.03$). It was observed an increased in the PAG of DT rats serotonergic activity ($z=-3.36$, $p<0.001$) and reduced in the CPF ($t=3.76$, $p=0.002$), evaluated from the renewal rate $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$. Significant correlations between serotonergic activity were also observed for group C (HIP-TAL: $R=0.53$, $p=0.036$; HIP-CPF: $R=0.82$, $p=0.0001$), but not for the group DT, where relationships were not significant. The greatest strength of correlations observed between renewal ratio and behaviors assessed on the 2nd MC were: DT group: IMB-TAL ($R=-0.74$, $p=0.001$) and AMB-TAL ($R=0.71$, $p=0.002$), group C: n/sig. DT group: HIP-FIGHT ($R=0.74$, $p=0.001$),. Group C: n/sig. The results show that the partial thiamine deficiency alters the pattern of activity of central serotonergic pathways and the animals' coping style. We conclude that the neurochemical changes in response to the condition of moderate thiamine deficiency may lead to adjustments in the neural network. This adaptation of neuronal circuits to the state of DT can be modulated to meet hierarchically important for the survival of the individual, such as those related to behavioral responses to aversive stimuli demands. .

Keywords: partial thiamine restriction, coping styles, serotonergic system, autoregressive modelling

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Apresentação gráfica do delineamento experimental	36
Figura 2 – Bancada de tratamento semanal dos animais e visão interna do biotério experimental.	39
Figura 3 – Evolução do peso corporal (em gramas) médio ao longo do experimento. DT= grupo deficiente de tiamina e C=grupo controle.	48
Figura 4 – Consumo de água (em mL) ao longo do experimento. DT=grupo deficiente de tiamina e C=grupo controle.	48
Figura 5 – Consumo médio de ração (gramas) ao longo do experimento. DT=grupo deficiente de tiamina e C=grupo controle.	49
Figura 6 –Duração média (em segundos) dos comportamentos observados nas Manipulações Controladas 1 e 2: MC1 e MC2, respectivamente.	50
Figura 7 – Descrição gráfica das médias das distâncias percorridas durante a exploração de campo aberto, nas quatro sessões realizadas nos dias consecutivos, 1, 2, 3 e 4.	53
Figura 8 – Descrição gráfica das médias $\pm$ EPM (ng/g) das concentrações de 5-HT, nas regiões cerebrais	55
Figura 9 – Descrição gráfica das médias $\pm$ EPM das concentrações de 5-HIAA	56
Figura 10 – Representação gráfica da atividade serotoninérgica, nas regiões de interesse, avaliada a partir da taxa de renovação [5-HIAA]/[5-HT].	58
Figura 11 – Evolução do peso dos animais do grupo C ao longo do experimento ajustados à função (2).	63
Figura 12 – Evolução do peso dos animais do grupo DT ao longo do experimento ajustados à função (2).	64
Figura 13 – Evolução do peso dos animais do grupo DT ao longo do experimento ajustados à função (4).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Categorias Comportamentais mensuradas nas Manipulações Controladas	41
Tabela 2 – Descrição estatística das medidas realizadas nas Manipulações Controladas 1 e 2, para os grupos controle e deficiente em tiamina.	50
Tabela 3 – Teste de diferença entre médias dos grupos C e DT para a duração dos comportamentos mensurados.	51
Tabela 4 – Percentual de tempo expressando cada uma das seis categorias comportamentais avaliadas nas Manipulações Controladas 1 e 2.	51
Tabela 5 – Dados dos teste de diferença pareado entre médias de duração dos comportamentos mensurados em MC1 e MC2, dos grupos C e DT	52
Tabela 6 – Descrição estatística das distâncias percorridas (em cm) durante a exploração de campo aberto.	53
Tabela 7 – Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias das distâncias percorridas durante a exploração de campo aberto, comparando-se os grupos.	54
Tabela 8 – descrição estatística das médias das concentrações de 5-HT.	54
Tabela 9 – Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias e variâncias das concentrações de 5-HT comparando-se animais dos grupos C e DT, por estrutura	55
Tabela 10– Descrição estatística das médias das concentrações de 5-HIAA.	56
Tabela 11 – Resultado dos teste-t e teste-u para as concentrações de 5-HIAA comparando-se animais dos grupos C e DT, por estrutura.	56
Tabela 12 – Resultado dos testes estatísticos de correlação entre as concentrações de 5-HT e 5-HIAA observando-se independentemente animais dos grupos C e DT, por região de interesse.	57
Tabela 13 – Descrição estatística da atividade serotoninérgica nas regiões de interesse, denominadas na primeira coluna, a partir da Taxa de Renovação [5-HIAA]/[5-HT].	57
Tabela 14– Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias e variâncias da atividade serotoninérgica, avaliada a partir da taxa de renovação [5-HIAA]/[5-HT], comparando-se animais dos grupos C e DT, por região cerebral de interesse.	58
Tabela 15 – Resultado dos testes estatísticos de análises de correlação da atividade serotoninérgica avaliada a partir da taxa de renovação medida entre as regiões de interesse, observando-se independentemente animais dos grupos C e DT.	59

Tabela 16 – Resultado dos testes estatísticos de correlação da atividade serotoninérgica (taxa de renovação) medida entre as regiões cerebrais de interesse e os comportamentos observados na segunda Manipulação Controlada, observando-se independentemente animais dos grupos C e DT. 60

Tabela 17 – Descrição estatística das vocalizações ultrassônicas observadas durante as Manipulações Controladas independentemente para os animais dos grupos C e DT, por fase da Manipulação. 61

Tabela 18 – Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias do número de eventos de vocalizações ultrassônicas comparando-se animais dos grupos C e DT. 61

Tabela 19 – Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias do número de eventos das vocalizações ultrassônicas comparando-se animais dos grupos C e DT. 61

Tabela 20 – Resultado dos testes estatísticos de correlação entre o total de vocalizações emitidas e cada comportamento observado durante as Manipulações 1 e 2, observando-se independentemente animais dos grupos C e DT. 62

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidróxi-indolacético
5-HT	5-hidroxi-triptofano (serotonina)
5-HTT	Transportador de serotonina
ACD	Alfa-cetoglutaratodesidrogenase
AthTP	Adenosina-tiamina-trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
C	Grupo Controle
CPD	Complexo Piruvato Desidrogenase
CPF	Córtex pré-frontal
DT	Grupo Deficiente em Tiamina
EPM	Erro Padrão da Medida
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HIP	Hipocampo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LaNeC	Laboratório de Neurociência Molecular e Comportamental
MC1	Primeira Manipulação Controlada
MC2	Segunda Manipulação Controlada
NAD ⁺	Adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
PAG	Substância cinzenta periaquedutal (do termo em inglês: Periaqueductal Gray),
PARP-1	Enzima poli-ADP-ribose-polimerase 1
SEQ	Soma do Erro Quadrático
TAL	Tálamo
TDP	Tiamina Difosforilada

SUMÁRIO

PRÓLOGO.....	15
CAPÍTULO 1 – ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	17
1.1 - Descoberta e Função da Tiamina.....	17
1.2 - Fontes e metabolismo de tiamina.....	19
1.3 - Deficiência de tiamina e quadros clínicos em humanos.....	21
1.4 - Modelos experimentais de restrição de tiamina – Modelo de deficiência moderada ou subclínica.....	22
1.5 - Estilos de enfrentamento (coping styles).....	24
1.6 - Alterações em parâmetros serotoninérgicos observadas em ratos deficientes de tiamina.....	27
CAPÍTULO 2 – HIPÓTESES.....	31
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS.....	32
CAPÍTULO 4 – JUSTIFICATIVAS.....	33
CAPÍTULO 5 – MÉTODOS.....	35
5.1 – Delineamento Experimental.....	35
5.2 – Manipulação Diária dos Animais.....	36
5.3 – Manipulação Controlada.....	39
5.4 – Exploração de Campo Aberto.....	41
5.4.1 – Configuração do Ethowatcher.....	42
5.5 – Seleção das regiões cerebrais de interesse no presente estudo.....	43
5.6 - Determinação das concentrações de serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido hidroxindolacético (5-HIAA).....	44
5.7 - Análises Estatísticas.....	45
5.8 - Modelamento Matemático da Evolução do Peso de Animais dos grupos C e DT.....	46
CAPÍTULO 6 – RESULTADOS.....	48
6.1 - Variações do peso corporal e consumo de água e ração.....	51
6.2 - Medidas Comportamentais.....	51
6.2.1 - Manipulações Controladas.....	51

6.2.2 – Exploração de Campo Aberto.....	55
6.3 - Concentrações de serotonina (5-HT) e ácido 5-hidróxi-indolacético (5-HIAA).....	57
6.3.1 - Taxa de Renovação da serotonina, $\frac{5\text{-HIAA}}{5\text{-HT}}$, e correlações entre as concentrações de 5-HT e 5-HIAA.....	61
6.4 - Correlações entre a atividade serotoninérgica nas regiões cerebrais de interesse e categorias comportamentais observadas na segunda Manipulação Controlada.....	65
6.5 - Vocalizações Ultrassônicas.....	66
6.5.1 - Correlações entre medidas comportamentais e vocalizações ultrassônicas.....	68
6.6 - Modelamento Matemático da Evolução do Peso Corporal.....	69
CAPÍTULO 7 – RESUMO DOS RESULTADOS.....	72
CAPÍTULO 8 – DISCUSSÃO.....	74
CAPÍTULO 9 – CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS.....	116

PRÓLOGO – Histórico do Projeto

O presente trabalho é resultado do desenvolvimento de um projeto iniciado no LaNeC em 2011, cujo objetivo era avaliar se existiriam diferenças em termos de agressividade entre animais deficientes de tiamina e controles normais. Relatos informais de pesquisadores do nosso grupo indicavam que animais deficientes apresentavam maior agressividade do que os demais, durante a fase intermediária do episódio de deficiência, isto é, em um estágio da evolução do processo em que ainda os animais não apresentavam sinais neurológicos, que caracterizam a fase grave (também chamada sintomática, por alguns autores), como perda do reflexo de endireitamento, e convulsões.

Neste sentido, o alvo do presente estudo foi investigar a ocorrência de comportamentos de agressividade, avaliados em um paradigma experimental determinado, comparando a resposta de animais deficientes aos controles. Além disso, foi objetivo do estudo avaliar a extensão das possíveis diferenças no sistema serotoninérgico, parece ter um papel relevante na expressão de comportamentos de agressividade, ansiedade e depressão. No LaNeC dispomos de ensaios neuroquímicos, já estabelecidos na ocasião, que viabilizam a dosagem de serotonina e seu metabolito, propiciando-se uma avaliação da atividade desse sistema. Assim, considerando os dados sobre o envolvimento do sistema serotoninérgico em comportamentos emocionais, selecionamos esse sistema como alvo de estudo, baseando-se na hipótese deste fazer parte do substrato neurobiológico dos comportamentos avaliados.

Os testes comportamentais foram desenvolvidos no LaNeC, a partir de métodos reconhecidos na determinação de parâmetros de agressividade, ansiedade e depressão. Inicialmente buscamos implementar no laboratório alguns métodos padronizados para avaliação do estilo de enfrentamento, tais como o paradigma residente-intruso (tanto utilizando-se fêmeas e machos, quanto apenas machos versus macho desconhecido ao grupo) e *defensive burying*. Não obtivemos sucesso na implementação destes métodos e assim buscamos, a partir de revisão da literatura

acerca do enfrentamento em animais, alternativas. Com base em algumas evidências e dados obtidos em estudos anteriores, criamos um método de avaliação que permitiu-nos criar um panorama acerca dos estilos de enfrentamento dos animais.

Realizamos um estudo-piloto, empregando 4 animais, onde determinamos experimentalmente as durações do teste e as formas de avaliação dos comportamentos. Este estudo foi apresentado, em sessão de painéis, em dois encontros científicos (IV Simpósio de Neurociências da UFMG e XXV Semana da Graduação da UFMG). Nas etapas do teste, descritas neste trabalho, utilizamos a emissão de vocalizações ultrassônicas características da resposta a estímulo ou ambiente aversivo, como uma medida de aversibilidade em testes comportamentais. Neste estudo-piloto também fomos capazes de avaliar e estabelecer a duração do período de deficiência, no caso, 65 dias, quando os animais já apresentavam os primeiros sinais clínicos da deficiência, como leve arqueamento de dorso, piloereção e princípio de oftalmoplegia. Tomamos como referência da deficiência moderada (subclínica, anterior ao aparecimento de sinais neurológicos) algo ao redor de duas semanas antes, período quando os animais não apresentavam nenhum sinal neurológico. Mesmo considerando-se a alta variabilidade individual deste modelo experimental, os animais manifestavam sinais clínicos claros do estabelecimento da deficiência, a saber – anorexia, redução no consumo de água e ração.

A escolha do modelo experimental de uma condição subclínica de deficiência de tiamina foi baseada em: (i) o baixo número de estudos comportamentais realizados durante a fase subclínica da deficiência de tiamina, estabelecida exclusivamente por uma restrição dietária moderada (ii) a escassez de trabalhos avaliando estilos de enfrentamento na deficiência de tiamina (em qualquer fase da evolução do processo). (iii) evidências científicas obtidas pelo nosso grupo e por outros autores, indicando alterações metabólicas e neuroquímicas durante a fase subclínica da deficiência de tiamina.

Este trabalho foi realizado após a autorização pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais (CETEA/UFMG) sob o registro 093/2010.

CAPÍTULO 1 – Antecedentes Científicos

A deficiência de tiamina é uma condição em que a tiamina (vitamina B1) está disponível ao organismo em concentrações inferiores às necessárias ao metabolismo normal; ou está indisponível ao organismo, levando a alterações homeostáticas que, em alguns casos podem levar à morte do indivíduo. Esta condição está presente em quadros clínicos, tais como a desnutrição, alcoolismo, diabetes, beri-beri e Encefalopatia de Wernicke, por exemplo. Em modelo experimental, a restrição dietária ou inibição funcional do metabolismo dependente de tiamina leva a condições fisiológicas miméticas da Encefalopatia de Wernicke ou do Beri-Beri, dependendo do tempo de exposição e da forma de inibição do metabolismo tiamina-dependente. Estes modelos animais têm sido de enorme valor tanto na elucidação dos mecanismos geradores dos sinais clínicos e déficits associados a tais condições clínicas; quanto na elaboração de estratégias capazes de minimizarem ou reverterem os danos causados em tais condições. O uso desses modelos também pode contribuir para o conhecimento do papel da tiamina e o envolvimento de componentes moleculares em processos fisiológicos e comportamentais associados à deficiência de tiamina.

1.1 – Descoberta e Função da Tiamina

Ao final do século XIX (1881), Carl Wernicke publicava relatos de casos clínicos que posteriormente (anos 1940) foram associados à deficiência de tiamina. Inicialmente, os sintomas lembravam remotamente o estágio inicial do beri-beri, com perda de movimentos, ataxia ou fraqueza nas pernas, ambas as condições clínicas evoluindo de forma diferente. Inicialmente, acreditava-se que o beri-beri seria consequência de envenenamento ou infecção bacteriana, acometendo pessoas vivendo em pobreza. Estudos foram conduzidos no sentido de isolar e determinar se microrganismos suspeitos de causarem beri-beri seriam de fato as causas da doença, mas inusitadamente, os animais do grupo-controle também adoeceram. Eijkman (1888) notou que os sinais clínicos surgiram após uma mudança accidental na dieta

dos animais, hipostenizando que as causas do beri-beri poderiam ser decorrentes de desnutrição e não originadas por um agente infectante ou antígeno contraído. Contudo, somente em 1926 Jansen e Donath foram capazes de purificar cristais de tiamina, sintetizada pela primeira vez, em 1936, por Williams & Cline (para uma revisão, ver Carpenter, 2012).

A tiamina em sua forma difosforilada (TDP) é coenzima fundamental para a síntese de Acetil-CoA, intermediário central nas principais vias metabólicas (p.ex. carboidratos, lipídeos e aminoácidos) essenciais à homeostase (Ham & Karska-Wysocki, 2005). No metabolismo de glicose, a tiamina é cofator às enzimas transcetolase (TK), que auxilia na conversão de glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, complexo piruvato desidrogenase (CPD), que converte piruvato em Acetil-CoA e alfa-cetoglutaratodesidrogenase (ACD), que transforma alfa-cetoglutarato em succinil-CoA. O alfacetoglutarato é importante ao sistema nervoso pois é precursor do neurotransmissor glutamato e este, do ácido gama-aminobutírico (GABA) e a sua produção depende do funcionamento de enzima dependente de tiamina –CPD (Bettendorf, 1994). Numa outra via, a enzima Acetil-CoA é precursora de outro neurotransmissor, acetilcolina, logo a sua disponibilidade depende diretamente da disponibilidade de Acetil-CoA, que é regulada a parti da concentração de tiamina. Alterações na concentração de tiamina levam consequentemente a alterações na síntese e/ou disponibilidade de neurotransmissores formados a partir de produtos gerados por reações catalisadas por elas, a saber: CPD – Glutamato e GABA; ACD – Acetilcolina (Jankowska-Kulawy et al, 2010).

Como a TDP está envolvida nos processos de oxirredução, sabe-se que a condição de deficiência de tiamina favorece a manutenção do estado oxidativo. A tiamina é um importante componente do metabolismo, atuando como coenzima/catalisadora tanto nos processos de glicólise quanto na redução da concentração de espécies reativas de oxigênio envolvidas no estresse oxidativo (Depeint, Shangari, Furrer, Bruce & O'Brien, 2007). No citosol a glicose fosforilada é quebrada por ação enzimática tiamina-dependente principalmente através do ciclo das pentoses e do ácido cítrico, gerando como produtos principais ATP, NADPH e CO² (Ham & Karska-Wysocki, 2005). A glicólise ocorre também através de outras vias metabólicas, em menor escala, gerando como subprodutos, por exemplo, o glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona (Karachalias, Babaei-Jadidi, Rabbani & Thornalley,

2010), assim como carbonilas, hidroimidazolonas e nitrotirosinas, substâncias implicadas no estresse oxidativo e cuja degradação ou regulação da concentração ocorrem através de ação enzimática dependente de tiamina (Depeint et al, 2007). A redução na disponibilidade de tiamina é particularmente nociva às células nervosas por diminuir a ação enzimática das transcetolases e descarboxilases, resultando no aumento da concentração de lactato, resultando em morte celular (Ham & Karska-Wysocki, 2005), assim como prejudicando o fluxo de íons sódio na membrana celular. Portanto, mesmo em um estágio da deficiência em que ainda não há perda de peso corporal, baixos níveis de TDP induzem um aumento significativo na concentração de algumas espécies reativas de oxigênio no cérebro (Depeint et al, 2007).

1.2 - Fontes e metabolismo de tiamina

A biossíntese de tiamina ocorre em procariotos, fungos e plantas tendo início com a síntese dos anéis de tiazol e pirimidina através de processos independentes, posteriormente, sendo unidos em apenas um composto (tiamina), por ação enzimática (Camienner & Brown, 1960). Apesar de similar, a cinética destas reações entre os organismos que produzem tiamina é diferente, em procariotos havendo a ação de diversas enzimas na via de síntese de tiamina; e em eucariotos um número menor de enzimas, catalisando processos mais complexos. A via de biossíntese da tiamina em eucariotos não é tão detalhadamente conhecida como em procariotos, apesar da molécula ser formada, similarmente, a partir da ligação de duas moléculas: um anel de tiazol e outro de pirimidina, sintetizados por enzimas diferentes das encontradas em procariotos; e fosforilada, após formada, por diversas cinases. O metabolismo da tiamina termina na degradação enzimática da mesma em tiazol e pirimidina. Há duas classes de tiaminases conhecidas em procariotos, Tiaminases I e II, sendo a diferença entre elas o substrato empregado na quebra da tiamina, assim como sua afinidade por compostos análogos à tiamina. Este processo ocorre em $\text{pH} > 10$, em alguns organismos (para uma revisão, ver Jurgenson, Begley & Ealick, 2009).

Em seres humanos, a tiamina é obtida, após o nascimento, exclusivamente por via dietária. A incapacidade de organismos superiores sintetizarem tiamina em quantidade suficiente para a manutenção do metabolismo; e a maior facilidade de

absorção de tiamina pelo estômago (e não o intestino, habitat de microrganismos que sintetizam tiamina), resultou em uma adaptação para a aquisição da tiamina exclusivamente por via dietária (Liu, Timm & Hurley, 2006). Alguns dos alimentos que apresentam maiores concentrações de tiamina são os ovos, laticínios, carnes, raízes e grãos integrais (Haas, 1988; Beltramo, Berrone, Tarallo & Porta, 2008). A tiamina é absorvida principalmente no estômago (Singh & Kumar, 2007), passando à corrente sanguínea e então aos órgãos e tecidos, onde é fosforilada e torna-se funcional no metabolismo.

Outra forma de obtenção de tiamina, igualmente por via dietária, dá-se através da ingestão de um precursor da tiamina chamado benfotiamina. Este composto está presente em abundância em vegetais do gênero *Allium* (Beltramo et al, 2008) e no metabolismo a benfotiamina é convertida em tiamina (Volver et al, 2008). A benfotiamina tem apresentado efeitos comparáveis aos da tiamina em modelo experimental de diabetes (Karachilias et al, 2010), o que tem sido associado à conversão de benfotiamina em tiamina. A benfotiamina é apolar, diferente da tiamina, o que levanta a possibilidade de armazenamento nos tecidos, o que ainda não foi demonstrado, mas apenas levantado de forma hipotética por autores, como Beltramo et al, 2008.

Finalmente, dados obtidos em alguns estudos (por exemplo, Bettendorff et al, 2007) têm apontado uma forma nucleotídica da tiamina, chamada Adenosina-tiamina-trifosfato (A_{Th}TP). Este composto ocorre naturalmente nos tecidos, como no cérebro, fígado, coração, rins e músculos (Friedrich et al, 2009). Sua estrutura é semelhante à da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e hipotetiza-se que possa ser utilizada no metabolismo alternativamente ao NAD⁺, na inibição do estresse oxidativo nas células. Esta hipótese foi testada com sucesso em simulações computacionais por Tanaka et al (2011), quando a A_{Th}TP foi capaz de inibir em 100% a atividade da enzima poli-ADP-ribose-polimerase 1 (PARP-1), implicada no desencadeamento de estresse oxidativo e formação de espécies reativas de oxigênio (Beltramo et al, 2008). O mesmo efeito, neste estudo, foi observado *in vitro*. Contudo, os efeitos de A_{Th}TP como inibidor de PARP-1, ou sua influência nos processos associados ao estresse oxidativo *in vivo* ainda não foram demonstrados.

1.3– Deficiência de tiamina e quadros clínicos em humanos

A deficiência de tiamina está presente em algumas condições, que resultam em quadros clínicos que caracterizam algumas doenças que são importantes em termos de saúde pública, como por exemplo, a Diabete, a Encefalopatia de Wernicke e o Beri beri. A deficiência de tiamina tem também sido observada, em menor escala, em outras circunstâncias, como obesidade, alimentação parenteral e cirurgia bariátrica (para uma revisão, ver Singh & Kumar, 2012). Descrevemos abaixo, sucintamente, alguns destes quadros e a influência da deficiência de tiamina nestes.

Encefalopatia de Wernicke e alcoolismo crônico: descrita por Carl Wernicke (1848-1905) em 1881, a Encefalopatia de Wernicke compreende um conjunto de sintomas comuns em alcoolistas como, por exemplo, letargia, oftalmoplegia, ataxia e comprometimento mental, em particular memória (Sullivan & Fama, 2012). A Encefalopatia de Wernicke já foi observada em pacientes não-alcoolistas, mas recentemente tem sido associada principalmente ao abuso de álcool (Klooster et al, 2013). A deficiência de tiamina é responsável por muitos dos sinais clínicos observados na Encefalopatia de Wernicke (Vetreno, Ramos, Anzalone & Savage, 2012), tanto devido à redução na absorção de tiamina decorrente do consumo de álcool (Klooster et al, 2013), quanto também em virtude de alterações na cinética de enzimas tiamina-fosfatases, impedindo que a tiamina disponível seja transformada em sua forma ativa e utilizada no metabolismo celular (Vetreno et al, 2012).

Beri-Beri e desnutrição generalizada: o beri-beri é uma condição clínica resultante de uma condição metabólica de esgotamento da tiamina e suas consequências metabólicas, como alterações na atividade enzimática tiamina-dependente (Walker & Kepner, 2012). Esta condição tem sido observada em casos de desnutrição (generalizada ou específica de tiamina), má absorção de tiamina no trato gastro-intestinal, ou aumento significativo do metabolismo sem equivalente contra-partida nutricional (Sriram et al, 2012).

Diabetes: a diabetes é uma doença crônica cuja prevalência atinge 5% da população adulta mundial (WHO, 2013). A fisiopatologia da diabetes envolve principalmente o pâncreas, órgão responsável pela secreção de insulina na corrente sanguínea e consequente metabolismo de glicose (Karachalias et al, 2010). Estudos

(por exemplo, Depeint et al, 2007; Boersma, Scheurink, Wielinga, Steimer & Benthem, 2009) têm indicado que mesmo quando não há estabelecimento de sinais clínicos iniciais da deficiência de tiamina (por exemplo, anorexia) há alterações metabólicas significativas, sobretudo em relação ao estado oxidativo das células. Em pacientes diabéticos observa-se redução significativa na concentração plasmática de tiamina (Thornalley et al, 2007).

1.4– Modelos experimentais de restrição de tiamina – Modelo de deficiência moderada ou subclínica

A deficiência experimental de tiamina (vitamina B1) consiste na interrupção parcial das reações metabólicas tiamina- dependentes, como por exemplo, a conversão de Piruvato em Acetil-CoA (Beltramo et al, 2008). O modelo experimental de deficiência de tiamina mimetiza os sinais clínicos observados nos quadros clínicos em humanos (Thompson & Marshall, 2006; Vetreno et al, 2012). Em humanos, há a influência de fatores não previstos no modelo experimental, como por exemplo, a nutrição moderadamente deficiente em tiamina, em contraste ao modelo de restrição controlada de tiamina. O modelo de restrição de tiamina aproxima-se, em muitos aspectos relevantes, aos sinais clínicos observados em humanos, por exemplo, em termos das principais regiões cerebrais afetadas e da progressão dos sintomas neurológicos (Vetreno et al, 2012; Thompson & Marshall, 2005).

Os efeitos da deficiência de tiamina têm sido obtidos tanto exclusivamente através da restrição de tiamina na dieta, quanto da combinação da restrição na dieta com a administração de antimetabólitos da tiamina, como por exemplo, o uso do inibidor da enzima tiamina-pirofosfoquinase, denominado piritiamina (Bettendorff, 1994). A piritiamina impede a produção da forma ativa da tiamina (tiamina difosfato – TDP ou tiamina pirofosfato – TPP) e, portanto, interfere com algumas das suas principais funções metabólicas (Liu et al, 2006). Como resultado da administração da piritiamina observa-se não apenas uma aceleração dos efeitos da deficiência de tiamina em relação aos obtidos apenas por restrição dietária, mas padrão de lesões

cerebrais diferentes, devido ao efeito metabólico distinto, dos dois métodos de indução da deficiência de tiamina (Butterworth, 1986).

Quando a deficiência é obtida exclusivamente por restrição dietária, observa-se perda de peso após a segunda semana da dieta; anorexia e redução drástica da alimentação e ingestão de água a partir da sexta semana; aparecimento de sinais neurológicos ao redor da oitava semana, progredindo para perda de reflexos motores, convulsões e morte do animal. A principal mudança metabólica observada nesta modalidade de deficiência é a redução acentuada e irreversível na atividade da enzima transcetolase. A região cerebral mais afetada é o núcleo vestibular, pouco antes da manifestação de sinais neurológicos. Após o estabelecimento destes sinais (perda do reflexo de endireitamento, oftalmoplegia, arqueamento do dorso, apatia), observou-se redução significativa na atividade de outras enzimas tiamina-dependentes, alfa-cetoglutaratodesidrogenase e complexo piruvatodesidrogenase, assim como lesões ao nível do tálamo, hipocampo e cerebelo. Alguns dos sinais clínicos observados durante a administração de pirritiamina, simultaneamente à restrição dietária, são similares aos observados quando a deficiência é obtida exclusivamente por dieta restrita em tiamina, tais como anorexia, perda de reflexos de endireitamento, convulsões e morte. A diferença é que a evolução do processo de apresentação desses sinais, quando em presença de pirritiamina, ocorre em menor tempo, ainda que do ponto de vista metabólico e de comprometimento neuronal o processo gerador dos sinais clínicos seja, ao menos inicialmente, similar (para uma revisão, ver Butterworth, 1986).

O *turnover* da tiamina é de 5-9 horas (Haas, 1988; Beltramo et al, 2008), porém seu esgotamento dá-se, na modalidade de deficiência induzida exclusivamente por restrição dietária, após cerca de 7-8 semanas (Butterworth, 1986). Há estudos apontando, neste período, não o esgotamento, mas uma redução em 59% comparando-se à quantidade inicial de tiamina difosfato no organismo (Haas, 1988). Utilizando-se pirritiamina como fator à restrição dietária, o efeito de esgotamento ocorre bem mais cedo, ao redor de 2-3 semanas, coincidindo com a ocorrência de convulsões, o sinal clínico neurológico mais grave da deficiência de tiamina (Secchi & Serra, 2007). A deficiência moderada de tiamina produz redução grave na produção de colesterol, precursor da corticosterona, assim reduzindo a atividade do eixo hipotalâmico- hipofisário-adrenal (HPA) (Dreyfus & Victor, 1961). Alguns autores

mostraram que ratos submetidos à restrição dietária de tiamina por 6 semanas e após 4 semanas de recuperação ingerindo ração comercial adquiriram aversão à ração deficiente de tiamina, efeito ocasionado pela deficiência nas concentrações de glutamato e aspartato no núcleo accumbens, alterando a termogênese (Monda, Viggiano & De Lucca, 2003).

Não há distinção clara na literatura em relação à nomenclatura empregada nas diferentes modalidades de deficiência induzidas. Os trabalhos publicados referem-se à “deficiência de tiamina”, normalmente compreendendo o aparecimento de sinais neurológicos. Ela tem sido chamada de “deficiência sintomática de tiamina”, em virtude do aparecimento dos sinais neurológicos. Os trabalhos cujo tempo ou forma de exposição à deficiência não levam ao aparecimento de sinais neurológicos, ou mesmo fisiológicos (por exemplo, anorexia) têm sido considerados como “deficiência parcial”, ou “deficiência moderada” ou ainda “deficiência marginal” de tiamina. Há estudos que consideram esta modalidade de deficiência “pré-sintomática” ou “subclínica”, visto que, mantida a restrição de tiamina, seriam observados sinais neurológicos.

No presente estudo, sintetizamos estas nomenclaturas criando a seguinte diferenciação: deficiência total – presença de sinais neurológicos. Deficiência parcial – ausência de sinais neurológicos. Em ambos os casos, consideramos variável independente o tempo de restrição de tiamina, ainda que estudos (Navarro, Zwingmann, Hazzell & Butterworth, 2005) considerem a ocorrência de sinais clínicos graves como marcador do estabelecimento da deficiência. Para fins do presente estudo, utilizamos o modelo subclínico e, portanto, consideramos a deficiência parcial de tiamina, em virtude da ausência de sinais neurológicos durante a restrição de tiamina.

1.5– Estilos de enfrentamento (*coping styles*)

Os relatos informais de aumento na agressividade de animais parcialmente deficientes de tiamina, assim como estudos indicando a expressão de comportamentos associados à depressão em ratos marginalmente deficientes (por

exemplo, Nakagawasai et al, 2007) direcionaram um dos propósitos do presente estudo. Dados indicando um possível comprometimento de componentes emocionais induzidos pela deficiência de tiamina despertaram nosso interesse pelo fenômeno de enfrentamento, que pode ser definido como a capacidade individual de adaptar-se a estímulos aversivos e a vulnerabilidade ao estresse (Koolhaas et al, 1999). Enfrentamento é o conjunto das estratégias utilizadas pelas pessoas para adaptarem-se a circunstâncias adversas ou estressantes (Lazarus&Folkman, 1980, *apud* Antoniazzi, Dalbosco & Bandeira, 1998) para as quais ainda não houve aprendizagem. Estudos em psicologia (Murta & Tróccoli, 2005; Lisboa et al, 2002; Dalbosco & Hutz, 2002) têm apontado a importância do enfrentamento no sucesso das atividades cotidianas. É comum, em humanos, a adoção de uma mesma estratégia de enfrentamento que trouxe bons resultados para o sujeito, como por exemplo a crença em ajuda divina para superar situações aversivas distintas das que levaram à crença na ajuda divina (Panzini & Bandeira, 2007).

Os estudos de enfrentamento em animais convergiram à padronização de respostas comportamentais e neuroendócrinas características das duas estratégias consideradas: proativa -ou ativa- e reativa -ou passiva (Koolhaas et al, 1999). Considera-se estratégias "ativa" os comportamentos do tipo exploratório, luta e fuga e "passiva" os comportamentos do tipo "congelamento" e esquiva (Koolhaas et al, 1999). Existe um sentido evolutivo na existência destes dois estilos de enfrentamento (para uma revisão, ver Korte, Koolhaas, Wingfield & McEwen, 2005): o sucesso evolutivo de diversos predadores deu-se em função da sua agressividade e demarcação de território, atitudes fortemente associadas ao enfrentamento ativo. Por outro lado, animais que perante um estímulo aversivo (por exemplo, presença do predador) tornam-se imóveis, como se estivessem mortos obtiveram vantagens sobre alguns predadores, que identificam bem presas em movimento, mas não imóveis; ou outros que evitam alimentarem-se de animais imóveis, que podem ser confundidos a cadáveres de animais em decomposição. Na presença de estimulação aversiva, os animais apresentando perfil ativo preferem o emprego de estratégias de enfrentamento do tipo luta-fuga, enquanto os de perfil passivo empregam estratégias do tipo congelamento ou evitar o estímulo (mantendo-se escondidos, por exemplo). A adoção de uma ou outra estratégia de enfrentamento é função das alternativas de resposta que o animal dispõe na condição de aversibilidade (Belda, Fuentes, Nadal &

Armario, 2008). Também é importante ressaltarmos que somente foram observados padrões de enfrentamento plenamente ativos ou passivos em linhagens geneticamente selecionadas (Koolhaas, De Boer, Coppens & Buwalda, 2010), normalmente partindo-se de um grupo heterogêneo de indivíduos (uma ninhada de ratos, por exemplo), separando os que apresentam maiores tendências aos estilos de enfrentamento passivo e ativo e a partir de cruzamentos sucessivos entre pares de mesmo estilo de enfrentamento, obtendo as linhagens onde praticamente todos os sujeitos expressam estilos de enfrentamento ativo ou passivo (Koolhaas et al, 2010).

Em humanos, os padrões ativo-passivo referem-se principalmente ao manejo de situações de aversibilidade. Por exemplo, diante de uma doença grave há aqueles que buscam tratamento, ou alguma forma de eliminar ou minimizar a doença; enquanto outros nada fazem em relação ao evento, alguns preferindo ingerir substâncias tranquilizantes ou que minimizem o desconforto percebido a partir do evento aversivo, no caso deste exemplo, a doença. Sujeitos expressando perfil de enfrentamento passivo são mais vulneráveis à estimulação aversiva, por apresentarem maior sensibilidade no limite de reconhecimento de estímulos ansiogênicos (Pauls & Stemmler, 2003). Trazendo este conceito para o modelo experimental (roedores), pode-se conceber que animais que perante uma situação aversiva, ou potencialmente aversiva lutam, fogem ou escapam, são considerados ativos, enquanto aqueles que nada fazem, permanecendo imóveis, exibindo grande latência até a tomada de atitude perante o estímulo aversivo, ou que se escondem sem enfrentarem a situação de aversibilidade são considerados passivos (para revisões, ver Koolhaas et al, 1999; 2008; 2010).

Em termos neuroendócrinos, animais expressando o padrão ativo, em relação aos pares apresentando padrão passivo, apresentam menor atividade no eixo HPA (hipotálamo, hipófise e adrenal) (Koolhaas et al, 1999; Meerlo, Horvath, Nagy, Bohudis & Koolhaas, 1999), maior agressividade associada a grande ativação simpático-adrenomedular (Sgoifo, De Boer, Haller & Koolhaas, 1995) e maior produção de testosterona (de Huijter et al, 1993). Animais ativos estão menos propensos a desenvolverem doenças graves, como câncer de pulmão (Koolhaas et al, 2007); obesidade, quando alimentados por dieta hiperlipídica e resistência à insulina (Boersma et al, 2010). As regiões cerebrais envolvidas na escolha da estratégia de enfrentamento são a substância cinzenta periaquedutal, o hipocampo e a região

orbitomedial do córtex pré-frontal (Keay & Bandler, 2001), envolvendo os circuitos serotoninérgicos e dopaminérgicos. O estilo de enfrentamento é considerado uma característica individual, contudo, estudos mostram evidências da possibilidade de se interferir na estratégia (Keck et al, 2000), levando, por exemplo, à demora na escolha de uma estratégia ativa (Pijlman & van Ree, 2002). Estudos (Koolhaas, 2008) indicam uma relação entre a resposta imunológica e o estilo de enfrentamento. Animais com expressão diferente de enfrentamento apresentam propensão ou não para uma maior probabilidade de cura de doenças associadas ao sistema imunológico.

Em síntese, podemos utilizar os critérios presentes em Koolhaas et al (2010), no intuito de categorizar as medidas comportamentais obtidas em testes em dois grupos: 1 – Enfrentamento Ativo: refere-se aos animais que preferencialmente adotam medidas de prevenção proativa ou manipulação do estímulo estressor, expressando maior número ou por maior duração comportamentos como luta, fuga e exploração;

2 – Enfrentamento Passivo: refere-se aos animais que, por outro lado, adotam preferencialmente estratégias de evitação ou dificuldade em responder ao estressor, expressando principalmente comportamentos do tipo imobilidade, grande latência para o início da exploração ou ataque.

Até o momento, não foram encontrados estudos com dados sobre a associação direta da deficiência de tiamina aos estilos de enfrentamento.

1.6 – Alterações em parâmetros serotoninérgicos observados em ratos deficientes de tiamina

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor importante na regulação do humor (Ichimya et al, 2002). Morrisson, Swallows & Cooper (2011) demonstraram que roedores submetidos a um estímulo aversivo social (paradigma dominante/subordinado) apresentaram ambos, expressão aumentada do receptor de serotonina 5-HT_{1A} na região basolateral da amígdala, associada a motivação e humor, comparativamente aos animais do grupo controle. Além disso, demonstraram rebaixamento na expressão de 5-HT_{1A} no núcleo paraventricular do hipotálamo, região

cujos neurônios são recrutados em situações de estresse, de animais dominantes em relação aos controles. Está bem consolidado na literatura o papel da serotonina nos quadros de depressão, onde há redução da expressão do receptor de 5-HT_{1A}, após o estresse crônico, e do transportador de serotonina, 5-HTT, no sistema límbico, configurando o quadro de depressão (Southwick, Vythilingam & Charney, 2005). A serotonina é importante tanto modulando as respostas emocionais a estímulos aversivos quanto auxiliando na consolidação de memórias aversivas, ao nível do hipocampo, assim como da tolerância a eventos aversivos (Guimarães, Del Bel, Padovan, Netto, & De Almeida, 1993).

Os mecanismos de neurotransmissão serotoninérgicos parecem ser os mais alterados na deficiência de tiamina (para uma revisão, ver Haas, 1988). No modelo de restrição total utilizando-se piritiamina foi encontrado um aumento significativo na concentração do principal metabólito da serotonina, o ácido 5-hidróxi-indolacético, 5-HIAA, em todo o cérebro de ratos deficientes, sem alterações na concentração de triptofano, precursor da serotonina, sem alterações na concentração de serotonina. Crespi & Jouvét (1982) encontraram níveis aumentados de serotonina e 5-HIAA em modelo de restrição total pré-convulsão – quando surgem os primeiros sinais neurológicos: ataxia, piloereção. Já foi observada redução no efluxo cerebral de 5-HIAA, coincidente a dano neurológico (Van Woert, Plaitakis, Hwang & Berl, 1979), assim como aumento na concentração de 5-HIAA no tálamo após deficiência e recuperação (Vigil, Oliveira-Silva, Ferreira, Pereira, & Ribeiro, 2010).

Os perfis de enfrentamento (ativo e passivo) compreendem padrões distintos de atividade serotoninérgica (Koolhaas et al, 2010). Animais predominantemente ativos apresentam maior controle inibitório da atividade serotoninérgica via autoreceptor 5-HT_{1A} do que os pares passivos (Koolhaas et al, 2007). Roedores predominantemente dominantes apresentam diminuição na expressão de 5-HT_{1A} no hipotálamo, reforçando a idéia de que o perfil ativo de enfrentamento corresponde a um funcionamento melhor controlado do sistema serotoninérgico do que o perfil passivo (Morrisson et al, 2011). Os estudos de enfrentamento têm convergido cada vez mais para o emprego de linhagens selecionadas para a expressão preferencial de apenas um perfil de enfrentamento, normalmente associadas à maior ou menor ansiedade em testes como labirinto em cruz elevado ou paradigma de condicionamento ao contexto, gerando padrões claros de atividade serotoninérgica. Na população geral de ratos, é

esperada alta variabilidade nos perfis de enfrentamento, ainda que a linhagem Wistar apresente, em geral, baixa agressividade, comparando-a a outras linhagens (Koolhaas et al, 2010).

A deficiência de tiamina é capaz de alterar o comportamento de ratos. Contudo, poucos estudos avaliaram as alterações comportamentais e serotoninérgicas centrais na fase pré-sintomática da deficiência de tiamina. No presente estudo levantamos duas hipóteses, conforme detalhado abaixo.

CAPÍTULO 2 - Hipóteses

a) a deficiência de tiamina induz alterações na valência emocional de estímulos aversivos e tomada de decisão numa situação aversiva de impossível evitação.

b) a deficiência de tiamina altera as concentrações cerebrais de serotonina e ácido 5-hidróxi-indolacético nos substratos cerebrais envolvidos com os comportamentos em estudos.

CAPÍTULO 3 - Objetivos

Geral

Avaliar os efeitos de um episódio subclínico de restrição de tiamina em roedores, sobre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e comportamentais e as relações entre esses diferentes parâmetros.

Específicos

Avaliar:

I. parâmetros emocionais, tais como: reação de luta-fuga e exploração de ambiente novo na presença ou não de estímulo aversivo.

II. parâmetros fisiológicos (peso dos animais, consumo de água e de ração) e neuroquímicos (serotonina:5HT e seu metabolito, ácido 5-hidroxiindolacético:5-HIAA) cortical, hipocampal, talâmico e substância cinzenta periaquedutal;

III. as associações entre as diferentes variáveis determinadas.

CAPÍTULO 4 – Justificativas

A deficiência de tiamina está associada a várias condições importantes em questões de saúde pública, como desnutrição e alcoolismo; sendo que grande parte dos mecanismos fisiológicos e moleculares e as suas relações com disfunções comportamentais permanecem obscuros. Os conhecimentos obtidos de estudos em modelo experimental animal podem apontar estratégias de enfrentamento de algumas destas questões. Em países em desenvolvimento, onde parte significativa da população ainda vive em condições precárias de alimentação, a compreensão dos efeitos da deficiência dessa vitamina se torna ainda mais importante. Por exemplo, uma das hipóteses do presente estudo é que a deficiência tiamina pode alterar a resposta a estímulos aversivos. Em classes socioeconômicas menos favoráveis uma mudança de comportamento induzida pela carência de tiamina pode favorecer a permanência da população nessa condição, uma vez que o enfrentamento de adversidades pode ser comprometido pela deficiência dessa vitamina. Além disto, é importante buscarmos critérios metabólicos para emprego do modelo de restrição de tiamina moderada em relação ao mais utilizado (aparecimento de sinais clínicos graves), contribuindo para a elucidação da progressão sintomática que caracteriza uma deficiência moderada de tiamina. A compreensão desse fenômeno é relevante, uma vez que episódios subclínicos da deficiência de tiamina podem ser frequentes e a falta de conhecimento sobre as características de alterações em processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais pode prejudicar o diagnóstico dessas condições, favorecendo a evolução da doença para estágios irreversíveis. A compreensão da associação entre alterações moleculares que antecedem os sinais clínicos graves, pode também contribuir para o conhecimento das alterações metabólicas que antecedem e estão relacionadas ao mecanismo de morte neuronal induzido pela deficiência dessa vitamina. O modelo de deficiência de tiamina apresenta-se como modelo válido da Síndrome de Wernicke-Korsakoff, sendo importante o conhecimento da sua cinética. Outro ponto a ser destacado é que existem evidências indicando que no quadro de diabetes há alterações nos níveis de tiamina (Thornalley et al, 2007; Mee et al, 2009; Depeint et al, 2007). Neste sentido, a melhor caracterização do modelo pode também auxiliar na elaboração de pesquisas futuras de aspectos relacionados a outras doenças, os quais podem ser abordados

empregando-se este mesmo modelo. Outra contribuição proveniente de estudos similares aos propostos aqui é a elucidação dos substratos neurobiológicos relacionados à aspectos específicos do comportamento, no presente caso, a resposta à estímulos aversivos (enfrentamento).

CAPÍTULO 5 - Métodos

O projeto que deu origem ao presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UFMG, processo 093/2010.

5.1 - Delineamento Experimental:

Ratos Wistar (n=32) foram divididos em dois grupos de tamanho amostral iguais: C, grupo-controle e DT, grupo-deficiente. Após completarem três meses, antes do episódio de deficiência de tiamina, os animais foram submetidos a uma Manipulação Controlada (MC1: detalhada abaixo, item 5.2), cujo objetivo foi avaliar o perfil comportamental em relação à exploração livre na caixa experimental e resistência à captura. Em seguida, os animais DT foram submetidos à dieta deficiente de tiamina por 49 dias, enquanto os animais C receberam ração contendo níveis normais de tiamina. Ambas as rações utilizadas nesta fase foram manipuladas no laboratório (LaNeC), sendo a única diferença nutricional entre ambas a presença ou não de tiamina. Calculamos a duração da dieta (49 dias) a partir de um experimento piloto, sendo este o período imediatamente anterior ao surgimento dos primeiros sinais clínicos da deficiência de tiamina. A ração padrão foi reintroduzida e três dias mais tarde todos os animais foram submetidos à manipulação idêntica à realizada antes do início da dieta. Três dias após a segunda manipulação controlada (MC2) todos os animais foram submetidos a uma exploração de campo aberto, por 4 dias consecutivos. No último dia de exploração do campo aberto os animais foram submetidos a um breve estímulo aversivo incondicionado. Uma semana mais tarde os animais foram sacrificados e amostras de tecido cerebral e de sangue coletadas, e mantidas a -80°C até o dia dos ensaios bioquímicos. As regiões de interesse coletadas foram o hipocampo (HIP), tálamo (TAL), córtex-pré-frontal (CPF) e substância cinzenta periaquedutal (PAG do termo em inglês: *PeriAqueductal Gray*), para posterior dosagem de serotonina (5HT) e ácido 5-hidróxi-indolacético (5HIAA), realizada via Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC, *High Performance Liquid*

Chromatography), conforme detalhado abaixo. Um esquema resumido do delineamento experimental é apresentado abaixo.



Figura 1 – Apresentação gráfica do delineamento experimental

5.2 – Procedimentos de manipulação diária dos animais

Os animais foram recebidos do biotério de criação do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG em gaiolas de polipropileno (N=5 a 7 animais por gaiola). Ao completarem um mês de vida, os animais (N=32) foram divididos aleatoriamente em 8 gaiolas limpas, idênticas (em dimensões, cor, opacidade, geometria, modelo de grade) forradas com 1cm de maravalha, formando grupos de 4 animais que permaneceram juntos até o final do experimento. As gaiolas foram transportadas ao biotério experimental do LaNeC e assim que posicionadas na estante, aleatoriamente numeradas de 1 a 8 e “A”, ou “B”, por alguém que desconhecia completamente o experimento e o procedimento experimental que seria utilizado. Em experimentos anteriores no nosso grupo, já foi observado resíduo de ração (pó) do lado de fora da gaiola, o que poderia prejudicar o experimento, caso animais do grupo deficiente entrassem em contato com tiamina durante a dieta restrita. Portanto, as quatro gaiolas da bandeja superior foram consideradas o grupo “deficiente”, DT (N=16), e as da bandeja inferior, o grupo-controle, C (N=16). As gaiolas foram numeradas da seguinte forma:

. A1, A2, A3, A4 – animais do grupo deficiente, N=4 ratos/gaiola

. B5, B6, B7, B8 – animais do grupo controle, N=4 ratos/gaiola

Nenhum rato morreu ou apresentou sinais clínicos que impossibilitassem os testes realizados, assim, ao final do experimento o total de animais era o mesmo do

início (N=32). A sequência de manutenção semanal das gaiolas (para pesagem dos animais, reposição de água e ração, troca de maravalha) foi determinada aleatoriamente para a primeira manutenção e mantida ao longo do experimento, idem para a sequência de pesagem dos animais de cada gaiola. Para evitar contato dos animais do grupo DT com resíduos de tiamina (decorrentes da pesagem de animais e reposição de ração do grupo C), a manutenção semanal era iniciada pelas gaiolas do grupo DT, em seguida as do grupo C. Este critério não foi mantido na execução dos testes comportamentais, uma vez que foram realizados fora do período de deficiência de tiamina e não havia riscos de contaminação de animais do grupo DT por tiamina. Nestas ocasiões, a sequência foi tomada aleatoriamente para a ordem das gaiolas a serem retiradas para teste e os animais a serem testados.

O biotério experimental do LaNeC é uma sala medindo 2x1m (comprimento x largura) e cerca de 3m de altura. A porta encontra-se numa das extremidades da sala, sendo a maior forma de comunicação do biotério ao meio exterior. Ela permanece fechada todo o tempo, exceto para entrada e saída de gaiolas; o ruído exterior não atinge valor superior a 60 dB e a temperatura interna do biotério é de cerca de 24°C num ciclo controlado de iluminação artificial 12/12h, iniciando-se a fase clara às 7 da manhã, diariamente.

Os animais foram numerados de 1 a 4, independentemente da gaiola. A escolha dos animais a serem numerados foi igualmente aleatória. Os animais marcados como “número 1” recebiam a marcação de apenas um símbolo na base da cauda. Os marcados como “número 2”, dois destes símbolos, 3 para os “número 3” e 4 para os “número 4”. Cada coluna recebeu um símbolo de marcação distintivo e cada grupo, uma cor: C, preto, D, vermelho. As marcações foram feitas utilizando-se caneta hidrocor e precisavam ser refeitas semanalmente. Adotamos este critério ao invés da marcação usual do laboratório uma vez que um dos principais instrumentos de avaliação comportamental utilizado emprega a restrição física do animal pelo experimentador, situação que poderia ser emulada acidentalmente durante o cuidado de rotina dos animais (pesagem e marcação da cauda). Durante a marcação da cauda dos animais é necessário restringir seu movimento, e para realizar marcas distintivas maiores é preciso imobilizar o animal por mais tempo, o que poderia refletir no comportamento observado durante as manipulações controladas. Assim, criamos um esquema de pintura (descrito acima), onde todos os animais puderam ser imobilizados

(pela base da cauda, sem causar dor ou oferecer excessiva resistência ao movimento do animal), pelo mesmo tempo e receberam a mesma quantidade de tinta.

A manutenção das gaiolas foi realizada duas vezes por semana, às terças e sextas-feiras, entre as 10 e 16 horas, dependendo do dia. O processo foi padronizado nos seguintes passos:

- 1 – Retirada da gaiola do biotério, seguindo a sequência aleatória utilizada na primeira manutenção.
- 2 – Pesagem da garrafa de água e troca da água, mantendo o peso final da garrafa obrigatoriamente em 810g, com uma tolerância máxima de 0,5% => registro do consumo de água.
- 3 – Pesagem dos resíduos de ração na grade da gaiola, repondo-se com ração equivalente (C/DT dependendo do grupo) até o peso total de 400g +/- 0,5% => registro do consumo de ração.
- 4 – Retirada dos animais, puxando-os individualmente pela base da cauda rapidamente e posicionando-os na balança para pesagem corporal e imediata transferência à gaiola idêntica, porém limpa e coberta com 1cm de maravalha limpa.
- 5 – Fechamento da gaiola, colocação da garrafa de água e ração, retorno da gaiola à sua posição inicial na estante.

Este processo, para as 8 gaiolas levava cerca de 25 minutos (30, quando era necessário retocar a pintura da cauda dos animais). Os animais não foram manipulados, sendo puxados ou levantados por preensão dorsal em nenhum momento, exceto durante as manipulações controladas e decapitação, razão pela qual adotamos o manejo dos animais levando-os de uma caixa a outra levantando-os pela base da cauda, desde a alocação às gaiolas A1-B8. Conforme mencionado acima, a pintura da cauda ocorria similarmente, com os animais imobilizados pela base da cauda, repousando sobre a bancada, sem levá-los ou imobilizá-los pelas patas dianteiras, conforme realizado durante as manipulações controladas. Sempre que alguma marcação de cauda precisava ser refeita, marcamos todos os animais, com quantidade similar de tinta.



Figura 2 – Bancada de tratamento semanal dos animais (foto à esquerda) e visão interna do biotério experimental (foto à direita). Dentro do biotério existem três blocos de prateleiras. A da esquerda permite o uso de gaiolas individuais (como na foto), assim como gaiolas para grupos de animais (como as utilizadas neste trabalho). Diferentemente das prateleiras à direita, as do grupo à esquerda são formadas por chapas de aço, impedindo a passagem de luz vinda de cima para baixo, mantendo todas as gaiolas ali posicionadas iluminadas de maneira similar.

As gaiolas A1 e B5 (coluna C1) estavam mais ao fundo do biotério, enquanto as A4 e B8 (coluna C4) as mais próximas da porta e as demais entre as colunas C1 e C4.

5.3 – Manipulações Controladas

O experimento de manipulação controlada foi desenvolvido no LaNeC, a partir da avaliação de resistência à captura (Albert & Richmond, 1977; Kalynchuk, Pinel, Treit & Kippin, 1997; Kalynchuk, Pinel & Treit 1998; Kalynchuk et al, 1999; Hannesson, Vacca, Howland & Philips, 2004; Panksepp, Jalowiec, DeEskinazi & Bishop, 1985) e de estudos sobre enfrentamento (Koolhaas et al, 1998, 2010; Mällo et al, 2007a, 2007b; Brunelli & Hofer, 2007, Kikusui, Nishizawa, Takeuchi, & Mori, 2003). O aparato utilizado consiste de uma caixa de acrílico transparente (50x50x50cm) cujo piso estava coberto por 1 cm de maravalha. Na primeira fase do experimento, os animais

são posicionados no centro da caixa e a exploram livremente, com o experimentador presente na sala experimental, mas afastado da caixa. Na segunda fase, o experimentador tenta imobilizar o animal por preensão dorsal, de modo a facultar ao animal fugir da mão ou ser capturado.

Caso paralisado pelo toque do experimentador, o animal era levantado cerca de 10 cm acima do piso da caixa e rotacionado de modo a expor o ventre ao experimentador, forçando seu reflexo de endireitamento. Era facultado ao animal saltar da mão do experimentador nesta fase e voltar à caixa, quando nova tentativa de captura era realizada. Nos casos em que o animal fugia da preensão dorsal, ele podia andar livremente até tornar-se imóvel, quando nova tentativa de captura era realizada. Cada fase teve duração de 30 segundos e um período de 15 segundos foi empregado antes e após o animal ser colocado na caixa. Todo o procedimento foi gravado em vídeo e os comportamentos avaliados posteriormente. As vocalizações ultrassônicas foram registradas utilizando-se um microfone condensador AR-125, cuja resposta em frequência varia entre 10 e 100kHz, sendo detectadas através de *software* fornecido pelo fabricante.

Foram avaliadas três categorias comportamentais principais: *imobilidade e movimentação*, na primeira fase; e *resistência à captura*, na segunda fase. Ao invés de adotarmos o escore proposto por Albert & Richmond (1977) para a resistência à captura, quantificamos os comportamentos dos animais em termos da duração de cada classe comportamental, como por exemplo, permanecer imóvel durante a manipulação. Contudo, foram também observados comportamentos que não eram estritamente imobilidade ou movimentação, como por exemplo, movimentos de cabeça e patas dianteiras sem deslocamento do centro de gravidade ou exploração vertical da caixa. Estes comportamentos intermediários foram reunidos em duas outras categorias comportamentais, exclusivamente para a primeira fase da manipulação, relativas à redução na exploração ou início de movimentação após ter ficado imóvel por alguns instantes, sem que um padrão de trajetória fosse identificado, sendo este comportamento nomeado “avaliação de risco”. Da mesma forma quantificamos os episódios em que o animal sustentou-se apenas nas patas traseiras, adotando posição ereta, podendo ou não apoiar as patas dianteiras nas paredes da caixa experimental. Este comportamento foi nomeado “exploração vertical”. Estes comportamentos foram quantificados utilizando-se o *software* gratuito *Etholog* (Ottoni,

2000), em função de sua duração, em segundos. O *Etholog* fornece a sequência de ocorrência destes comportamentos, mas consideramos apenas a duração total em segundos, por animal, por comportamento, uma vez que buscamos neste trabalho minimizar o efeito da variabilidade individual, tendo em vista uma descrição mais geral e sucinta dos comportamentos observados e, sobretudo, os impactos mais evidentes e recorrentes (logo, menos relativos à variabilidade individual) do episódio de restrição de tiamina. A tabela 1 informa as seis categorias comportamentais consideradas e seus critérios de mensuração. Conforme mencionado acima, a grandeza utilizada em todas as medidas foi duração total, em segundos.

Categoria Comportamental	Critério/Descrição	Fase
AMBULAÇÃO	Deslocamento do centro de gravidade no plano horizontal paralelo ao piso da caixa.	1- Exploração
IMOBILIDADE	Manutenção da posição do centro de gravidade – imobilidade –, sendo considerados movimentos suaves da cabeça e do corpo	1- Exploração
EXPLORAÇÃO VERTICAL	Posição ereta do animal, apoiando-se ou não nas paredes da caixa;	1- Exploração
AVALIAÇÃO DE RISCO	Ao permanecer imóvel, observando-se giros de corpo sem deslocamento da posição do centro de gravidade; e/ou movimentação da cabeça seguido de mudança de posição na caixa	1- Exploração
LUTA	Tentativa bem sucedida (ou não) de escapar da preensão dorsal realizada pelo experimentador	2- Captura
PARALISADO	Imobilidade ao ser tocado pelo experimentador, permitindo sua captura	2- Captura

Tabela 1 – Categorias Comportamentais mensuradas na Manipulação Controlada

5.4 – Exploração de Campo Aberto

Utilizou-se uma arena retangular (100x80x60cm), pintada de preto em seu interior, no chão de uma sala branca, fechada e iluminada como ambiente a ser explorado pelos ratos por quatro dias consecutivos/sessões. As sessões duravam 4

minutos e a movimentação dos ratos foi gravada em vídeo, com o experimentador fora da sala durante toda a sessão. Analisou-se a trajetória dos animais considerando-se a distância percorrida e o movimento do animal no plano do piso da caixa, desconsiderando-se a exploração vertical e demais comportamentos, como por exemplo, *grooming*, *licking* etc. Os dados de trajetória foram obtidos a partir do *software* gratuito *Ethowatcher* (Crispim-Junior et al, 2012) e, posteriormente analisados no LaNeC, conforme descrito abaixo. No último dia, após o primeiro momento de exploração livre do campo aberto, foi disparado um estímulo sonoro aversivo (tom artificial de frequência igual a 22kHz e amplitude 90dB) gerado artificialmente, de duração igual a dois minutos. Ao completar quatro minutos de teste os animais eram retirados do campo aberto e transferidos ao biotério experimental.

5.4.1 – Configuração do *Ethowatcher*

O *Ethowatcher* lê arquivos no formato AVI e a partir destes cria um traçado representativo da trajetória dos animais, apresentando estes dados tanto graficamente quanto em formato de arquivo de valores separados por vírgula.CSV, compatível com o MS-Excel. Antes de entrarmos com os dados no *Ethowatcher*, é necessário converter os arquivos para o formato .AVI, em escala de cinza, numa resolução de 320x240 pixels e uma taxa de amostragem de 15 frames por segundo. É recomendável o tratamento das imagens antes de analisadas no *Ethowatcher*. Os criadores do programa recomendam o *software Virtual Dub*, que utilizamos no pré-tratamento das imagens. Simplificadamente, o tratamento dado às imagens foi no sentido de aumentar ao máximo o contraste entre o fundo escuro (campo aberto) e o animal branco (rato da linhagem Wistar). Este procedimento minimiza os erros de identificação de posição do *Ethowatcher*, que em situações de baixo contraste gera artefatos de trajetória decorrentes de erros na localização do animal. O pré-processamento das imagens minimizou este efeito de modo que não foi observado erro de localização nos vídeos utilizados.

Após a importação dos vídeos, é necessário definir o ponto de início e término das análises. Consideramos o início da exploração o momento em que o

experimentador posiciona o animal e deixa-o sozinho na sala de testes. O tempo decorrido entre posicionar o animal e sair da sala é da ordem de 5-10 segundos, que em relação ao tempo de exploração (cerca de 210 segundos – 3 minutos e meio) pode ser desconsiderado para os fins de análise de trajetória e distância ao centro da arena – objetivos do emprego da exploração de campo aberto neste trabalho. Considerou-se o fim da exploração o momento em que o experimentador entrava na sala de testes para retirar o animal, sendo desconsiderados os comportamentos de exploração e resistência à captura no campo aberto, visto que o objetivo da tarefa era avaliar a exploração na ausência do experimentador e não a resistência à captura, previamente avaliada no experimento de Manipulação Controlada.

O *Ethowatcher* determina a posição do animal – através das imagens captadas no vídeo - considerando o contraste animal/fundo em cada *frame*. Além disto, avalia a possível orientação da cabeça do animal em relação ao tronco, em graus, por *frame*. Ao final do processo de determinação da trajetória e informadas as medidas do campo aberto, o *software* calcula a distância total percorrida, assim como gera uma tabela contendo a localização do animal, por *frame*, em pixels e em centímetros. No particular deste trabalho, foi observada uma relação *pixel/cm* igual a 0,28.

5.5 – Seleção das regiões cerebrais de interesse no presente estudo

Os estilos de enfrentamento estão fortemente associados ao processamento das emoções (Koolhaaset al, 1999). Assim, igualmente ao sistema límbico, sendo este o provável substrato biológico dos estilos de enfrentamento (Koolhaas, 2010). Por outro lado, a deficiência de tiamina ocasiona alterações em diversos parâmetros serotoninérgicos centrais associados ao processamento das emoções, dentre as quais destacamos como regiões de interesse o tálamo (Vigil et al, 2011; Vetreno et al, 2012), o hipocampo (Butterworth, 1982), a substância cinzenta periaquedutal (Vetreno et al, 2012), o hipocampo (Butterworth, 1982), e o neocórtex (Howe, Sutor & Zieglgänsberger, 1987). Resumimos abaixo as características neuroanatomicas funcionais que nos levaram a escolher as quatro estruturas acima mencionadas como regiões de interesse.

Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG): está associada às respostas defensivas inatas e aprendidas (Vianna & Brandão, 2003). Esta também associada à expressão de comportamentos emocionais ou de resposta emocional observados em testes comportamentais e a partir dos quais são determinados os perfis de enfrentamento (Koolhaas et al, 1999).

Córtex pré-frontal (CPF): está associado à seleção de resposta, organização do comportamento e tomada de decisão (Vertes, 2002). Regula a expressão do medo no modelo de condicionamento ao contexto - *freezing* - através da amígdala, que estima a valência emocional do estímulo aversivo, predispondo o cérebro a emitir respostas comportamentais perante uma situação de perigo (Padilla-Coreano, Do-Monte & Quirk, 2012; Carvalho et al, 2006).

Hipocampo (HIP): está associado à resposta de medo ao contexto e à consolidação de memórias aversivas. Está associado ao processamento de emoções (Guimarães et al, 1993).

Tálamo (TAL): atua, dentre outras funções, enquanto conexão funcional entre PFC e HIP (Vertes, 2002). Também participa da aquisição, consolidação e recuperação da memória de medo ao contexto (Padilla-Coreano, 2011). Uma das principais regiões afetadas em condições de deficiência de tiamina (Vigil et al, 2010).

5.6 – Determinação das concentrações de serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido hidroxiindolacético (5-HIAA)

Os animais foram sacrificados por decapitação, o cérebro separado e as regiões dissecadas. As amostras de tecido cerebral – córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HIP), tálamo (TAL) e substância cinzenta periaquedutal (PAG) foram pesadas e congeladas a -80°C até o dia do ensaio. Quando descongeladas, para dosagem de 5HT e 5HIAA, as amostras foram homogenizadas em solução de ácido perclórico (0,1M), centrifugadas e 200 µL do sobrenadante injetado no cromatografo do tipo HPLC. Utilizou-se para separação uma coluna C18 de fase reversa. A fase móvel foi constituída por mistura homogênea de bissulfeto de sódio, ácido cítrico e EDTA

dissolvidos em solução de etanol 9%v/v (Pires, Pereira, Oliveira-Silva, Franco, Ribeiro, 2005). A detecção de 5-HT e do metabolito 5-HIAA foi realizada utilizando-se detector eletroquímico e as concentrações de 5-HT e 5-HIAA determinadas em relação às respectivas curvas padrão elaboradas a partir de concentrações conhecidas desses compostos. Utilizamos para as determinações da concentração de 5HT e 5HIAA as áreas dos picos detectados nos cromatogramas nos seguintes tempos de retenção: 5-HT foi em média de 6 minutos e 5-HIAA foi em média de 14 minutos.

5.7. Análises Estatísticas

Refinamos a análise estatística empregando os modelos de Análise Fatorial e Análise de Componentes Principais no tratamento dos dados referentes às manipulações controladas. As amostras não preencheram os requisitos estatísticos para realização destas análises (medida de adequação da amostra de Kaiser-Meyer-Olkin $\geq 0,6$; Teste de esfericidade de Bartlett significativo – $p < 0,05$), sendo, portanto, descartados tais métodos no presente estudo. As variáveis relativas à trajetória na exploração de campo aberto foram processadas segundo descrito no item 5.2.1. As demais variáveis foram avaliadas utilizando-se um critério padronizado, descrito abaixo.

Utilizando-se o MATLAB, criamos um código que importava os dados obtidos nas Manipulações Controladas e Determinações das concentrações de 5-HT e 5-HIAA, separando em vetores distintos os dados referentes a animais dos grupos controle e deficiente e, em seguida, realizava-se o teste de Shapiro-Wilk para determinação da normalidade da amostra. Utilizamos este teste devido à sua boa sensibilidade de detecção de normalidade em amostras pequenas (Saculnggan & Balase, 2013; Razali & Wah, 2011). Conforme descrito a seguir, em alguns casos averiguamos se havia diferenças em médias (ou medianas) entre as variáveis analisadas. Em outros, realizamos análises de correlação bivariada e parcial na determinação de possíveis relações entre as variáveis mensuradas. Caso as duas amostras utilizadas seguissem uma distribuição normal, era realizado: teste-t, para diferença entre médias; teste-t pareado, para diferenças entre médias pré e pós

deficiência; correlação bivariada e parcial utilizando-se o método de Pearson. Caso alguma das amostras não seguisse distribuição normal, era realizado: teste-U, de Mann-Whitney, em analogia ao teste-t para distribuições independentes; teste de Wilcoxon, em analogia ao teste-t pareado; e método de Spearman para as correlações bivariadas e parciais. O código exportava os resultados de volta ao Excel, onde organizamos as tabelas apresentadas e a partir de onde geramos os gráficos mostrados no presente estudo. Utilizamos os dados brutos (i.e., sem remover valores extremos), uma vez que não temos evidências de que todas as variáveis se comportam de acordo com distribuições normais, ou distribuições conhecidas. Além disto, do ponto de vista prático, utilizando o método Tau de Thompson (Thompson, 1985) implementado no MATLAB (Sohrabinia, 2012), encontramos poucas diferenças entre os dados agrupados em médias (ou medianas), fixando-se arbitrariamente o número máximo de *outliers* em 25% da amostra (ou seja, 4 medidas de um total de 16). Uma vez que os dados brutos representam mais fidedignamente as medidas realizadas, optamos por trabalhar com estes.

5.8 – Modelamento Matemático da Evolução do Peso de Animais dos grupos C e DT

Ajustamos as medidas de peso dos animais dos grupos C e DT a uma função matemática que representa processos biológicos de crescimento. Esta função está descrita a seguir:

$$\frac{dP}{dt} = aP - bP^2 \text{ (função 1)}$$

A função 1 indica que a variação no peso corporal ocorre devido a um fator de crescimento e um de decaimento, de evolução mais lenta. Assim, no início do desenvolvimento dos ratos, há um predomínio do parâmetro crescimento e mais ao final do desenvolvimento, uma tendência ao decrescimento. Esta função após integrada, é da seguinte forma:

$$P(t) = \frac{ae^{ac+at}}{be^{ac+at}+1} \text{ (função 2)}$$

A função 2 indica que o valor de peso medido é função dos fatores de crescimento (a) e decrescimento (b) associados na forma de um quociente de exponenciais, em função do tempo, t. Esta função (2) não se ajustou bem aos dados do grupo DT durante restrição dietária de tiamina, sendo substituída por outra da mesma família (exponencial), ainda que como uma diferença de exponenciais ao invés de um quociente, conforme indicado na função (3):

$$\frac{dP}{dt} = cde^{-dt} - abe^{-bt} \text{ (função 3)}$$

De acordo com a função 3, a variação no peso corporal ocorre em virtude de dois fatores de crescimento (c e d) e dois de decrescimento (a e b). Após integrada, esta função é da forma descrita na função (4), a seguir:

$$P(t) = ae^{-bt} + ce^{-dt} \text{ (função 4)}$$

Os valores dos parâmetros a,b,c, e d e respectivos valores de ajuste da curva aos dados experimentais (R^2 e Soma do Erro Quadrático da Interpolação) estão descritos na seção “Resultados”. Utilizamos o MATLAB v7.11, e o programa interno ao MATLAB “Curve Fitting Toolbox” para tanto estimarmos os parâmetros quanto desenharmos os gráficos representativos das funções descritas acima.

CAPÍTULO 6 – Resultados

6.1 – Variações do peso corporal e consumo de água e ração

Observou-se redução significativa no ganho de peso corporal dos animais durante o episódio de deficiência, assim como no consumo de água e ração. Os animais deficientes (DT) estavam, ao final do período de deficiência, em média 40% mais leves do que os do grupo-controle (C, linha continua), ingerindo 35% menos água e 70% menos ração. Há diferença significativa ao longo do episódio para as três medidas realizadas, conforme revelado por ANOVA 2x26 com medidas repetidas. Peso corporal: $F_{(1,25)}=39,973$; $p=0,001$; consumo de água: $F_{(1,25)}=7,116$; $p=0,037$; consumo de ração: $F_{(1,25)}=113,115$; $p<0,001$. Os dados estão representados nas **figuras 3, 4 e 5**, respectivamente. Conforme as tabelas A1-3 (em anexo), a ração manipulada (deficiente e controle) foi introduzida na data referente à nona medida; e foi substituída pela ração comercial na vigésima segunda medida. Nas medidas imediatamente anterior e posterior foram realizadas as manipulações comportamentais controladas 1 e 2, respectivamente. Considerando-se as medidas de peso independentes de valores anteriores da mesma medida (sem medidas repetidas) e realizando um teste de equivalência de médias entre os grupos C e DT encontramos diferenças significativas (p -valor $<0,05$) entre o peso corporal médio dos grupos a partir da décima primeira medida (equivalendo a 5 dias após o início da oferta de ração manipulada – DT e C). Repetimos este procedimento para os dados referentes ao consumo de água e ração e observamos: a) consumo de água – diferença significativa nas medidas 14 e 15 (respectivamente, 15 e 18 dias de oferta da ração manipulada – DT e C) e 19 a 23 (39 a 49 dias de oferta da ração manipulada – DT e C); b) consumo de ração – diferença significativa da medidas 10 a 23 (respectivamente, 5 dias de oferta de ração manipulada – DT e C ; três dias após a recuperação da deficiência, dos animais do grupo DT) e 25 a 26 (respectivamente, 10 e 14 dias após a recuperação da deficiência). Estes dados estão descritos em detalhe nos anexos A1-3. As **figuras 2 a 4** apresentam graficamente a evolução do peso corporal, consumo de água e de ração ao longo do experimento, respectivamente. Indicamos, por setas, o período de início e final da oferta de ração manipulada,

contendo níveis normais de tiamina para o grupo C e deficiente em tiamina (0% de tiamina), para o grupo DT. Antes e após o episódio de restrição dietária, os animais de todos os grupos foram alimentados com ração comercial, contendo níveis normais de tiamina.

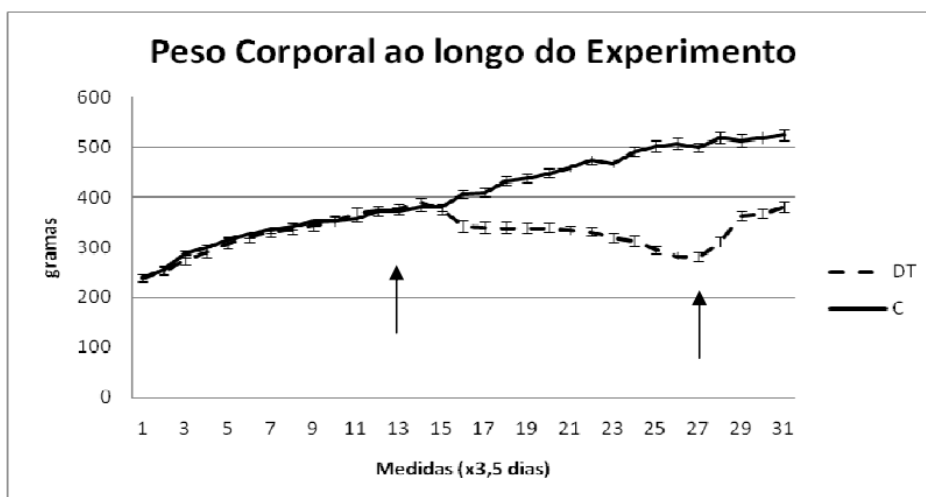


Figura 3 – Evolução do peso corporal (em gramas) médio ao longo do experimento. DT= grupo deficiente de tiamina e C=grupo controle. Cada ponto (medida) corresponde ao valor médio de medidas expresso como 3,5 dias vezes o número de dias indicado na abscissa. Legenda: medida 13 – introdução da ração manipulada; medida 27 –reintrodução da ração comercial. Medidas 12 e 28: Manipulações Controladas 1 e 2, respectivamente; Medida 30: segundo dia de exploração do campo aberto. As setas indicam o período de oferta da ração manipulada.

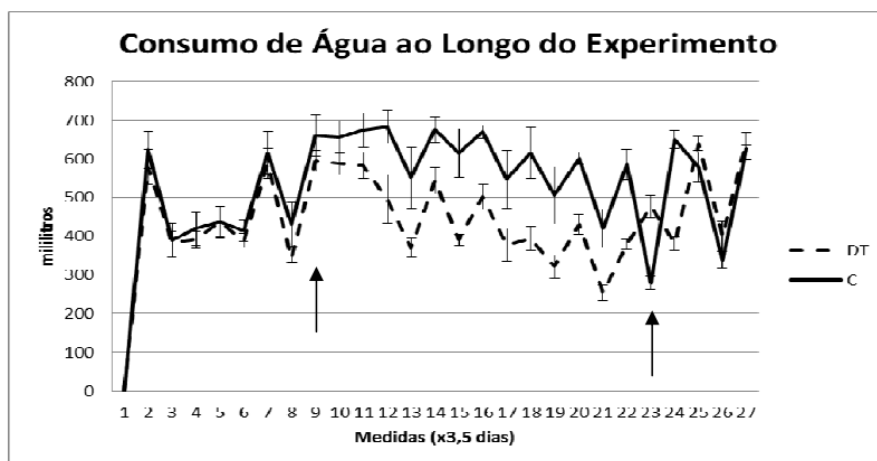


Figura 4 – Consumo de água (em mL) ao longo do experimento. DT=grupo deficiente de tiamina e C=grupo controle. Cada ponto (medida) corresponde ao valor médio de medidas expresso como 3,5 dias vezes o número de dias indicado na abscissa. Legenda: medida 9 – introdução da ração manipulada; medida 23 –reintrodução da ração padrão. Medidas 8 e 24: Manipulações Controladas; Medida 26: segundo dia de exploração do campo aberto. As setas indicam o período de oferta da ração manipulada.

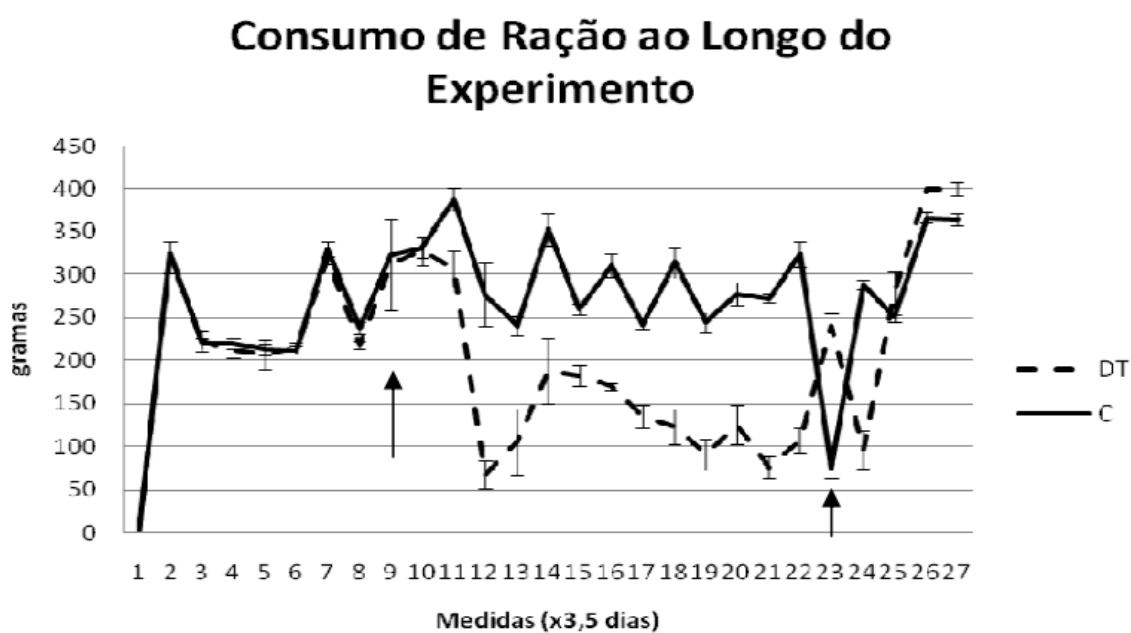


Figura 5 – Consumo médio de ração (gramas) ao longo do experimento. DT=grupo deficiente de tiamina e C=grupo controle. Cada ponto (medida) corresponde ao valor médio de medidas expresso como 3,5 dias vezes o número de dias indicado na abscissa. Legenda: medida 9 – introdução da ração manipulada; medida 23 –reintrodução da ração padrão. Medidas 8 e 24: Manipulações Controladas; Medida 26: segundo dia de exploração do campo aberto. As setas indicam o período de oferta da ração manipulada.

6.2 – Medidas Comportamentais

6.2.1 – Manipulações Controladas

Apresentamos na **tabela 2** os valores médios da duração dos comportamentos observados durante as Manipulações Controladas 1 e 2. Indicamos para cada medida o valor da média (ou mediana, para os dados que não seguem uma distribuição normal), o desvio-padrão, variância e erro padrão da medida, por grupo. C, grupo-controle. DT, grupo-deficiente. Os valores médios estão expressos, graficamente, na **figura 6**.

MEDIDA Categorias Comportamentais	MÉDIA Controle	MÉDIA Def. Tiamina	Distribuição NORMAL. Controle	Distribuição NORMAL. Def. Tiamina
Manipulação Controlada 1 (MC1)				
IMOBILIDADE MC1	2,53± 2,01	3,085±0,95	NÃO	NÃO
AVALIAÇÃO DE RISCO MC1	1,72±0,67	0,27±0,69	NÃO	NÃO
EXPLORAÇÃO VERTICAL MC1	8,37±1,73	6,28±1,2	SIM	NÃO
AMBULAÇÃO MC1	13,2±2,026	16,63±1,3	SIM	SIM
LUTA MC1	16,89±2,44	22,7±2,18	SIM	SIM
PARALISADO MC1	14,68±2,26	9,23±2,04	SIM	SIM
Manipulação Controlada 2 (MC2)				
IMOBILIDADE MC2	9,73±2,14	14,65±1,83	SIM	SIM
AVALIAÇÃO DE RISCO MC2	0±0,93	3,21±0,6	NÃO	NÃO
EXPLORAÇÃO VERTICAL MC2	4,66±1,94	3,34±0,91	NÃO	NÃO
AMBULAÇÃO MC2	10,44±1,95	5,78±1,35	SIM	NÃO
LUTA MC2	16,49±1,69	17,48±1,95	SIM	SIM
PARALISADO MC2	13,82±1,79	11,71±1,86	SIM	SIM

Tabela 2 – Descrição estatística das medidas realizadas nas Manipulações Controladas 1 e 2, para os grupos controle e deficiente em tiamina. MC1 – primeira manipulação controlada, pré-deficiência; MC2 – segunda manipulação controlada, pós-deficiência. MÉDIA C e MÉDIA DT apresentam os valores médios ou medianos e respectivos erros-padrão de medida, para cada variável avaliada.

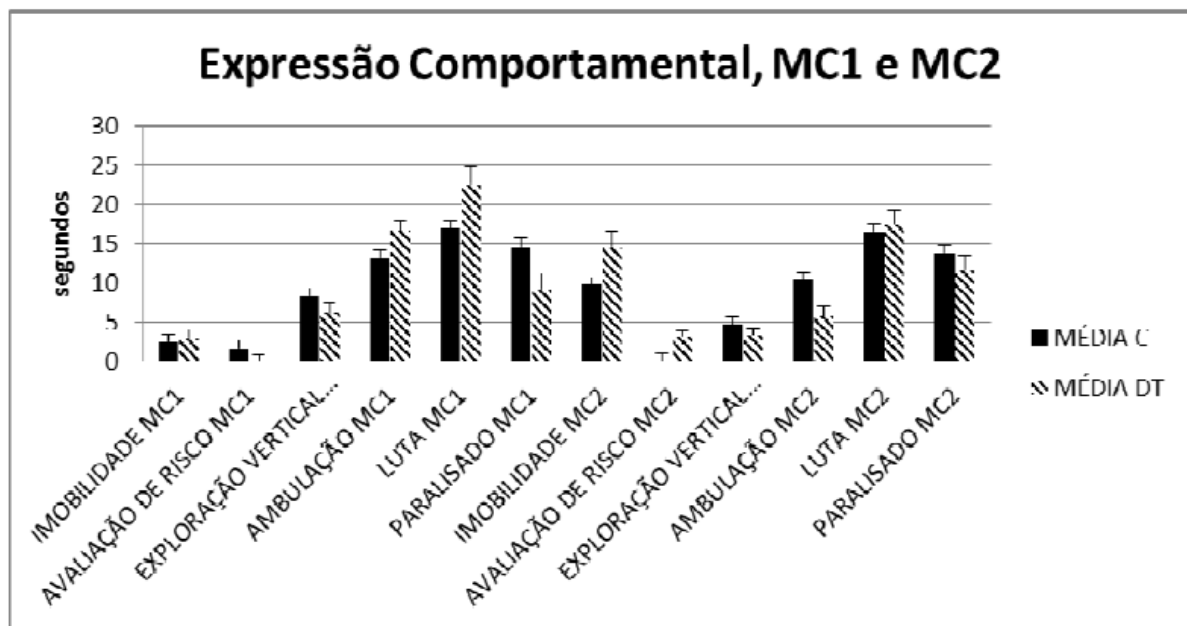


Figura 6 –Duração média (em segundos) dos comportamentos observados nas Manipulações Controladas 1 e 2: MC1 e MC2, respectivamente. MC1 – primeira manipulação controlada, pré-deficiência; MC2 – segunda manipulação controlada, pós-deficiência.

A **tabela 3** apresenta os resultados das comparações entre as médias dos grupos C e DT para as Manipulações Controladas 1 e 2 (MC1 e MC2, respectivamente). Utilizamos teste-t para os casos onde ambas as medidas comparadas apresentam distribuição normal; teste-u (Mann-Whitney), caso contrário. A coluna “resultado” apresenta o valor da estatística t ou estatística z, a depender do teste utilizado e a coluna “p-valor” o respectivo valor de “p”.

MEDIDA Categorias Comportamentais	TESTE	RESULTADO	P VALOR
Manipulação Controlada 1 – Pré episódio de deficiência			
IMOBILIDADE MC1	TESTE-U	0,24	0,8
AVALIAÇÃO DE RISCO MC1	TESTE-U	0,41	0,68
EXPLORAÇÃO VERTICAL MC1	TESTE-U	-0,21	0,83
AMBULAÇÃO MC1	TESTE-T	-1,42	0,16
LUTA MC1	TESTE-T	-1,78	0,085
PARALISADO MC1	TESTE-T	1,79	0,084
Manipulação Controlada 2 – Pós episódio de deficiência			
IMOBILIDADE MC2	TESTE-U	-1,74	0,091
AVALIAÇÃO DE RISCO MC2	TESTE-U	-0,92	0,36
EXPLORAÇÃO VERTICAL MC2	TESTE-U	0,64	0,52
AMBULAÇÃO MC2	TESTE-U	1,37	0,17
LUTA MC2	TESTE-T	-0,38	0,71
PARALISADO MC2	TESTE-T	0,82	0,42

Tabela 3 – Teste de diferença entre médias dos grupos C e DT para a duração dos comportamentos mensurados. MC1 – primeira manipulação controlada, pré-deficiência; MC2 – segunda manipulação controlada, pós-deficiência. Consideramos diferença significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

Apresentamos na **tabela 4** o percentual médio de tempo gasto em relação ao tempo total da etapa da manipulação controlada (coluna “% total”). O painel superior indica estes resultados para o grupo C e o inferior, grupo DT. As colunas “delta C” e “delta DT” apresentam a diferença entre o percentual observado na MC2 e a MC1, por grupo e por medida comportamental realizada.

Grupo Controle (C)			
MEDIDA			
Categorias Comportamentais	% TOTAL MC1	%TOTAL MC2	DELTA (%MC2-%MC1)
IMOBILIDADE	8,45	38,17	29,72
AVALIAÇÃO DE RISCO	5,73	0	-5,73
EXPLORAÇÃO VERTICAL	27,92	15,55	-12,37
AMBULAÇÃO	57,9	46,28	-11,62
LUTA	51,29	52,98	1,69
PARALISADO	48,71	47,02	-1,69
Grupo Deficiente em Tiamina (DT)			
MEDIDA			
Categorias Comportamentais	%TOTAL MC1	%TOTAL MC2	DELTA (%MC2-%MC1)
IMOBILIDADE	12,72	53,88	41,16
AVALIAÇÃO DE RISCO	0,9	10,72	9,82
EXPLORAÇÃO VERTICAL	25,95	11,13	-14,82
AMBULAÇÃO	60,43	24,27	-36,16
LUTA	69,68	60,26	-9,42
PARALISADO	30,32	39,74	9,42

Tabela 4 – Percentual de tempo gasto pelos animais de cada grupo (painel superior: grupo C e painel inferior: grupo DT) expressando cada uma das seis categorias comportamentais avaliadas nas Manipulações Controladas 1 e 2. MC1 – primeira manipulação controlada, pré-deficiência; MC2 – segunda manipulação controlada, pós-deficiência.

Realizamos teste pareado de igualdade de médias comparando, para cada grupo, cada medida comportamental avaliada. Estes dados estão expressos na tabela 5. As colunas “delta C” e “delta DT” reproduzem os valores expressos na tabela 4. As colunas “teste C” e “teste DT” indicam o teste pareado utilizado. As colunas “resultado C” e “resultado DT” apresentam o valor da estatística t e estatística z referentes aos testes realizados. Consideramos diferenças significativas se p-valor <0,05.

Grupo Controle (C)				
MEDIDA				
Categorias	DELTA	TESTE Pareado	RESULTADO :	
Comportamentais	(%MC2-%MC1)	MC2 x MC1	Valor de t ou z	P VALOR
IMOBILIDADE	29,72	WILCOXON	-1,19	0,23
AVALIAÇÃO DE RISCO	-5,73	WILCOXON	-0,23	0,81
EXPLORAÇÃO VERTICAL	-12,37	TESTE-T	-0,21	0,84
AMBULAÇÃO	-11,62	TESTE-T	1,078	0,3
LUTA	1,69	TESTE-T	0,14	0,89
PARALISADO	-1,69	TESTE-T	0,3	0,76
Grupo Deficiente em Tiamina (DT)				
IMOBILIDADE	41,16	WILCOXON	-3,41	0,00064
AVALIAÇÃO DE RISCO	9,82	WILCOXON	-1,1	0,27
EXPLORAÇÃO VERTICAL	-14,82	WILCOXON	-2,48	0,013
AMBULAÇÃO	-36,16	TESTE-t	-3,36	0,00078
LUTA	-9,42	TESTE-t	2,4	0,03
PARALISADO	9,42	TESTE-t	-1,27	0,22

Tabela 5 – Dados dos teste de diferença pareado entre médias de duração dos comportamentos mensurados em MC1 e MC2, dos grupos C (painel superior) e DT (painel inferior). MC1 – primeira manipulação controlada, pré-deficiência; MC2 – segunda manipulação controlada, pós-deficiência. Consideramos diferença significativa se p-valor < 0,05.

6.2.2 – Exploração de Campo Aberto

Apresentamos a seguir os resultados relativos às distâncias percorridas durante a exploração de campo aberto. Realizando ANOVA fatorial 2x4 com medidas repetidas no último elemento, encontramos o resultado: $F(1,3) = 656,79$; $p < 0,0001$. Desconsiderando-se o efeito do grupo e repetindo o teste obtivemos: $F(3) = 19,871$; $p < 0,0001$. Os dados descritivos das distâncias percorridas estão expressos **na tabela 6 e figura 7**. Consideramos o valor da mediana $\pm$ EPM ao invés da média, no caso de distribuições não-paramétricas.

Distância Percorrida no Campo Aberto				
Sessões/Dias	Grupo Controle (C) Média ± EPM	Grupo Deficiente Tiamina (DT) Média ±EPM	Distribuição NORMAL Grupo C	Distribuição NORMAL Grupo DT
DIA 1	1345,89±24,88	936,42±22,05	SIM	SIM
DIA 2	1180,96±27,45	885,33±22,61	SIM	SIM
DIA 3	992,21±28,99	509,75±22,15	SIM	SIM
DIA 4	752,84±18,01	357,74±16,8	SIM	SIM

Tabela 6 – Descrição estatística das distâncias percorridas (em cm) durante a exploração de campo aberto. Nas colunas Média C e Média DT estão apresentados o valor médio e respectivo erro-padrão de medida (EPM), para cada sessão/dia realizada, por grupo.

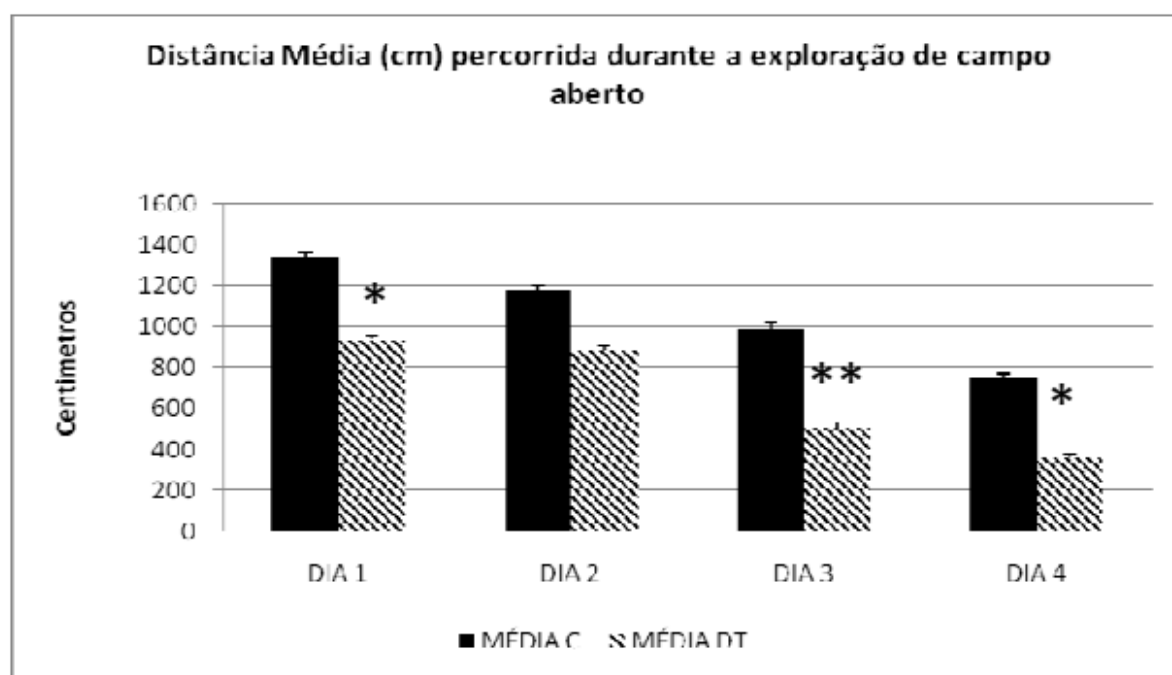


Figura 7 – Descrição gráfica das médias das distâncias percorridas durante a exploração de campo aberto, nas quatro sessões realizadas nos dias consecutivos, 1, 2, 3 e 4. Observa-se diferença estatística entre as médias dos grupos C e DT para os dias 1, 3 e 4 * $p < 0,015$, ** $p < 0,011$.

Comparamos as médias das distâncias percorridas, por dia, entre os grupos utilizando o teste-t. Estes resultados estão expressos na tabela 7.

Distância Percorrida Comparação entre os grupos C e DT			
Sessões /Dias	TESTE	Resultado	P-VALOR
DIA 1	TESTE-t	2,6	0,014
DIA 2	TESTE-t	1,92	0,064
DIA 3	TESTE-t	3,76	0,001
DIA 4	TESTE-t	2,64	0,013

Tabela 7 – Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias das distâncias percorridas durante a exploração de campo aberto, comparando-se os grupos C e DT. Consideramos diferença significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

6.3 – Concentrações de serotonina (5-HT) e ácido 5-hidróxi-indolacético (5-HIAA)

A **tabela 8** indica os valores médios, ou medianos das concentrações de 5-HT nas regiões de interesse, nomeadas na primeira coluna, por grupo (C e DT). Consideramos a mediana, ao invés da média, para distribuições não-paramétricas. Legenda: PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal (utilizamos a sigla inglesa: *PAG* – *Periaqueductal Grey*); TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal. Estes dados estão indicados graficamente na **figura 8**.

Concentrações de 5-HT (ng/g)				
MEDIDA Região Cerebral	MEDIA $\pm$ EPM Controle	MEDIA $\pm$ EMP DT	Distribuição NORMAL Controle	Distribuição NORMAL DT
PAG	2049,78 $\pm$ 328,85	1668,24 $\pm$ 530,35	SIM	NÃO
TAL	628,93 $\pm$ 53,66	600,16 $\pm$ 66,44	SIM	SIM
HIP	357,91 $\pm$ 20,93	366,06 $\pm$ 27,64	SIM	SIM
CPF	645,4 $\pm$ 68,93	691,64 $\pm$ 44,78	SIM	SIM

Tabela 8 – descrição estatística das médias das concentrações de 5-HT. MÉDIA C e MÉDIA DT indicam o valor médio, ou mediano da variável avaliada e o respectivo erro-padrão de medida (EPM) para os grupos C e DT. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal.

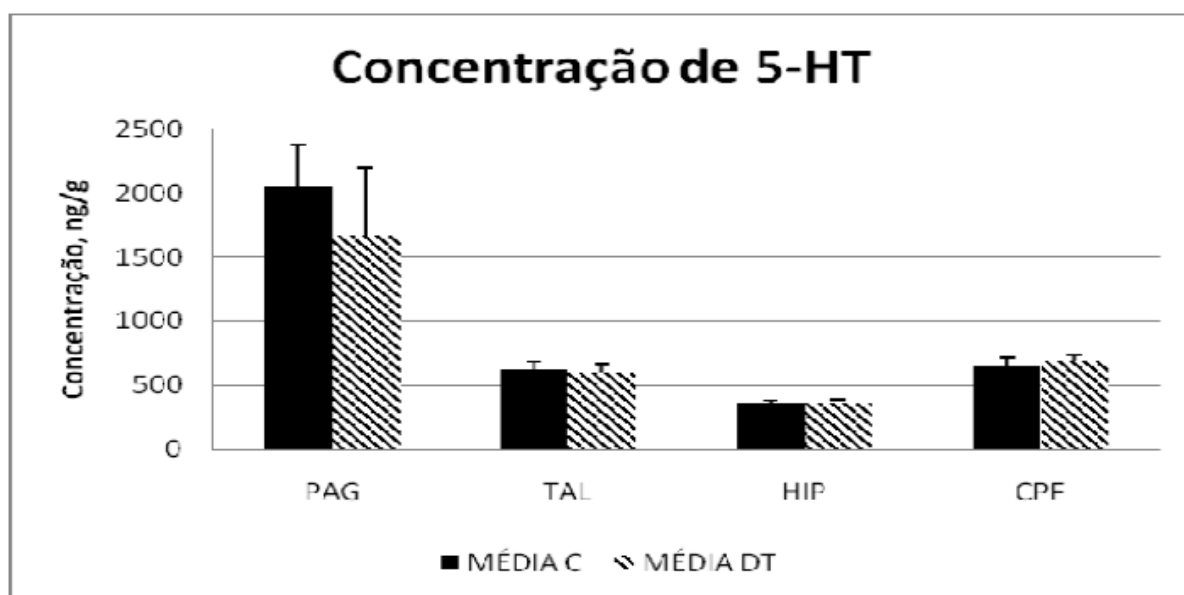


Figura 8 – Descrição gráfica das médias $\pm$ EPM (ng/g) das concentrações de 5-HT, nas regiões cerebrais: PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal.

Comparamos as médias, dos grupos C e DT, das concentrações de 5-HT, por região de interesse, utilizando o teste-t (dados paramétricos) ou o teste-U (nos casos dos dados de alguma das distribuições comparadas não seguirem distribuição normal). Os valores estão também apresentados na tabela 9. Consideramos efeito significativo onde $p\text{-valor} < 0,05$.

Dados das comparações entre as concentrações médias de 5-HT dos grupos C e DT.			
Região Cerebral	TESTE	RESULTADO	P VALOR
PAG	TESTE-t	-1,14	0,25
TAL	TESTE-U	0,46	0,65
HIP	TESTE-t	-0,3	0,77
CPF	TESTE-U	-0,72	0,48

Tabela 9 – Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias e variâncias das concentrações de 5-HT comparando-se animais dos grupos C e DT, por estrutura cerebral. Consideramos diferença significativa se $p\text{-valor} < 0,05$. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal.

A **tabela 10** indica os valores médios, ou medianos das concentrações de ácido 5-hidróxi-indolacético, 5-HIAA, nas regiões de interesse, nominadas na primeira coluna, por grupo. Consideramos a mediana, ao invés da média, para distribuições não-paramétricas.

Concentrações de 5-HIAA (ng/g)				
MEDIDA	MÉDIA ±EPM Controle	MÉDIA ±EMP DT	Distribuição NORMAL Controle	Distribuição NORMAL DT
PAG	3241,88±532,70	6282,48±1154,86	SIM	NÃO
TAL	1621,08±113,05	1884,76±74,53	SIM	SIM
HIP	531,95±27,71	527,59±33,2	SIM	SIM
CPF	943,098±88,20	934,85±45,63	SIM	SIM

Tabela 10– Descrição estatística das médias das concentrações de 5-HIAA. MÉDIA Controle e MÉDIA DT indicam o valor médio, ou mediano da variável avaliada e o respectivo erro-padrão de medida (EPM) para os grupos C e DT.. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal.

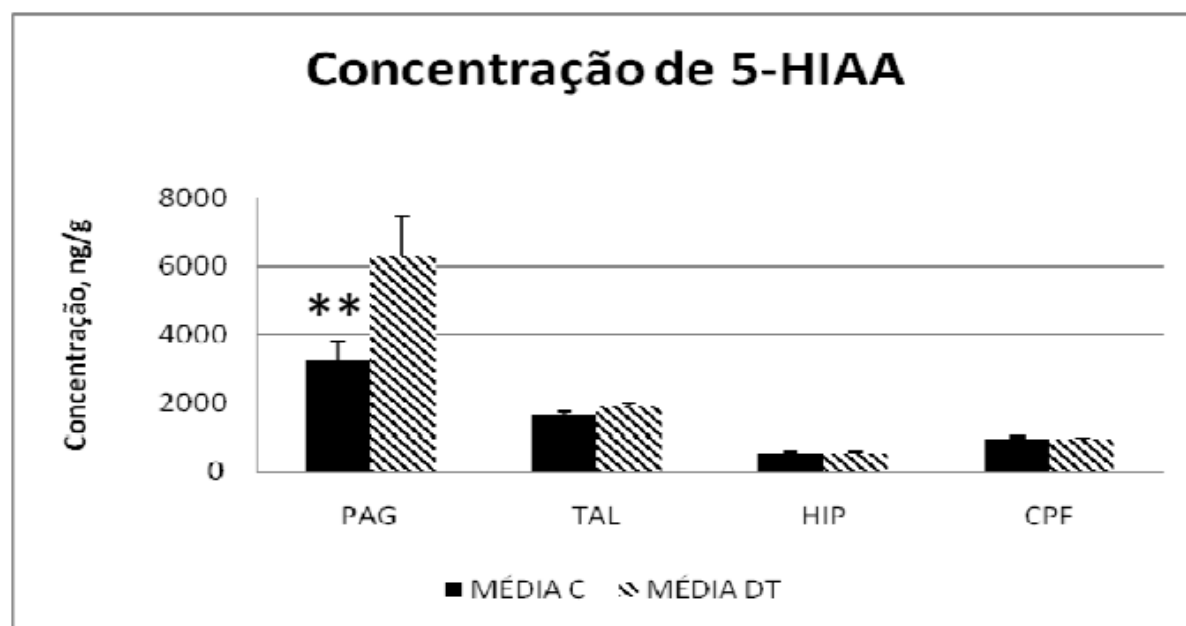


Figura 9 – Descrição gráfica das médias ± EPM das concentrações de 5-HIAA. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal. Diferença significativa, ** $p < 0,01$, entre CxDT na PAG.

Comparamos as médias das concentrações de 5-HIAA dos grupos C e DT, por região de interesse, utilizando o teste-t (dados paramétricos) ou o teste-U (nos casos dos dados de alguma das distribuições comparadas não seguirem distribuição

normal). Estes resultados estão expressos na tabela 11. Consideramos efeito significativo onde $p\text{-valor} < 0,05$.

Dados das comparações entre as concentrações médias de 5-HIAA dos grupos C e DT.			
TAXA	TESTE	RESULTADO	P VALOR
PAG	TESTE-t	-3,61	0,0025
TAL	TESTE-U	-3,62	0,18
HIP	TESTE-t	0,088	0,93
CPF	TESTE-U	0,088	0,57

Tabela 11 – Resultado dos teste-t e teste-u para as concentrações de 5-HIAA comparando-se animais dos grupos C e DT, por estrutura. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal. Consideramos diferença significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

6.3.1 – Taxa de Renovação da serotonina, [5-HIAA]/[5-HT], e correlações entre as concentrações de 5-HT e 5-HIAA

Avaliamos a atividade serotoninérgica tanto a partir das correlações entre as concentrações de 5-HT e 5-HIAA em cada região de interesse (**Tabela 12**), quanto através do cálculo da taxa de renovação de 5-HT, como sendo o quociente entre a concentração de 5-HIAA em relação ao de 5-HT (tabela 13).

Região Cerebral	Grupo Controle			Grupo Deficiente em Tiamina		
	TESTE	Coeficiente de correlação	P VALOR	TESTE	Coeficiente de correlação	P VALOR
PAG	PEARSON	0,894	3,00E-06	SPEARMA N	0,864	0,000015
TAL	SPEARMA N	0,126	0,64	PEARSON	0,223	0,41
HIP	PEARSON	-0,0401	0,88	PEARSON	0,541	0,03
CPF	SPEARMA N	0,656	0,0071	PEARSON	0,528	0,035

Tabela 12 – Resultado dos testes estatísticos de correlação entre as concentrações de 5-HT e 5-HIAA observando-se independentemente animais dos grupos C e DT, por região de interesse. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal. Consideramos diferença significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

A **tabela 13** e a **figura 10** indicam os valores médios ou medianos e respectivos erros-padrão de medida para a taxa de renovação, por região de interesse, denominadas na primeira coluna e grupos controle (C) e deficiente de tiamina (DT).

Taxa de Renovação [5-HIAA]/[5-HT]				
Região Cerebral	Controle MÉDIA C $\pm$ EPM	Def. Tiamina MÉDIA DT $\pm$ EPM	Distribuição NORMAL C	Distribuição NORMAL DT
PAG	1,55 $\pm$ 0,17	2,66 $\pm$ 0,39	NÃO	SIM
TAL	2,55 $\pm$ 0,33	3,19 $\pm$ 0,38	NÃO	NÃO
HIP	1,42 $\pm$ 0,12	1,52 $\pm$ 0,11	NÃO	SIM
CPF	1,69 $\pm$ 0,12	1,42 $\pm$ 0,09	SIM	SIM

Tabela 13 – Descrição estatística da atividade serotoninérgica nas regiões de interesse, denominadas na primeira coluna, a partir da Taxa de Renovação [5-HIAA]/[5-HT]. MÉDIA C e MÉDIA DT indicam o valor médio, ou mediano da variável avaliada e o respectivo erro-padrão de medida (EPM) para os grupos C e DT. NORMAL C e NORMAL DT indicam se a variável avaliada apresentava distribuição normal ou não. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal.

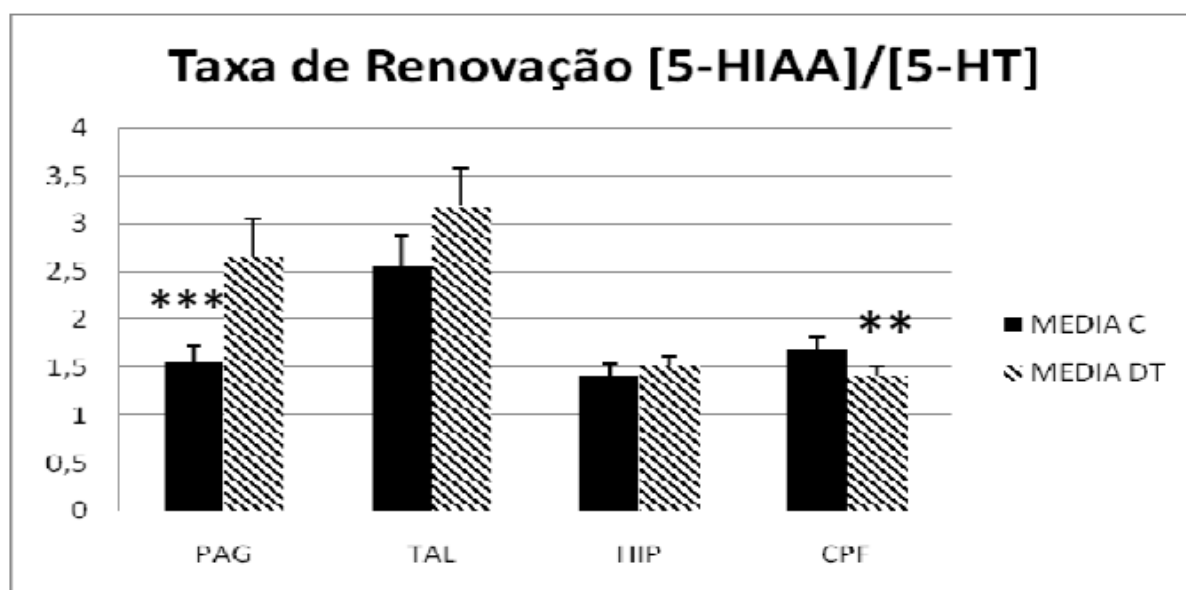


Figura 10 – Representação gráfica da atividade serotoninérgica, nas regiões de interesse, avaliada a partir da taxa de renovação [5-HIAA]/[5-HT], média $\pm$ EPM. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal. Diferenças significativas entre C e DT: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Comparamos as médias da atividade serotoninérgica dos grupos C e DT, através do valor da taxa de renovação, por região de interesse, utilizando o teste-t (dados paramétricos) ou o teste-U (nos casos dos dados de alguma das distribuições comparadas não seguirem distribuição normal). Estes resultados estão expressos na **tabela 14**. Consideramos efeito significativo onde $p\text{-valor} < 0,05$.

Taxa de Renovação Serotoninérgica Controle x Deficiente em Tiamina			
Região Cerebral	TESTE	RESULTADO	P VALOR
PAG	TESTE-U	-3,36	0,0008
TAL	TESTE-U	-1,5	0,13
HIP	TESTE-U	-0,52	0,6
CPF	TESTE-t	3,76	0,002

Tabela 14– Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias e variâncias da atividade serotoninérgica, avaliada a partir da taxa de renovação [5-HIAA]/[5-HT], comparando-se animais dos grupos C e DT, por região cerebral de interesse. PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; TAL – Tálamo; HIP – Hipocampo; CPF – Córtex Pré-Frontal. Consideramos diferença significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

Calculamos as correlações entre as atividades serotoninérgicas observadas, a partir do valor da taxa de renovação nas diferentes regiões cerebrais para cada grupo (C e DT). Na **tabela 15** apresentamos os dados obtidos para as análises entre TAL x PAG e HIP x PAG. Utilizamos o método de Pearson, nos casos das duas medidas analisadas apresentarem distribuição normal; e o método de Spearman, caso contrário. As colunas “resultado C” e “resultado DT” apresentam a força da correlação (R). Consideramos correlação forte se, em módulo, $R > 0,7$; mediana se $0,7 > R > 0,4$ e fraca se $0,4 > R > 0$. São consideradas significativas as correlações cujo $p\text{-valor} < 0,05$.

Dados das análises de correlação entre as Taxas de Renovação da serotonina, [5-HT] / [5-HIAA]						
Regiões Cerebrais	CONTROLE			DEFICIENTE EM TIAMINA		
	TESTE	RESULTADO R	P VALOR	TESTE	RESULTADO R	P VALOR
TAL x PAG	SPEARMAN	0,532	0,036	SPEARMAN	0,344	0,19
HIP x PAG	SPEARMAN	0,818	0,00016	PEARSON	0,09	0,73

Tabela 15 – Resultado dos testes estatísticos de análises de correlação da atividade serotoninérgica avaliada a partir da taxa de renovação medida entre as regiões de interesse, nominadas na primeira coluna, observando-se independentemente animais dos grupos C e DT. Consideramos correlação significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

6.4 – Correlações entre a atividade serotoninérgica nas regiões cerebrais de interesse e categorias comportamentais observadas na segunda Manipulação Controlada (MC2)

Avaliamos as correlações entre a atividade serotoninérgica (através da taxa de renovação) em cada uma das quatro regiões cerebrais e os comportamentos observados na segunda Manipulação Controlada. Os critérios de interpretação dos resultados permanecem os mesmos utilizados nas análises apresentadas anteriormente. Apresentamos na Tabela 16 as correlações que alcançaram significância estatística, isto é, $p\text{-valor} > 0,05$.

Dados das análises de correlação entre as variáveis apresentadas na primeira e segunda colunas							
[5HIAA] [5HT]	Categorias comportamentais observadas na MC2	CONTROLE			DEFICIENTE EM TIAMINA		
		TESTE	RESULT R	P	TESTE	RESULT. R	P
TAL	IMOBILIDADE	SPEARMAN	-0,28	0,29	SPEARMAN	-0,738	0,0016
TAL	EXP. VERTICAL	SPEARMAN	0,381	0,14	SPEARMAN	0,546	0,029
TAL	AMBULAÇÃO	SPEARMAN	0,25	0,35	SPEARMAN	0,718	0,0024
HIP	AMBULAÇÃO	SPEARMAN	0,539	0,031	SPEARMAN	0,177	0,51
HIP	LUTA	SPEARMAN	0,738	0,0016	PEARSON	0,473	0,064
HIP	PARALISADO	SPEARMAN	-0,529	0,037	PEARSON	-0,462	0,072
CPF	LUTA	PEARSON	0,621	0,01	PEARSON	-0,0368	0,89

Tabela 16 – Resultado dos testes estatísticos de correlação da atividade serotoninérgica (taxa de renovação – [5-HIAA] / [5-HT]) medida entre as regiões cerebrais de interesse e os comportamentos observados na segunda Manipulação Controlada, observando-se independentemente animais dos grupos C e DT. Consideramos correlação significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

6.5 – Vocalizações Ultrassônicas

A **tabela 17** apresenta a descrição estatística das medidas de vocalização ultrassônica registradas durante as primeira e segunda Manipulações Controladas. Apresentamos as médias (ou medianas, quando for o caso), desvios-padrão e erro padrão da medida, tanto para as frequências médias das vocalizações (Freq, em kHz) e a média da contagem de eventos de vocalização (VOC). EXP refere-se à etapa de exploração da caixa na Manipulação Controlada, onde foram avaliados os comportamentos de imobilidade, ambulação, exploração vertical e avaliação de risco. CAP refere-se à fase de captura da Manipulação Controlada, onde foram quantificados os comportamentos de luta-fuga e imobilidade ao ser capturado (permanecendo paralisado).

Etapa da Manipulação Controlada	Frequências (kHz) das Vocalizações Ultrassônicas durante as MC1 e MC2		Contagem de Episódios de Vocalizações Ultrassônicas durante as MC1 e MC2	
	Grupo C	Grupo DT	Grupo C	Grupo DT
	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM
EXPLORAÇÃO MC1	22,66 ±2,72	21,28 ±1,24	6,5±1,04	3±0,47
CAPTURA MC1	22,52 ±0,86	21,4 ±0,63	4,6±0,78	3,5±0,37
EXPLORAÇÃO MC2	26,17 ±3,59	23,13 ±0,81	1±0,94	1,7±0,84
CAPTURA MC2	26,03 ±3,04	20,37 ±1,75	3,5±0,69	2,8±0,35

Tabela 17 – Descrição estatística das vocalizações ultrassônicas e respectivas frequências (kHz) observadas durante as Manipulações Controladas independentemente para os animais dos grupos C e DT, por fase da Manipulação. MC 1 – Manipulação Controlada 1, pré-deficiência. MC 2 - Manipulação Controlada 2, pós deficiência. Definições sobre os termos EXPLORAÇÃO E CAPTURA estão detalhadas no texto.

Comparamos as médias das frequências vocalizadas por animais de cada grupo (C e DT) utilizando o teste-t (dados paramétricos) ou o teste-U (no caso dos dados de alguma das distribuições comparadas não serem paramétricos). Estes resultados estão expressos na **tabela 18**. A **tabela 19** indica resultado de análise similar, porém tomando como variáveis a contagem de vocalizações. Consideramos efeito significativo onde $p\text{-valor} < 0,05$.

Dados da comparação entre frequências vocalizadas por animais dos grupos C e DT			
MEDIDA	TESTE	RESULTADO	P VALOR
FREQ. EXP. MC1	TESTE-U	-1,447845532	0,147660256
FREQ. CAP. MC1	TESTE-U	-1,241010456	0,214601886
FREQ. EXP. MC2	TESTE-U	-1,861515684	0,062671388
FREQ. CAP. MC2	TESTE-U	-2,275185836	0,022894784

Tabela 18 – Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias do número de eventos de vocalizações ultrassônicas comparando-se animais dos grupos C e DT. Consideramos diferença significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

Dados da comparação entre frequências vocalizadas por animais dos grupos C e DT			
MEDIDA	TESTE	RESULTADO	P VALOR
VOC. EXP. MC1	TESTE-U	-2,051429119	0,040225176
VOC. CAP. MC1	TESTE-U	-0,971230381	0,331433568
VOC. EXP. MC2	TESTE-U	-0,197180752	0,843686093
VOC. CAP. MC2	TESTE-U	-0,942927836	0,345717816

Tabela 19 – Resultado dos testes estatísticos para igualdade de médias do número de eventos das vocalizações ultrassônicas comparando-se animais dos grupos C e DT. Consideramos diferença significativa se $p\text{-valor} < 0,05$.

6.5.1 – Correlações entre medidas comportamentais e vocalizações ultrassônicas

Apresentamos na **tabela 20** resultados do teste de correlação estatística das medidas de vocalização ultrassônica encontradas durante as primeira e segunda Manipulações Controladas e os comportamentos observados, independentemente, por grupo. Utilizamos a média da contagem de eventos de vocalização como variável de vocalização ultrassônica. Procedemos análises de correlações entre cada comportamento observado e o total de vocalizações emitidas por animal, em cada etapa. Conforme mencionado anteriormente, EXP refere-se à etapa de exploração da caixa na Manipulação Controlada, onde foram avaliados os comportamentos de imobilidade, ambulação, exploração vertical e avaliação de risco. CAP refere-se à fase de captura da Manipulação Controlada, onde foram quantificados os comportamentos de luta-fuga e imobilidade ao ser capturado (permanecendo paralisado). Os critérios de interpretação dos resultados são os mesmos apresentados anteriormente.

Dados das análises de correlação entre o número de eventos de vocalização ultrassônica e as categorias comportamentais (primeira coluna) observadas nas fases MC1 e MC2						
MEDIDA	CONTROLE			DEFICIENTE EM TIAMINA		
	TESTE	RESULT	P	TESTE	RESULT	P
IMOBILIDADE MC1	SPEM	-0,21	0,42	SPEM	0,072	0,79
AVAL. DE RISCO MC1	SPEM	-0,20	0,45	SPEM	0,33	0,21
EXPL. VERTICAL MC1	PEAR	0,19	0,48	SPEM	-0,2	0,46
AMBULAÇÃO MC1	PEAR	0,19	0,47	SPEM	0,096	0,72
LUTA MC1	PEAR	-0,33	0,21	SPEM	-0,35	0,18
PARALISADO MC1	PEAR	0,39	0,13	SPEM	0,34	0,2
IMOBILIDADE MC2	SPEM	-0,21	0,42	PEAR	-0,48	0,06
AVAL. DE RISCO MC2	SPEM	-0,20	0,45	SPEM	0,33	0,21
EXPL. VERTICAL MC2	SPEM	0,17	0,52	SPEM	-0,2	0,46
AMBULAÇÃO MC2	SPEM	0,12	0,66	SPEM	0,096	0,72
LUTA MC2	SPEM	-0,43	0,1	PEAR	0,093	0,73
PARALISADO MC2	SPEM	0,53	0,032	PEAR	-0,09	0,74

Tabela 20 – Resultado dos testes estatísticos de correlação entre o total de vocalizações emitidas e cada comportamento observado durante as Manipulações 1 (MC 1) e 2 (MC 2), apresentados na primeira coluna, observando-se independentemente animais dos grupos C e DT. Consideramos correlação significativa se $p\text{-valor} < 0,05$. PEAR – teste de Pearson e SPEM – teste de Spearson

6.6 – Modelamento Matemático da Evolução do Peso Corporal

Está expresso graficamente nas figuras 11 a 13 a evolução do peso dos animais ao longo do experimento, ajustados numericamente às respectivas funções matemáticas descritas na seção 5.8. Indicamos, nas legendas, os dados de ajuste aos modelos utilizados. Uma vez que o ajuste dos dados referentes ao peso dos animais do grupo DT durante a restrição de tiamina à função (2 – quociente de formas exponenciais) não foi satisfatório, utilizamos um outro ajuste exponencial, (função 4 – diferença de formas exponenciais) indicado na legenda, que se mostrou mais explicativo dos resultados, conforme seção 5.8. Indicamos nas legendas das figuras

11 a 13 o valor dos coeficientes das curvas estimados a partir dos dados, assim como dados do ajuste – R^2 e Soma do Erro Quadrático (SEQ).

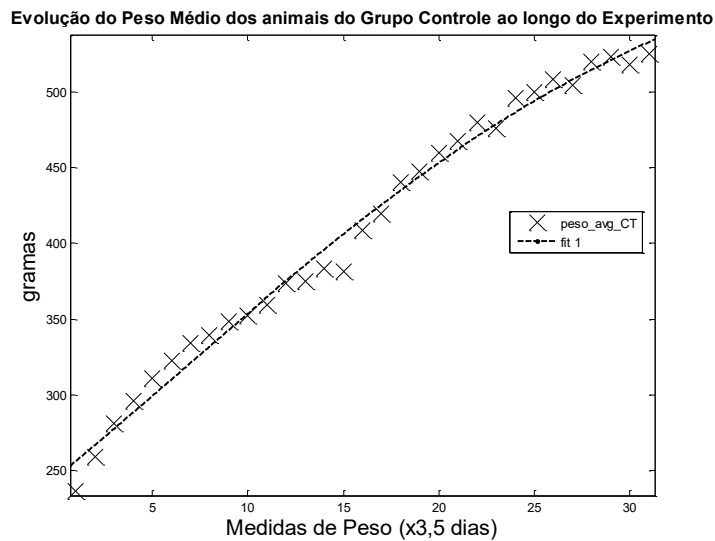


Figura 11 – Evolução do peso dos animais do grupo C ao longo do experimento ajustados à função (2) – quociente de exponenciais. Dados do ajuste – coeficientes da curva: $a=0,06976$; $b=0,00011$; $c=124,1$; $R^2=0,9884$, Soma do Erro Quadrático (SEQ) = 2639.

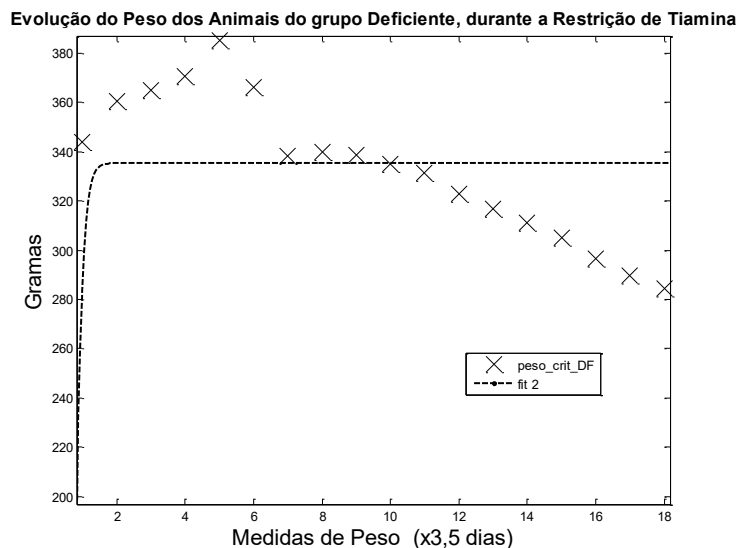


Figura 13 – Evolução do peso dos animais do grupo C ao longo do experimento ajustados à função (2) – quociente de exponenciais. Dados do ajuste – coeficientes da curva: $a=0,4265$; $b=0,0012$; $c=16,45$; $R^2=0,4781$, Soma do Erro Quadrático (SEQ) = 20780.

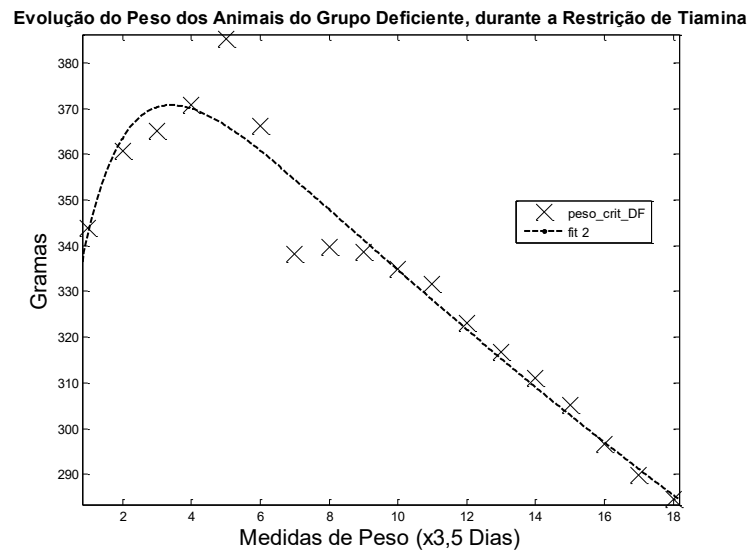


Figura 11 – Evolução do peso dos animais do grupo C ao longo do experimento ajustados à função (4) – diferença de exponenciais. Dados do ajuste – coeficientes da curva: $a=408,8$; $b=-0,019$; $c=-116,3$; $d=-0,68$; $R^2=0,9449$, Soma do Erro Quadrático (SEQ) = 795,5.

CAPÍTULO 7 – Resumo dos resultados

Resumimos, abaixo, em forma de tópicos, os principais resultados obtidos. Após o estabelecimento da deficiência moderada de tiamina e breve período de recuperação observamos:

- Um episódio de deficiência moderada de tiamina alterou parâmetros fisiológicos (peso, consumo de água e ração) dos animais em relação aos controles. *Seção 6.1.*
- Não foi observada, em média, diferença na expressão comportamental de animais dos grupos C e DT em ambas as manipulações. Porém, animais marginalmente deficientes de tiamina manifestaram menos respostas proativas quando reexpostos a estímulos estressores do que à primeira exposição, o que tomado em conjunto à redução na exploração de campo aberto, pode indicar adoção de estratégias de enfrentamento passivo. *Seção 6.2.1 e 6.2.2.*
- Com exceção de duas (avaliação de risco e paralisado) das categorias comportamentais avaliadas, diferentemente dos animais controles, os animais deficientes de tiamina mostraram comportamento alterado na segunda exposição à um mesmo contexto de manipulação controlada (MC2), quando comparado com a primeira fase (MC1). *Tabela 5.*
- As médias de vocalizações ocorreram na faixa considerada aversiva para ratos: 19-26kHz (Mällo et al, 2007a), *Tabelas 17 e 18*, sugerindo que a valência emocional da manipulação controlada foi aversiva.
- A deficiência de tiamina ocasionou alterações nas concentrações de 5-HIAA na substância cinzenta periaquedutal; e nas correlações entre as concentrações de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo. *Tabelas 10 e 12, respectivamente.*

- A deficiência de tiamina aumentou a atividade serotoninérgica na substância cinzenta periaquedutal e reduziu-a no córtex pré-frontal. *Tabelas 13 a 15.*
- Para o grupo C, observou-se maior associação do tálamo à situação de perigo proximal (captura), enquanto para o grupo DT observou-se maior associação do hipocampo à situação de perigo distal (exploração da caixa experimental). *Tabela 15.*

CAPÍTULO 8 - Discussão

O modelo utilizado provou-se eficaz no estabelecimento de um estado de deficiência moderada de tiamina, uma vez que um dos sinais clínicos mais bem estabelecidos (anorexia) foi observado claramente, em concordância com outros trabalhos empregando o mesmo modelo (Pires et al, 2005; Vigil et al, 2010). Animais do grupo deficiente apresentaram redução acentuada no peso corporal, consumo de água e ração, em contraste ao aumento linear de peso dos animais do grupo controle (Figuras 3 a 5). Este efeito é significativo e foi observado em poucos dias após a introdução da ração manipulada, persistindo até após a substituição da ração manipulada pela ração padrão (comercial), contendo níveis normais de tiamina. A fim de avaliarmos a força da diferença entre as médias dos pesos corporais, consumos de água e ração entre os grupos ao longo do experimento, utilizamos teste-t, conforme Anexos A1-3. Observamos os maiores valores da estatística-t para o período imediatamente antes da reoferta de ração comercial, coincidindo a maior diferença em peso corporal, consumo de água e ração. Assim que a alimentação normal foi reestabelecida, em uma fase inicial observamos tendência à restauração do peso corporal. No entanto, até onde pudemos medir, o valor médio do peso corporal dos animais deficientes não atinge o valor dos animais do grupo controle, nem mesmo quando esses animais, que passaram pelo episódio de deficiência moderada, atingem níveis de consumo de água e de ração similares aos dos animais controles. Em relação ao consumo de ração observamos um sobressalto no consumo de ração imediatamente após a reintrodução da ração comercial, que seria condizente com a hipótese de desnutrição dos animais, assim como a valência aversiva da ração deficiente, conforme Monda et al, 2003.

Diante do quadro de desnutrição generalizada durante a restrição de tiamina optamos por realizar os testes comportamentais três dias antes e três dias após o episódio de restrição de tiamina, assim buscando isolar os efeitos da deficiência de tiamina, principalmente, e menos da desnutrição por ela ocasionada, o que poderia manifestar-se em maior expressão de comportamentos tipo-exploração (busca por alimento). Por outro lado, podemos pensar que o quadro de desnutrição generalizada (e a busca por alimento) seja parte do quadro de deficiência de tiamina e neste

sentido, os comportamentos a favor da obtenção de alimento seriam considerados parte do quadro de deficiência. Neste estudo optamos por avaliar os efeitos persistentes da deficiência de tiamina, que puderam ser observados mesmo 10 dias após o reestabelecimento da alimentação normal, uma vez que animais deficientes percorreram menores distâncias na exploração de campo aberto, do que os pares controles, até o último dia de exploração. A deficiência grave de tiamina, onde os animais apresentam sinais neurológicos de deficiência, ocasiona danos motores severos (Vetreno et al, 2012). Com relação ao modelo utilizado no presente estudo, deficiência moderada, os dados obtidos no teste do Campo Aberto, como discutido abaixo, relativos à distância percorrida ao longo das quatro sessões (dias 1- 4) indicam que os animais do grupo DT apresentam um deslocamento, em termos de distância percorrida, menor que os animais controles. Essa diferença aparece desde a primeira sessão, sugerindo que possa ser devido a uma disfunção motora e/ou um déficit motivacional/emocional. No entanto, a hipótese de apenas uma disfunção motora explicar as menores distâncias percorridas não é corroborada pelos dados obtidos nos experimentos de Manipulação Controlada (MC1 e MC2), onde não observamos diferença significativa entre os animais controles e deficiências em relação as categorias comportamentais que sinalizam atividade motora. Ou seja, o que observamos neste experimento foi: animais do grupo DT exibiram mobilidade comparável à do grupo C, uma vez que a sua expressão comportamental foi, em média, similar (Tabelas 2 e 3). Nesse caso, podemos inferir que a diferença detectada no Campo Aberto - na distância percorrida – entre os animais dos grupos DT e C, poderia ser devido mais a uma alteração motivacional e/ou na valência atribuída aos estímulos do meio do que a disfunções motoras. De certa forma, essa hipótese está de acordo com as mudanças acentuadas de tendência comportamental, observadas para animais do grupo DT, sem efeito para os do grupo C, quando se compara os resultados da MC2 com o da MC1. Essas alterações, detectadas quando se compara os comportamentos medidos nessas duas fases, MC1 e MC2, também poderiam ser consideradas como consequência de um efeito da deficiência no processo de memória. É bem conhecido o efeito da deficiência de tiamina em parâmetros de memória (Vigil et al, 2010), mas não podemos descartar, em absoluto o componente motor da resposta comportamental observada. Ainda que não conseguíssemos observar nitidamente um efeito de prejuízo motor em animais do grupo DT, não podemos eliminar a hipótese de o sistema motor de ratos deficientes ter sofrido

alguma alteração. Entretanto, em conjunto, os resultados dos testes indicam, como mostrado a seguir, mais um efeito de alterações psicológicas do que motoras em ratos moderadamente deficientes de tiamina.

Está bem determinado na literatura que os estilos de enfrentamento representam tendências de resposta comportamental estáveis ao longo do tempo e das situações de aversibilidade (Koolhaas et al, 2010; Mällo et al, 2007b). Sabe-se também que a manipulação neonatal altera o estilo de enfrentamento de ratos, tornando-os mais ativos do que pares não-manipulados (Steimer et al, 1998) e que a adoção de estratégias de enfrentamento depende diretamente das opções de expressão comportamental definidas, além do estilo pessoal de enfrentamento (Roy & Chapillon, 2002). Os ratos de ambos os grupos foram manipulados (imobilizados, na Manipulação Controlada) na fase adulta, e manipulados da mesma forma desde o primeiro mês de vida, permitindo-nos descartar a hipótese de que as manipulações *per se* teriam ocasionado as alterações comportamentais observadas. Ainda assim, os animais do grupo deficiente apresentaram menor expressão de comportamentos de enfrentamento ativo após a deficiência. Conforme dados expressos na Tabela 5, animais dos grupos deficiente e controle evoluíram de maneira diferente entre as Manipulações Controladas, uma vez que, comparando-se a diferença nos escores obtidos entre as duas Manipulações Controladas (MC2 e MC1) encontramos diferenças significativas para o grupo deficiente, sem efeito para o grupo controle. Estes dados podem indicar a preferência por atitudes de enfrentamento passivo perante estímulos aversivos, ainda que em tese, por não haver diferença entre as médias dos grupos controle e deficiente na Manipulação 2, poderia tal efeito ser contabilizado à variabilidade individual.

Outra explicação para a similaridade na expressão comportamental de ratos deficientes e controles seria o do valor aversivo das Manipulações Controladas não ter sido forte o suficiente para evocar comportamentos de enfrentamento ativo, o que pôde ser avaliado, indiretamente, através das frequências de vocalização ultrassônicas observadas. Apesar de termos observado uma amplitude considerável de frequências vocalizadas (entre 19,38 e 79,62kHz), as frequências médias (ou medianas, quando necessário) mantiveram-se ao redor dos 22 kHz, frequência emitida em situações de aversibilidade (Mällo et al, 2007a, 2007b; Kikusui et al, 2003). Observamos, também, duas tendências ($0,08 > p\text{-valor} > 0,05$) à correlação das

emissões ultrassônicas durante a segunda Manipulação Controlada. Ratos do grupo deficiente vocalizaram mais em resposta à imobilidade, durante a fase de exploração da Manipulação Controlada, enquanto ratos do grupo controle vocalizaram mais em resposta ao congelamento ao serem manipulados pelo experimentador (Tabela 20). Estas diferenças, ainda que não alcançando nível de significância estatística, apontam para diferenças na valência emocional da estimulação aversiva, para animais deficientes e controles.

Os animais marginalmente deficientes de tiamina expressaram maiores comportamentos de imobilidade, redução acentuada na resistência à captura, na ambulação e em menor escala, na exploração vertical, comportamentos associados a estilos de enfrentamento passivo. A deficiência de tiamina leva a alterações em parâmetros de memória, tanto em roedores quanto em humanos (Vetreno et al, 2012) e se apenas a memória dos roedores tivesse sido afetada, talvez ao serem reexpostos a um ambiente aversivo responderiam de maneira similar à primeira Manipulação Controlada. Isto não pôde ser observado, visto que os animais do grupo deficiente modificaram sua estratégia de enfrentamento após a deficiência de tiamina. Os comportamentos mais afetados pela deficiência de tiamina foram, neste panorama, aqueles associados à exploração de caixa experimental, onde há uma ameaça distal ao animal, ou seja, há uma situação de perigo potencial, uma vez que há a presença do experimentador na sala, visível ao animal, além de estar sozinho e exposto a um ambiente aberto, mas sem que o experimentador o capture. Da mesma forma, durante a exploração de campo aberto os animais permaneceram sozinhos na sala de testes, expostos à iluminação direta, porém sem a presença do experimentador e expressaram comportamentos associados, de certo modo, ao enfrentamento passivo.

A exploração de campo aberto tinha por objetivo avaliar a mobilidade de animais deficientes, uma vez que é conhecido o efeito da deficiência sobre parâmetros motores (Butterworth, 1986; Vetreno et al, 2012) e neste sentido, os animais marginalmente deficientes percorreram menores distâncias, o que poderia ser atribuído tanto a disfunções motoras quanto a fatores psicológicos, tais como ansiedade e medo. Em média, durante a MC2, os animais deficientes não se expressaram francamente diferentes dos animais controles, ou seja, não haveria como atribuir a redução na mobilidade exclusivamente a danos no controle motor. Ainda mais, o comportamento dos animais não indicava dano motor comparável ao

observado na fase mais grave da deficiência de tiamina, como perda do reflexo de endireitamento. Testamos este reflexo ao capturarmos os animais na MC2 e ao expormos a sua porção ventral ao experimentador. Nessa situação, imediatamente todos os animais manipulados corrigiam a postura (expondo o dorso ao experimentador) e rapidamente pulavam de volta para a caixa experimental. Um dos substratos neurais mais comprometidos pela deficiência de tiamina é o núcleo vestibular (Butterworth, 1986), que é importante à manutenção da postura corporal e no processo de audição. Não observamos diferenças significativas na resposta comportamental emitida por ratos deficientes e controles ao serem submetidos a um estímulo sonoro aversivo. Da mesma forma, não observamos dificuldade ou incapacidade dos animais deficientes em manterem-se de pé ou mesmo indícios de perda de equilíbrio durante os testes. Assumimos que não houve prejuízo claro no controle motor de animais marginalmente deficientes em tiamina e que, portanto, os resultados obtidos indicam maior incidência de fatores psicobiológicos do que de mobilidade na expressão comportamental observada.

Considerando que o tratamento dado aos animais de ambos os grupos durante as Manipulações foi idêntico e que a única diferença entre os grupos foi a dieta restrita em tiamina, podemos considerar a hipótese de que a deficiência de tiamina alterou a resposta a estímulos emocionais de valência aversiva. O método utilizado neste trabalho foi inspirado no comportamento de dominância de ratos (Panksepp et al, 1985), baseado no experimento descrito em Mällo et al (2007b). Estes autores demonstraram que maiores respostas de agressividade, ou desconforto durante as manipulações, correspondem a menores escores de passividade no teste de nado forçado, um dos métodos mais empregados na avaliação dos estilos de enfrentamento (Koolhaas et al, 2010), e que este traço permanecia estável ao longo das experimentações, assim como descritos os estilos de enfrentamento. Neste trabalho observamos uma mudança comportamental que indicaria a mudança na adoção de estratégias de enfrentamento pelos animais deficientes de tiamina.

Está estabelecido que o estresse físico (condicionamento ao contexto) se correlaciona inversamente às distâncias percorridas durante a exploração de campo aberto (Pijlman et al, 2003). Um episódio de restrição (contenção do animal em tubo), por duas horas, foi capaz de alterar a resposta de ratos no labirinto em cruz elevado, à medida em que animais condicionados ao contexto realizaram menor exploração do

braço aberto no labirinto em cruz e também percorreram menores distâncias no labirinto em cruz elevado do que animais não-condicionados ao contexto (Belda et al, 2008). Os episódios de restrição de movimento empregados no presente trabalho foram muito curtos e não restringiam totalmente o movimento dos animais. Ao contrário, permitíamos que o animal fugisse da captura, mas ao mesmo tempo deixávamos ambíguo ao animal se seria capturado ou não. Os animais do grupo deficiente apresentaram, em relação à primeira Manipulação Controlada (logo, ao primeiro episódio de restrição do movimento), menores escores de luta do que a mesma comparação levada a efeito em animais do grupo controle. Estudos (para uma revisão, ver Brandão et al, 2003) apontam diferentes substratos neurais em resposta à proximidade do perigo ao organismo. Estímulos ameaçadores evocariam respostas de fuga e evitação, enquanto estímulos muito próximos e intensos evocariam o padrão antagônico luta-congelamento, em concordância com os perfis de enfrentamento ativo e passivo. A mudança comportamental observada em animais do grupo deficiente, em resposta à restrição de tiamina aproxima-os do padrão de enfrentamento passivo, uma vez que expressaram menor resistência à captura e maior imobilidade, tanto na Manipulação Controlada, quanto na exploração de campo aberto.

Em particular, a resposta observada durante a Segunda Manipulação Controlada representa também uma medida de memória aversiva, uma vez que os animais já haviam sido expostos ao paradigma experimental anteriormente à deficiência de tiamina. Os animais do grupo controle não apresentaram mudança considerável na expressão comportamental, o que pode indicar habituação e evocação de comportamentos que –supostamente- foram eficazes durante a primeira Manipulação Controlada, visto que, do ponto de vista psicobiológico, as estratégias adotadas evitaram dano físico do animal. Mesmo não tendo sido considerado no paradigma a possibilidade de se machucar o animal, pode-se supor que os animais consideraram o evento aversivo e potencialmente perigoso. Assim, tendo atravessado a Manipulação Controlada sem terem sido machucados pode ter reforçado a repetição destes comportamentos numa reexposição ao mesmo ambiente e condições de Manipulação (MC), o que foi observado para o grupo controle, mas não para animais marginalmente deficientes de tiamina. Este fenômeno pode ser atribuído a disfunções de memória nos ratos deficientes de tiamina, o que está em acordo com a literatura,

assim como a dificuldades na tomada de decisão perante um estímulo aversivo conhecido.

Animais expressando perfil passivo de enfrentamento apresentam pior funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal do que animais expressando perfil ativo (Boersma et al, 2010). Além disso, já está bem estabelecido que animais expressando perfis passivos de enfrentamento também apresentam pior regulação no sistema serotoninérgico do que os pares ativos (Koolhaas et al, 2007). Animais deficientes em tiamina apresentam déficit na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal quando comparados aos pares controles (Dreyfus & Victor, 1961) e alterações em parâmetros regulatórios do sistema serotoninérgico (Nakagawasai et al, 2007), o que indicaria uma tendência destes animais expressarem perfil passivo de enfrentamento. Os dados obtidos nesta pesquisa apontam a adoção de comportamentos característicos de animais expressando perfil de enfrentamento passivo, assim como alterações em parâmetros serotoninérgicos, permitindo-nos afirmar que tais animais alteraram as estratégias de enfrentamento preferenciais.

Observamos atividade serotoninérgica aumentada na substância cinzenta periaquedutal e reduzida no córtex pré-frontal (Tabelas 13 e 14). Em animais do grupo controle, a atividade serotoninérgica no córtex pré-frontal associou-se positivamente à resistência à captura, sem correlação para o grupo deficiente. A atividade serotoninérgica na substância cinzenta periaquedutal não se associou a nenhum comportamento observado. Se as alterações nesse circuito serotoninérgico na PAG têm algum papel nos comportamentos alterados, pode ser apenas em relação a um subcomponente que compõe a expressão mais complexa desses comportamentos, que é em geral são regulados de forma multimodal (Brandão et al, 2003). A atividade serotoninérgica no tálamo correlacionou-se positivamente à exploração vertical, negativamente à imobilidade e positivamente à ambulação, para animais do grupo deficiente, sem correlação para os do grupo controle. A atividade serotoninérgica no hipocampo correlacionou-se positivamente à resistência à captura e negativamente ao congelamento ao ser tocado (PARALISADO), para animais controle, sem correlação para animais do grupo deficiente. Estes dados estão descritos na Tabela 16.

Já foram observadas lesões ao nível do córtex pré-frontal medial e núcleo subtalâmico em ratos deficientes de tiamina (Klein et al, 2010), o que talvez explique a reduzida atividade serotoninérgica nesta região. O córtex pré-frontal, entre outras funções, é fundamental na tomada de decisão e escolha de estratégia comportamental adequada, no caso, a resistência à captura, nos ratos normais. Esta correlação não foi observada em animais deficientes, além de redução na atividade serotoninérgica ao nível do córtex pré-frontal, o que talvez justifique as dificuldades em tomar atitudes defensivas perante um estímulo aversivo (captura/exploração). Encontramos diferenças significativas na correlação entre 5-HT e seu principal metabólito, 5-HIAA, no hipocampo (HIP) de ratos deficientes. O hipocampo é importante na formação, consolidação e recuperação de memórias aversivas (Guimarães et al, 1993). Estas diferenças podem indicar o estabelecimento de alterações no funcionamento do hipocampo, o que na progressão da deficiência ocasiona danos a outras modalidades de memória, como a espacial (Vigil et al, 2010). Já foram encontradas, no hipocampo de ratos deficientes, por pesquisadores de nosso grupo, alterações consideráveis na expressão de proteínas hipocampais importantes à neurotransmissão (Pires et al, 2005), como a sinapsina I (Resende, Ribeiro, Werner, & Savage, 2012).

Juntas, estas evidências parecem apontar para o estabelecimento de processos que culminam em danos permanentes na aquisição e recuperação de memórias, que caracterizam a fase tardia da deficiência de tiamina e estão presentes nos quadros clínicos de deficiência de tiamina, como a Encefalopatia de Wernicke, por exemplo (Vetreno et al, 2012). Em um estudo eletrofisiológico, foram observadas alterações na rede neural em resposta à deficiência de tiamina (Crespi & Jouvet, 1982). Mais do que isso, no presente estudo observamos que a atividade serotoninérgica hipocampal correlacionou-se, em ratos normais, às respostas perante um perigo proximal (captura), sem correlação para animais deficientes. Além disso, foi observada perda de correlação entre a atividade serotoninérgica na substância cinzenta periaquedutal e o hipocampo, em ratos deficientes; assim como entre a substância cinzenta periaquedutal e o tálamo, para este mesmo grupo. Juntas, estas evidências podem indicar dificuldades, em animais deficientes, em integrarem o cenário aversivo da manipulação, elaborarem e implementarem estratégias de enfrentamento comparáveis às do grupo controle.

Ao nível molecular, há estudos (Nakagawasai et al, 2007) indicando alterações consideráveis na atividade da enzima triptofano hidroxilase em ratos deficientes. Esta enzima realiza a conversão de triptofano em serotonina e alteração na sua atividade sinaliza alterações na síntese de 5-HT. Uma vez que as concentrações de 5-HT de ratos deficientes e controles não diferiram, em média, excluímos a possibilidade de as alterações comportamentais observadas serem decorrentes de alterações de síntese de serotonina, mesmo observadas as condições de desnutrição que caracterizam a deficiência de tiamina. No entanto, a taxa de renovação desse neurotransmissor foi alterada de forma significativa pela deficiência de tiamina, tanto na PAG como no CPF. Além disto, encontramos aumento significativo na concentração de 5-HIAA na substância cinzenta periaquedutal, o que já foi associado à alterações nos mecanismos de efluxo cerebral de 5-HIAA (Haas, 1988). A substância cinzenta periaquedutal é importante na modulação de respostas a estímulos aversivos (Brandão et al, 2003) e alterações nesta região poderiam indicar diferenças no processamento de respostas a estímulos emocionais aversivos, como os da restrição de movimento, ou mais nitidamente, iniciativa em explorar um ambiente potencialmente aversivo, conforme observado neste trabalho. Tomados juntos, estes dados podem indicar uma tendência à reorganização da rede neural em resposta tanto à deficiência quanto aos estímulos aversivos empregados. Uma vez que os animais do grupo controle também foram submetidos à mesma estimulação, podemos associar estes efeitos de reorganização neural principalmente à deficiência de tiamina, através de processos que extrapolam os dados aqui apresentados.

Além de alterações na atividade da enzima triptofano hidroxilase, ao nível molecular, já foi demonstrado que na deficiência de tiamina pré-sintomática (deficiência parcial) há alterações em enzimas importantes, como Na⁺ e K⁺ ATPases (Mousseau, Rao & Butterworth, 1996; Zarros et al, 2013). Também está estabelecido que há alterações consideráveis no estado oxidativo das células de ratos deficientes em tiamina (Depeint et al, 2007; Hazell & Butterworth, 2009). Estas alterações têm sido associadas aos processos de morte neuronal na deficiência de tiamina e têm sido apontadas mesmo em modalidades de deficiência onde não é observada perda de peso dos animais. A partir dos dados aqui expostos, não somos capazes de corroborar ou refutar tais descobertas, contudo, não podemos descartar a possibilidade de alterações no estado oxidativo dos neurônios (ou células da glia)

terem levado às disparidades observadas em relação às correlações entre 5-HT e 5-HIAA no hipocampo; e concentração de 5-HIAA na substância cinzenta periaquedutal. Finalmente, a deficiência de tiamina ocasiona alterações nas concentrações cerebrais de lactato (Navarro et al, 2005). Estas alterações podem corresponder a alterações na comunicação neuronal em virtude da produção excessiva de lactato (Barros, 2013).

Interpolamos funções matemáticas descritivas da variação de peso dos animais dos grupos C e DT (seções 5.8 e 6.6). Assumimos que os organismos inicialmente crescem e em determinado período do desenvolvimento param de crescer; e posteriormente diminuem em volume corporal, equivalendo a uma redução em massa corporal, muitas das vezes. Matematicamente isto é equivalente a supor uma função descrita por um coeficiente de crescimento linear, rápido e um de decrescimento, mais suave. Os parâmetros descritivos das curvas podem ser extrapolados à influência de parâmetros metabólicos, como por exemplo, consumo de ração. A ração possui nutrientes e compostos que levam, numa condição metabólica normal, ao crescimento dos ratos. Ainda que apenas um ou dois coeficientes de regressão não sejam capazes de representarem fidedignamente parâmetros metabólicos importantes, eles representam, em termos da variável peso, fatores descritivos da sua variação. Observamos uma interessante mudança de função descritiva do peso corporal dos ratos durante a deficiência de tiamina. Para a situação “normal” (grupo C), a idéia de um parâmetro de crescimento linear interceptado por um de decrescimento quadrático ajustou-se de forma muito satisfatória ($R^2=0,9884$); porém, não se ajustou aos ratos durante a restrição de tiamina, sendo o ajuste excessivamente precário, indicando claramente que este modelo não descreve aqueles dados. Utilizamos um outro ajuste, na tentativa de descrevermos o fenômeno de perda de peso corporal observado em animais deficientes e encontramos como solução uma diferença de formas exponenciais (função 4). Ainda que este resultado não possa ser explicado conclusivamente por não termos realizado dosagem de nenhum parâmetro metabólico a não ser o peso e consumo de água e ração ao longo do período de deficiência, é nítido o ajuste dos dados a esta forma e mais importante, que o modelo utilizado para os animais do grupo C não se adapta aos animais do grupo DT.

Os ratos empregados neste trabalho eram jovens adultos e portanto, estariam sob maior influência do fator de crescimento do que de decrescimento, o que é facilmente observado graficamente. Uma vez que o consumo de ração foi

comprometido ao longo da restrição de tiamina, esperar-se-ia que o peso dos animais do grupo DT comportasse-se como os do grupo C, porém com maior ou menor velocidade (inclinação). Isto é plausível considerando que em situação de redução da alimentação, como em dietas para perda de peso, é tanto observada aceleração do metabolismo, quanto redução, dependendo do organismo e extensão da dieta. Porém, o resultado encontrado excede o padrão observado nos ratos do grupo C, indicando que talvez tenham ocorrido mudanças metabólicas mais extensas do que a mera aceleração ou desaceleração do metabolismo, mantendo suas características (vias metabólicas) intactas. Esta ideia encontra respaldo na literatura, uma vez que já foram observadas alterações no estado oxidativo das células durante a deficiência de tiamina (Depeint et al, 2007). Estas alterações, mais do que aumentar ou reduzir a taxa metabólica, poderiam estar deslocando as vias metabólicas principais e como resultado desta alteração observaríamos as alterações no peso corporal indicadas neste trabalho. A presença de espécies reativas de oxigênio não ocorre apenas em animais deficientes de tiamina, à medida que é um processo normal no metabolismo dos roedores e demais animais.

Novamente, não podemos associar o estresse oxidativo diretamente ao fator de decrescimento no peso corporal observado na seção 6.6, ainda que à medida em que o organismo envelhece, perde gradualmente a capacidade de regulação do estresse oxidativo, entre outros fatores que culminam na morte do organismo. Os dados aqui apresentados assemelham-se, em parte, a dados obtidos utilizando-se um modelo de envelhecimento, para a mesma linhagem de ratos, onde são observados déficits de memória e resposta emocional que lembram os resultados aqui obtidos. Não realizamos dosagens de espécies implicadas no estresse oxidativo, mas podemos extrapolar os dados sugerindo que em decorrência deste, ou em resposta a este, ocorreu um rearranjo metabólico de modo a manter o organismo vivo.

Conforme mencionado anteriormente, juntas, estas evidências apontam para uma reorganização da rede neural em resposta à deficiência de tiamina. Importante destacar que esse reajuste tem início nas fases iniciais do processo, antes da evolução dos sintomas chegarem às disfunções neurológicas mais graves. Os testes comportamentais empregados não podem ser considerados independentemente do contexto de deficiência de tiamina, uma vez que já foi demonstrado que ratos marginalmente deficientes em tiamina desenvolvem aversão a ração deficiente

(Monda et al, 2003). Podemos levantar a hipótese da exposição a uma dieta aversiva levar tanto a alterações metabólicas quanto comportamentais, como alterações nas relações sociais dentro das gaiolas, a emergência de comportamentos supersticiosos e, mais provavelmente, a exposição crônica a um paradigma de desamparo aprendido, visto que, supondo que a alimentação por ração deficiente produza sensações aversivas; e sendo a única alimentação disponível, acabaria levando os animais deficientes ao quadro de desamparo aprendido. Há evidências (Thornalley et al, 2007; Karachilias et al, 2010) mostrando associação entre alterações na produção de insulina à deficiência de tiamina e também que ratos deficientes em tiamina exibiram menores preferências por açúcar (Kikusui et al, 2003). Amido é o ingrediente mais abundante na ração manipulada e pode-se hipotetizar que num contexto de disfunção metabólica e particularmente disfunção no metabolismo de glicose, como na deficiência de tiamina, o consumo de amido adquira um valor aversivo. Por outro lado, esta hipótese não explica o aumento no consumo de ração comercial observado após a recuperação da deficiência. Do mesmo modo, há evidências de alteração em diversos sistemas de neurotransmissão na deficiência de tiamina (Butterworth, 1986), o que pode explicar as alterações nos parâmetros serotoninérgicos como consequências da alteração na rede neural e não apenas enquanto efeitos *per se* da deficiência de tiamina. Assim, podemos considerar que os efeitos observados são multifatoriais, no sentido de medirem mais um conjunto de influências coincidentes ou consequentes à restrição de tiamina e não exclusivamente à deficiência e que, portanto, há alterações na rede neural em resposta à deficiência de tiamina já na fase inicial do processo

CAPÍTULO 9 – Conclusões

Diante do exposto, concluímos que:

i) A tiamina tem papel importante na manutenção de parâmetros fisiológicos (peso corporal, consumo de água e ração).

ii) A tiamina tem papel importante na neurotransmissão serotoninérgica, particularmente no processamento de estímulos aversivos e resposta emocional.

iii) A deficiência moderada de tiamina leva a adoção de estratégias de enfrentamento passivo.

iv) A tiamina é importante na organização da rede neural e parece ter um papel na sua reorganização após a resposta a estimulação aversiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, D. J. & Richmond, S. E. (1977). Septal hyperreactivity: A comparison of lesions within and adjacent to the septum. *Physiology and Behavior*, 15(3), 339–347.
- ANTONIAZZI, A.S., Dalbosco, D.D. & Bandeira, D.R. (1998). O conceito de coping: uma revisão teórica. *Estudos de Psicologia*, 3(2), 273-294.
- BARROS, L.F. (2013). Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci*, 36(7), 396-404.
- BELDA, X., Fuentes, S., Nadal, R. & Armario, A. (2008). A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. *Hormones and Behavior*, 54(5), 654–661.
- BELTRAMO, E., Berrone, E., Tarallo, S. & Porta, M. (2008). Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. *Acta Diabetol*, 45(3), 131–141.
- BETTENDORFF, L. (1994). Thiamine in excitable tissues: reflections on a non-factor role. *Brain Res.*, 652(1), 183-209.
- BETTENDORFF, L., Wirtzfeld, B., Makarchikov, A.F., Mazzucchelli, G., Frédérick, M., Gigliobianco, T., Gangolf, M., De Pauw, E., Angenot, L. & Wins, P. (2007). Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nature Chemical Biology*, 3, 211-212.
- BOERSMA, G.J., Benthem, L., van Dijk, G., Steimer, T.J. & Scheurink, A.J.W. (2010). Coping style predicts the (in)sensitivity for developing hyperinsulinemia on a high fat diet in rats. *Physiology Behavior*, 100(4), 401-407.
- BOERSMA, G.J., Scheurink, A.J.W., Wielinga, P.Y., Steimer, T.J. & Benthem, L. (2009). The passive coping Roman Low Avoidance rat, a non-obese rat model for insulin resistance. *Physiology & Behavior*, 97(3-4), 353–358.

- BRUNELLI, S.A & Hofer, M.A. (2007). Selective breeding for infant rat separation-induced ultrasonic vocalizations: developmental precursors of passive and active coping styles. *Behavioural Brain Research*, 182(2), 193–207.
- BUTTERWORTH, R.F. (1986). Cerebral thiamine-dependent enzyme changes in experimental Wernicke's encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 1(3), 165-175.
- CAMIENER, G.M. & Brown, G.W. (1960). The biosynthesis of thiamine. 1. Enzymatic formation of thiamine and phosphate esters of the pyrimidine moiety of thiamine. *J Biol Chem*, 235, 2404-2410.
- CARPENTER, T.J. (2012). The Discovery of thiamin. *Ann Nutr Metab*, 61(3), 219-223.
- CARVALHO, F.M., Pereira, S.R.C., Pires, R.G.W., Ferraz, V.P., Romano-Silva, M.A., Oliveira-Silva, I.F. & Ribeiro, A.M (2006). Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 83(4), 481–489.
- CRESPI, F. & Jouvet, M. (1982). Sleep and indolamine alterations induced by thiamine deficiency. *Brain Research*, 248, 275-283.
- CRISPIM JUNIOR CF, Pederiva CN, Bose RC, Garcia VA, Lino-de-Oliveira C & Marino-Neto (2012). ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Comput Biol Med.*, 42(2), 257-64.
- DALBOSCO, D.D. & Hutz, C.S (2002). Estratégias de coping e estilo atribucional de crianças em eventos estressantes. *Estudos de Psicologia*, 7(1), 5-13.
- DE BOER, S.F. & Koolhaas, J.M (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 145–161.
- DE RUITER, A.J.H., Feitsma, L.E., Keijser, J.N., Koolhaas, J.M., van Oortmerssen, G.A. & Bohus, B. (1993). Differential perinatal testosterone secretory capacity of wild house mice testes is related to aggressiveness in adulthood. *Hormones and Behavior*, 27(2), 231-239.

DEPEINT, P., Shangari, N., Furrer, R., Bruce, W.R. & O'Brien, P.J (2007). Marginal thiamine deficiency increases oxidative markers in the plasma and selected tissues in F344 rats. *Nutrition Research*, 27(11), 698–704.

DREYFUS, P.M. & Victor M. (1961). Effects of thiamine deficiency on the central nervous system. *Am J Clin Nutr*, 9, 414-25.

FREITAS-SILVA, D.M., Resende, L.S., Pereira, S.R.C., Franco, G.F. & Ribeiro, A.M (2010). 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.

GUIMARÃES, F. S., Del Bel, E. A., Padovan, C. M., Netto, S. M., & De Almeida, R. T. (1993). Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behav. Brain Res.*, 58, 133–139.

HAAS, R.H. (1988). Thiamin and the brain. *Annual Review of Nutrition*, 8, 483-515.

HAM, D. & Karska-Wysocki, B (2005). Energy and glucose pathways in thiamine deficient primary rat brain microvascular endothelial cells. *Gen. Physiol. Biophys.*, 24(4), 467-474.

HANNESSON, D.K., Vacca, G., Howland, J.G. & Philips, A.G. (2004). Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. *Behav Brain Res*, 153(1), 273-285.

HAZELL, A.S., Butterworth, R.F. (2009). Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol Alcohol.*, 44(2), 141-147.

HOWE, J.R., Sutor, B. & Zieglgänsberger, W. (1987). Characteristics of long-duration inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical neurons in vitro. *Cell Mol Neurobiol*, 7(1), 1-18.

ICHIMIYA, T., Suhara, T., Sudo, Y., Okubo, Y., Nakayama, K., Nankai, M., Inoue, M., Yasuno, F., Takano, A., Maeda, J. & Shibuya, H. (2002). Serotonin transporter binding in patients with mood disorders: a PET study with [11C](+)McN5652. *Biol Psychiatry*, 51(9), 715-22.

JANKOWSKA-KULAWY, A., Bielarczyk, Hanna, Pawełczyk, T., Wróblewska, M. & Szutowicz, A. (2010). Acetyl-CoA deficit in brain mitochondria in experimental thiamine deficiency encephalopathy. *Neurochemistry International*, 57(7), 851–856.

JURGENSON, C.T., Begley, T.P. & Ealick, S.E. (2009). The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 78, 569-603.

KALYNCHUK, L.E., Pinel, J.P., Treit, D. & Kippin, T.E. (1997). Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. *Biologic Psychiatry*, 41(4), 438-51.

KALYNCHUK, L.E., Pinel, J.P. & Treit, D. (1999). Characterization of the defensive nature of kindling-induced emotionality. *Behavioral Neuroscience*, 113(4), 766-75.

KALYNCHUK, L.E., Pinel, J.P., Treit, D., Barnes, S.J., McEachern, J.C., Kippin & T.E. (1998). Persistence of the interictal emotionality produced by long-term amygdala kindling in rats. *Neuroscience*, 85(4), 1311-1319.

KARACHALIAS, N., Babaei-Jadidi, R., Rabbani, N., & Thornalley, P.J. (2010). Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia*, 53(7), 1506–1516.

KEAY, K.A. & Bandler, R. (2001). Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25 (7-8), 669-678.

KECK, M.E., Engelmann, M., Müller, M.B., Henniger, M.S., Rupprecht, R., Neumann, I.D., Toschi, N., Landgraf, R. & Post, A. (2000). Repetitive transcranial magnetic stimulation induces active coping strategies and attenuates the neuroendocrine stress response in rats. *Journal of Psychiatric Research*, 34(4-5), 265–276.

KIKUSUI, T., Nishizawa, D., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2003). Conditioned fear-related ultrasonic vocalizations are emitted as an emotional response. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(12), 1299-305.

- KLEIN, J., Winter, C., Coquery, N., Heinz, A., Morgenstern, R., Kupsch, A. & Juckel, G. (2010). Lesion of the medial prefrontal cortex and the subthalamic nucleus selectively affect depression-like behavior in rats. *Behavioral Brain Research*, 213(1), 73-81.
- KLOOSTER, A., Larkin, J.R., Wiersema-Buist, J., Gans, R.O.B., Thornalley, P.J., Navis, G., van Goor, H., Leuvenik, H.G.D. & Bakker, S.J.L. (2013). *Alcohol*, 47(3), 215-221.
- KOOLHAAS, J.M. (2008). Coping style and immunity in animals: Making sense of individual variation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(5), 662–667.
- KOOLHAAS, J.M., de Boer, S.F., Coppens, C.M., Buwalda, B. (2010). Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), 307-321.
- KOOLHAAS, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W. & Blokhuis, H.J. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(7), 925–935.
- KOOLHAAS, J.M., de Boer, S.F., Buwalda, B. & van Reenen, K. (2007). Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. *Brain Behav Evol.*, 70(4), 218-26.
- KORTE, S.M., Koolhaas, J.M., Wingfield, J.C., McEwen, B.S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(1), 3–38.
- LI, X.B., Inoue, T., Nakagawa, S. & Koyama, T. (2004). Effect of mediodorsal thalamic nucleus lesion on contextual fear conditioning in rats. *Brain Research*, 1008(2), 261-72.
- LISBOA, C., Koller, S.H., Ribas, F.F., Bitencourt, K., Oliveira, L., Porciuncula, L.P., De Marchi, R.P. (2002). Estratégias de coping de crianças vítimas e não-vítimas de violência doméstica. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, 15(2), 345-362.

- LIU, J.Y., Timm, D.E. & Hurley, T.D. (2006). Pyriethamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *J Biol Chem*, 281(10), 6601-6607.
- MÄLLO, T., Alttoa, A., Kõiv, K., Tõnissaar, M., Eller, M. & Harro, J. (2007a). Rats with persistently low or high exploratory activity: behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behavioral Brain Research*, 177(2), 269-81.
- MÄLLO, T., Matrov, D., Herm, L., Kõiv, K., Eller, M., Rinken, A. & Harro, J. (2007b). Tickling-induced 50kHz ultrasonic vocalization is individually stable and predicts behaviour in tests of anxiety and depression in rats. *Behavioral Brain Research*, 184(1), 57-71.
- MAREN, S. & Hobin, J.A. (2007). Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala. *Learning & Memory*, 14(4), 318-24.
- MEE, L., Nabokina, S.M., Thillai Sekar, V., Subramanian, V.S., Maedler, K. & Said, H.M. (2009). Pancreatic beta cells and islets take up thiamin by a regulated carrier-mediated process: studies using mice and human pancreatic preparations. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297(1), G197–206.
- MEERLO, P., Horvath, K.M., Nagy, G.M., Bohuds, B. & Koolhaas, J.M. (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(12), 925–933.
- MONDA, M., Viggiano, A. & De Lucca, V. (2003). An aversive diet as thiamine-free food blocks food-induced release of excitatory amino acids in the accumbens. *Acta Physiol Scand*, 178(3), 197-203.
- MORRISON, K.E., Swallows, C.L. & Cooper, M.A. (2011). Effects of dominance status on conditioned defeat and expression of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *Physiology and Behavior*, 104, 283-290.
- MOUSSEAU, D.D., Rao, V.L. & Butterworth, R.F. (1996). Na⁺,K⁺-ATPase activity is selectively increased in thalamus in thiamine deficiency prior to the appearance of neurological symptoms. *European Journal of Pharmacology*, 300(3), 191-196.
- MURTA, S.G. & Tróccoli, B.T. (2005). Parando de beber: estágios de mudança vividos por ex-alcoolistas. *Estudos de Psicologia*, 22(2), 157-166.

- NAKAGAWASAI, O., Murata, A., Arai, Y., Ohba, A., Wakui, K., Mitazaki, S., Nijima, F., Tan-No, K. & Tadano, T. (2007). Enhanced head-twitch response to 5-HT-related agonists in thiamine-deficient mice. *Journal of Neural Transmission*, 114(8), 1003-1010.
- NAVARRO, D., Zwingmann, C., Hazzell, A.S. & Butterworth, R.F (2005). Brain Lactate Synthesis in Thiamine Deficiency: A Re-evaluation Using ^1H - ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Neuroscience Research*, 79 (1-2), 33–41.
- OTTONI, E.B. (2000). EthoLog 2.2 – a tool for the transcription and timing of behavior observation session. *Behavior Research Methods, Instruments & Computers*, 32(3), 446-449.
- PADILLA-COREANO, N., Do-Monte, F.H. & Quirk, G.J. (2012). A time-dependent role of midline thalamic nuclei in the retrieval of fear memory. *Neuropharmacology*, 62(1), 457-463.
- PANKSEPP, J., Jalowiec, J., DeEsquinazi, F.G., Bishop, P. (1985). Opiates and play dominance in juvenile rats. *Behavioral Neuroscience*, 99(3), 441-453.
- PANZINI, R.G. & Bandeira, D.R. (2007). Coping (enfrentamento) religioso/espiritual. *Rev. Psiq. Clín.*, 34(1), 126-135.
- PAULS, C.A. & Stemmler, G. (2003). Repressive and defensive coping during fear and anger. *Emotion*, 3, 284-302.
- PIJLMAN, F.T.A. & van Ree, J.M (2002). Physical but not emotional stress induces a delay in behavioural coping responses in rats. *Behavioural Brain Research*, 136(2), 365-373.
- PIJLMAN, F.T.A., Herremans A.H.J., de Kieft, J., Kruse, C.G. & van Ree, J.M. (2003). Behavioural changes after different stress paradigms: prepulse inhibition increased after physical, but not emotional stress. *European Neuropsychopharmacology*, 13(5), 369–380.
- PIRES, R.G.W., Pereira, S.R.C., Oliveira-Silva, I.F., Franco, G.C., Ribeiro, A.M (2005). Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial

information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Behavioural Brain Research*, 162(1), 11-21.

PITKIN, S.R. & Savage, L.M. (2001). Aging potentiates the acute and chronic neurological symptoms of pyridoxamine-induced thiamine deficiency in the rodent. *Behavioural Brain Research*, 119(2), 167–177.

RAZALI N. & Wah Y. (2011). Power Comparison of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21-33.

RESENDE, L.S., Ribeiro, A.M., Werner, D. & Savage, L.M. (2012). Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. *Behav Brain Res*, 232(2), 421-425.

ROY,V. & Chapillon,P. (2002). The positive effects of postnatal handling on defensive burying are more obvious in a situation that enlarges the potential coping responses. *Behavioural Brain Research*, 136 (1), 67-73.

SACULINGGAN, M. & Balase, E.A. (2013). Empirical Power Comparison Of Goodness of Fit Tests for Normality In The Presence of Outliers. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 435, 012041.

SECCHI, G.P. & Serra, A. (2007). Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. *Lancet Neurol*, 6, 442-455.

SGOIFO, A., De Boer, S.F., Haller, J. & Koolhaas, J.M. (1996). Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of Wild-Type rats: relationship with aggression. *Physiology & Behavior*, 60(6), 1403–1407.

SINGH, S. & Kumar, A. (2007). Wernicke encephalopathy after obesity surgery: a systematic review. *Neurology*, 68(11), 807-811.

SOHRABINIA, M. (2012). Remove outliers. *Disponível online em* <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/37211-remove-outliers>.
Acessado em 22/9/2014.

SOUTHWICK, S.M., Vythilingam, M. & Charney, D.S. (2005). The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu Rev Clin Psychol*, 1, 255-291.

STEIMER, T., Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A. & Driscoll, P. (1998). Long-term behavioural and neuroendocrine changes in roman high-(rha/verh) and low-(rla/verh) avoidance rats following neonatal handling. *International Journal of Development Neuroscience*, 16(3-4), 165-174.

SULLIVAN E.V. & Fama R. (2012). Wernicke's encephalopathy and Korsakoff's syndrome revisited. *Neuropsychology Review*, 22(2), 69–71.

TANAKA, T., Yamamoto, D., Sato, T., Tanaka, S., Usui, K., Manabe, M., Aoki, Y., Iwashima, Y., Saito, Y., Mino, Y. & Deguchi, H. (2011). Adenosine thiamine triphosphate (AThTP) inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 57(2), 192-196.

THOMPSON, R. (1985). A note on restricted maximum likelihood estimation with an alternate outlier method. *J R Stat Soc B*, 47(1), 53-55.

THORNALLEY, P.J., Babaei-Jadidi, R., Al Ali, H., Rabbani, N., Antonysunil, A., Larkin, J., Ahmed, A., Rayman, G. & Bodmer, C.W. (2007). High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. *Diabetologia*, 50(10), 2164–2170.

THOMPSON, A.D. & Marshall, E.J. (2006). The natural history and pathophysiology of Wernicke's Encephalopathy and Korsakoff's Psychosis. *Alcohol Acohol.*, 41(2), 151-158.

TODD, K.G. & Butterworth, R (1999). Mechanisms of Selective Neuronal Cell Death due to Thiamine Deficiency. *Annals New York Accademy of Science*, 893, 404-411.

VAN WOERT, M.H., Plaitakis, A., Hwang, E.C. & Berl, S. (1979). Effect of thiamine on brain serotonin turnover. *Brain Res.*, 179(1), 103-110.

VERTES, R.P. (2002). Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J Comp Neurol*, 442(2), 163-187.

VETRENO, R.P., Ramos, R.L., Anzalone, S. & Savage, L.M. (2012). Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Brain Res*, 1436, 178-192.

VIANNA, D.M.L. & Brandão, M.L. (2003). Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. Periaqueductal gray hodology and function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 557-566.

VIGIL, F.A.B., Oliveira-Silva, I.F., Ferreira, L.F., Pereira, S.R.C. & Ribeiro, A.M. (2010). Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behavioural Brain Research*, 210(1), 140-142.

VOLVERT, M.L., Seyen, S., Piette, M., Evrard, B., Gangolf, M., Plumier, J.C., Bettendorf, L. (2008). Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol*, 8(10).

WALKER, J. & Kepner, A. (2012). Wernicke's encephalopathy presenting as acute psychosis after gastric bypass. *J Emerg Med*, 43(5), 811-814.

World Health Organization [WHO] (2013). Diabetes. Disponível online em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>, acessado em 22/9/2014.

ZARROS, A., Liapi, C., Al-Humadi, H., Almpani, M., Stolaskis, V., Skandali, N. (2013). Experimentally-induced Wernicke's encephalopathy modifies crucial rat brain parameters: the importance of Na⁺,K⁺-ATPase and a potentially neuroprotective role for antioxidant supplementation. *Metabolic Brain Disease*, 28(3), 387-396.

ANEXOS

Perda de peso ao longo do experimento.

Realizamos teste-t para igualdade de médias e de Levene para igualdade de variâncias para todas as medidas de peso corporal, consumo de água e ração utilizados neste trabalho. Os resultados estão expressos abaixo, sendo “F” o valor da estatística de Fischer, “T” o valor da estatística t e “Sig” o valor de p para o teste-t.

Medida	Evento	F (Levene)	sig (Levene)	T	Sig
8/9	19 dias pré	2,666	0,113	0,398	0,693
10/9	17 dias pré	2,056	0,162	0,597	0,555
12/9	15 dias pré	2,203	0,148	0,679	0,502
14/9	13 dias pré	3,801	0,061	1,186	0,245
16/9	11 dias pré	2,330	0,137	0,704	0,487
19/9	8 dias pré	0,967	0,333	-0,094	0,926
21/9	6 dias pré	0,637	0,431	0,697	0,491
24/9	MC1	0,870	0,358	0,373	0,712
27/9	Ração DEF	0,383	0,541	-0,145	0,886
1/10	5 dias DEF	1,477	0,234	1,309	0,201
6/10	9 dias DEF	2,787	0,105	5,140	<0,001
10/10	14 dias DEF	2,073	0,160	5,676	<0,001

14/10	17 dias DEF	1,561	0,221	6,942	<0,001
18/10	21 dias DEF	1,135	0,295	8,042	<0,001
21/10	25 dias DEF	0,093	0,763	10,148	<0,001
25/10	28 dias DEF	0,044	0,835	11,760	<0,001
28/10	32 dias DEF	0,078	0,782	12,905	<0,001
1/11	35 dias DEF	0,021	0,885	13,312	<0,001
4/11	39 dias DEF	0,623	0,436	14,145	<0,001
8/11	42 dias DEF	2,691	0,111	15,196	<0,001
11/11	46 dias DEF	2,606	0,117	15,962	<0,001
15/11	Ração CTR	0,692	0,412	17,150	<0,001
18/11	MC2	1,059	0,312	14,787	<0,001
22/11	7 dias pós	2,186	0,150	10,737	<0,001
25/11	10 dias pós	3,949	0,056	9,296	<0,001
29/11	14 dias pós	0,338	0,565	8.800	<0,001

Consumo de água ao longo do experimento

Medida	Evento	F (Levene)	sig (Levene)	t	Sig
8/9	19 dias pré	0,045	0,838	0,015	0,561
10/9	17 dias pré	0,565	0,481	0,650	0,540
12/9	15 dias pré	1,226	0,311	0,873	0,416
14/9	13 dias pré	0,151	0,711	-0,209	0,841
16/9	11 dias pré	0,685	0,440	-0,173	0,868

19/9	8 dias pré	0,403	0,549	0,336	0,749
21/9	6 dias pré	10,879	0,016	1,414	0,248
24/9	MC1	1,340	0,291	0,543	0,607
27/9	Ração DEF	0,341	0,581	0,793	0,458
1/10	5 dias DEF	0,054	0,824	1,058	0,331
4/10	8 dias DEF	2,574	0,160	1,987	0,094
7/10	11 dias DEF	4,614	0,075	1,909	0,105
11/10	15 dias DEF	0,001	0,982	1,881	0,109
14/10	18 dias DEF	3,882	0,096	2,968	0,025
18/10	22 dias DEF	9,026	0,024	4,635	0,004
21/10	25 dias DEF	5,388	0,059	1,522	0,179
25/10	28 dias DEF	1,906	0,217	2,253	0,065
28/10	32 dias DEF	10,539	0,018	2,051	0,109
1/11	35 dias DEF	2,380	0,174	5,838	0,001
4/11	39 dias DEF	4,468	0,079	3,058	0,022
8/11	42 dias DEF	5,129	0,064	4,785	0,003
11/11	46 dias DEF	0,700	0,435	-5,367	0,002
15/11	Ração CTR	0,181	0,686	9,091	<0,001
18/11	MC2	1,974	0,210	-2,145	0,076
25/11	10 dias pós	2,110	0,197	-1,855	0,113
29/11	14 dias pós	0,586	0,473	-0,923	0,392

Consumo de Ração ao longo do experimento

Medida	Evento	F (Levene)	sig (Levene)	t	Sig
8/9	19 dias pré	1,780	0,231	0,583	0,581
10/9	17 dias pré	5,708	0,054	0,366	0,727
12/9	15 dias pré	1,200	0,315	1,116	0,307
14/9	13 dias pré	3,109	0,128	0,814	0,447
16/9	11 dias pré	0,545	0,488	0,118	0,910
19/9	8 dias pré	0,044	0,840	0,476	0,651
21/9	6 dias pré	0,455	0,525	2,022	0,090
24/9	MC1	2,488	0,166	1,227	0,266
27/9	Ração DEF	0,358	0,571	-0,048	0,964
1/10	5 dias DEF	0,564	0,481	3,445	0,014
4/10	8 dias DEF	0,806	0,404	4,942	0,003
7/10	11 dias DEF	3,074	0,130	3,027	0,023
11/10	15 dias DEF	1,889	0,218	3,057	0,022
14/10	18 dias DEF	1,459	0,273	6,666	0,001
18/10	22 dias DEF	1,504	0,266	10,606	<0,001
21/10	25 dias DEF	4,049	0,091	7,881	<0,001
25/10	28 dias DEF	0,413	0,544	7,746	<0,001
28/10	32 dias DEF	3,387	0,115	7,355	<0,001
1/11	35 dias DEF	0,164	0,699	6,388	<0,001
4/11	39 dias DEF	2,687	0,152	14,472	<0,001

8/11	42 dias DEF	0,011	0,919	11,023	<0,001
11/11	46 dias DEF	0,450	0,527	-10,567	<0,001
15/11	Ração CTR	2,979	0,135	8,584	<0,001
18/11	MC2	4,125	0,089	-1,729	0,135
25/11	10 dias pós	4,332	0,083	-4,067	0,007
29/11	14 dias pós	0,080	0,787	-2,376	0,055