

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

Polliana Toledo Nunes

**Efeitos da restrição de tiamina e da gestação, em fêmeas Wistar,
sobre os níveis periféricos e centrais de tiamina e derivados
fosforilados, BDNF e aspectos comportamentais**

BELO HORIZONTE

2012

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

Polliana Toledo Nunes

**Efeitos da restrição de tiamina e da gestação, em fêmeas Wistar,
sobre os níveis periféricos e centrais de tiamina e derivados
fosforilados, BDNF e aspectos comportamentais**

Orientadora: Angela Maria Ribeiro

Colaborador: Enrico Antônio Colosimo

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

BELO HORIZONTE

2012

Nunes, Polliana Toledo

Efeitos da restrição de tiamina e da gestação, em fêmeas Wistar, sobre os níveis periféricos e centrais de tiamina e derivados fosforilados, BDNF e aspectos comportamentais. [manuscrito] / Polliana Toledo Nunes. – 2012.

160 f. ; il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Angela Maria Ribeiro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Gravidez – Teses. 2. Deficiência de vitamina B1 – Teses. 3. Comportamento - Avaliação – Teses. 4. Neurociências – Teses. 5. Fator neurotrófico derivado do cérebro. 6. Ratos Wistar. I. Ribeiro, Ângela Maria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8

REITOR

Profº Clélio Campolina

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profª Andréa Gazzinelli Corrêa de Oliveira

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profº Thomaz Haroldo da Mota Santos

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Profª Angela Maria Ribeiro

COLEGIADO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Profº Antônio Lúcio Teixeira Júnir (Subcoordenador)

Profº Helton José dos Reis

Profº Carlos Júlio Tierra Criollo

Profº Vitor Geraldi Haase

Profº Fabrício de Araújo Moreira

Kenia de Oliveira Bueno (Representante discente)

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão, ao Ricardo, aos meus familiares e a todos os meus amigos, pelo apoio e incentivo nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pelas bênçãos e graças derramadas durante essa caminhada!

Agradeço aos meus pais, Arani e Donizeti, pelo apoio, amor incondicional e por não medirem esforços para a realização desse sonho.

Ao meu irmão Plínio, pelo incentivo e força transmitidos durante toda minha vida.

Ao Ricardo, agradeço pela paciência, compreensão e companheirismo em todos os momentos.

Agradeço aos meus familiares pela torcida.

Aos meus amigos de sempre, pela alegria.

Aos amigos do LaNeC - aqueles que já se foram e aqueles que continuam - pelo aprendizado, conhecimentos e sentimentos compartilhados durante todo esse tempo de convivência.

Às professoras Angela Ribeiro e Silvia Castanheira (*sempre presente*) pela oportunidade, confiança e pelos ensinamentos.

Ao professor Enrico Antônio Colosimo pelos ensinamentos estatísticos e a todos que contribuíram para a realização desse trabalho através dos ensinamentos científicos!

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram e me incentivaram a conquistar esse sonho!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Resumo	xvi
<i>Abstract</i>	xviii
Introdução	1
1. Aspectos Gerais	1
2. Gestação e demanda nutricional	3
3. Tiamina e as consequências de sua deficiência.....	5
4. Deficiência Maternal de Tiamina	9
5. Gestação e estado emocional	13
6. BDNF (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)	15
Justificativa.....	20
Objetivos	22
Material e métodos	23
1. Modelo Animal e Delineamento Experimental	23
1.1. Desenvolvimento do modelo experimental	23
1.2. Delineamento Experimental	26
2. Estudo Comportamental	32
2.1. Equipamento - Labirinto em T-Elevado (LTE)	32
3. Estudos Bioquímicos	34
3.1. Obtenção das amostras biológicas.....	34
3.2. Determinações dos níveis de tiamina e suas formas fosforiladas	35
3.3. Determinação dos níveis de BDNF	40
4. Análises Estatísticas	42
Resultados	47
1. Modelo Experimental	47
1.1. Variação do Peso Corporal.....	47

1.2. Consumo de Ração	52
1.3. Consumo de Água	57
1.4. Pesos Encefálicos	61
1.5. Dados dos fetos	62
2. Estudos Comportamentais	64
2.1. Teste de Esquiva Inibitória – Aprendizado e memória.....	64
2.2. Teste de Fuga - Aprendizado e memória	68
3. Estudos Bioquímicos	72
3.1. Determinações dos níveis de tiamina e suas formas fosforiladas	72
3.2. Determinações das concentrações de BDNF	85
4. Estudos de Correlação	88
4.1. Concentrações de tiamina e seus derivados	89
4.2. Concentrações de BDNF	94
Discussão	95
Conclusões	119
Considerações finais e Perspectivas	121
Anexos	123
Referências Bibliográficas	145

Figura 01	Fotomicrografia da citologia exfoliativa vaginal de ratas Wistar	23
Figura 02	Esquema do delineamento experimental	29
Figura 03	Foto do Labirinto em T Elevado	34
Figura 04	Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	36
Figura 05	Cromatograma representativo da análise das concentrações de tiamina e suas formas fosforiladas presentes no sangue de ratos <i>Wistar</i>	37
Figura 06	Representação esquemática da reação de derivatização de tiamina com ferricianeto de potássio	40
Figura 07	Representação esquemática das etapas do teste de imunensaio ELISA	41
Figura 08	Gráficos com dados da variação do peso corporal dos animais	49
Figura 09	Gráficos com dados da variação do peso corporal por período	50
Figura 10	Gráficos com dados da variação do peso corporal semanal	52
Figura 11	Gráficos com dados do consumo de ração dos animais ao longo dos períodos	55
Figura 12	Gráficos com dados do consumo de ração por semana	57
Figura 13	Gráficos com dados do consumo de água dos animais ao longo dos períodos	59
Figura 14	Gráficos com dados do consumo de água por semana	61
Figura 15	Gráficos com dados do peso dos encéfalos	62
Figura 16	Gráficos com dados do número de fetos	63
Figura 17	Gráficos com dados dos pesos dos fetos	64
Figura 18	Dados do desempenho dos animais no teste de esQUIVA INIBITÓRIA.....	67
Figura 19	Dados do desempenho dos animais no teste de esQUIVA INIBITÓRIA expressos em porcentagem de latência.	68
Figura 20	Dados do desempenho dos animais no teste de fuga	71
Figura 21	Dados do desempenho dos animais no teste de fuga expressos em porcentagem de latência	72
Figura 22	Gráficos das curvas de calibração das concentrações de tiamina e derivados	74
Figura 23	Gráficos da estabilidade da tiamina e seus derivados após derivatização.....	76
Figura 24	Gráficos com dados das concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de sangue	79

Figura 25	Gráficos com dados das concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de hipocampo	81
Figura 26	Gráficos com dados das concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de tálamo	84
Figura 27	Gráficos com dados das concentrações de BDNF nas amostras de plasma.....	86
Figura 28	Gráficos com dados das concentrações de BDNF nas amostras de hipocampo	87
Figura 29	Gráficos de Dispersão: correlações entre concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de hipocampo e sangue	90
Figura 30	Gráficos de Dispersão: correlações entre concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de tálamo e sangue.....	92
Figura 31	Gráficos de Dispersão: correlações entre concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de tálamo e hipocampo.....	93
Figura 32	Gráfico de Dispersão: correlação entre as concentrações de BDNF no plasma e no hipocampo	94

Tabela 01	Composição da ração produzida no laboratório.....	25
Tabela 02	Composição da mistura de sais.....	25
Tabela 03	Composição da mistura de vitaminas	26
Tabela 04	Dados referentes ao desempenho dos animais no teste de Esquiva Inibitória	65
Tabela 05	Dados referentes ao desempenho dos animais no teste de Fuga.....	69
Tabela 06	Dados referentes à reprodutibilidade intradia e interdia das dosagens de tiamina e derivados	75
Tabela 07	Dados referentes à recuperação de tiamina e seus derivados	77
Tabela 08	Dados das Análises de Variância: concentrações de tiamina e seus derivados fosforilados em amostras de sangue	80
Tabela 09	Dados das Análises de Variância: concentrações de tiamina e seus derivados fosforilados em amostras de hipocampo	82
Tabela 10	Dados das Análises de Variância: concentrações de tiamina e seus derivados fosforilados em amostras de tálamo	85
Tabela 11	Dados das Análises de Variância: concentrações de BDNF nas amostras de plasma	86
Tabela 12	Dados das Análises de Variância: concentrações de BDNF nas amostras de hipocampo	87
Tabela 13	Dados referentes aos pesos corporais das ratas Não Gestante Padrão	124
Tabela 14	Dados referentes aos pesos corporais das ratas Não Gestante Restrita.....	125
Tabela 15	Dados referentes aos pesos corporais das ratas Gestante Padrão	126
Tabela 16	Dados referentes aos pesos corporais das ratas Gestante Restrita.....	127
Tabela 17	Dados referentes ao consumo de ração das ratas Não Gestante Padrão	128
Tabela 18	Dados referentes ao consumo de ração das ratas Não Gestante Restrita	129
Tabela 19	Dados referentes ao consumo de ração das ratas Gestante Padrão	130
Tabela 20	Dados referentes ao consumo de ração das ratas Gestante Restrita.....	131
Tabela 21	Dados referentes ao consumo de água das ratas Não Gestante Padrão.....	132
Tabela 22	Dados referentes ao consumo de água das ratas Não Gestante Restrita	133
Tabela 23	Dados referentes ao consumo de água das ratas Gestante Padrão	134
Tabela 24	Dados referentes ao consumo de água das ratas Gestante Restrita	135
Tabela 25	Dados referentes aos pesos encefálicos das ratas dos 4 grupos experimentais.....	136

Tabela 26	Dados referentes à quantidade de fetos e à média do peso dos fetos	137
Tabela 27	Dados referentes ao desempenho das ratas Não Gestante Padrão no teste Labirinto em T Elevado	138
Tabela 28	Dados referentes ao desempenho das ratas Não Gestante Restrita no teste Labirinto em T Elevado	139
Tabela 29	Dados referentes ao desempenho das ratas Gestante Padrão no teste Labirinto em T Elevado	140
Tabela 30	Dados referentes ao desempenho das ratas Gestante Restrita no teste Labirinto em T Elevado	141
Tabela 31	Dados referentes à média das concentrações de tiamina e seus derivados	142
Tabela 32	Dados referentes à média das concentrações de BDNF.....	143
Tabela 33	Dados referentes às análises de regressão linear	144

b

μ - micro

ANOVA - Análise de Variância

B1 – Vitamina B1 = Tiamina

BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*: Fator neurotrófico derivado do cérebro

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*: Ácido Desoxirribonucléico

DPR - Desvio Padrão Relativo

DT - Deficiência de Tiamina

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*: Ensaio Imunoenzimático

EPM - *Elevated plus-maze*: Labirinto em Cruz Elevado

EW - Encefalopatia de Wernicke

g - gramas

GABA - *γ-Aminobutíric Acid*: Ácido γ-aminobutírico

GP - Gestante Padrão

GR - Gestante Restrita

HPA - *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*: Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LaNeC – Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular

LTD – *Long-Term Depression*: Depressão de Longa Duração

LTE - Labirinto em T Elevado

LTP – *Long-Term Potentiation*: Potencialização de Longa Duração

m - Mili

M - Molar

min - minutos

ml - mililitro

NaCl - Cloreto de Sódio

ng- nanogramas

NGF - *Nerve Growth Factor*: Fator de Crescimento Neural

NGP - Não Gestante Padrão

NGR - Não Gestante Restrita

nmol - nanomol

NT-3 -*Neurotrophin 3*: Neurotrofina 3

NT-4 -*Neurotrophin 4*: Neurotrofina 4

OD – *Optical Density*: Densidade Óptica

pg - picograma

PMSF – *Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride*: Fluoreto de Metilfenilsulfonila

s – segundos

SEM- *Standard error of mean* : Erro Padrão da Média

SNC - Sistema Nervoso Central

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*: Pacote Estatístico para Ciência Social

TCA – *Trichloroacetic Acid*: Ácido tricloroacético

TDP - *Thiamine Diphosphate*: Tiamina Difosfato

TMP – *Thiamine Monophosphate*: Tiamina Monofosfato

TNF - *Tumoral Necrose Factor*: Fator de Necrose Tumoral

TPP – *Thiamine Pyrophosphate*: Tiamina Pirofosfato

TrkB – *Tyrosine Kinase B*: Tirosina Cinase B

TTP – *Thiamine Triphosphate*: Tiamina Trifosfato

v/v - Volume por volume

WHO - *World Health Organization*: Organização Mundial de Saúde

WKS – *Wernicke-Korsakoff Syndrome*: Síndrome de Wernicke–Korsakoff

Os efeitos da restrição de tiamina e da gestação sobre os níveis centrais e periféricos da tiamina e seus derivados, da neurotrofina BDNF e aspectos comportamentais são os fenômenos abordados no presente estudo. Existem várias evidências indicando que a deficiência de tiamina (vitamina B1) induz lesões em diversas regiões cerebrais podendo afetar circuitos neuroquímicos centrais, os quais estão relacionados com vários aspectos comportamentais. Alguns pesquisadores também têm utilizado o modelo de deficiência de tiamina em ratas grávidas e/ou lactantes, com a finalidade de verificar as consequências, em aspectos neurobiológicos e comportamentais, na prole. Entretanto, com exceção de um trabalho realizado em 1965, não existem estudos em modelo experimental com o propósito de se entender as consequências da deficiência dessa vitamina na própria gestante. O objetivo do presente estudo foi iniciar a caracterização de um modelo de restrição maternal de tiamina, com enfoque em alterações bioquímicas – níveis sistêmico e em regiões cerebrais de tiamina e seus derivados e BDNF - e aspectos do comportamento emocional e cognitivo da gestante. Setenta e duas ratas *Wistar*, três meses de idade, foram divididas em quatro grupos experimentais: não gestante padrão (n=18), gestante padrão (n=18), não gestante restrita (n=18) e gestante restrita (n=18). Dentre esses grupos, as ratas foram subdivididas e avaliadas em grupos de acordo com três períodos distintos em relação ao tempo de gestação das fêmeas (Período 1: 1ª semana; Período 2: 1ª e 2ª semanas e Período 3: 1ª, 2ª e 3ª semanas). Cada subgrupo foi submetido a testes comportamentais (avaliação do estado emocional: ansiedade e medo) no Labirinto em T Elevado (LTE). Após os testes comportamentais os animais foram mortos e amostras periféricas (sangue e plasma) e as regiões do tálamo e hipocampo foram retiradas para as análises das frações de tiamina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*) ou imunoenensaio ELISA para dosagens do BDNF. Observamos que a restrição de tiamina afeta o ganho de peso apenas no período correspondente à 3ª semana de gravidez e que os efeitos dessa restrição sobre o consumo de

alimentos são mais pronunciados em ratas gestantes do que em ratas não gestantes. As ratas de todos os grupos foram capazes de aprender a tarefa de esquiva inibitória e conseguiram, depois de 72 horas, recuperar parcialmente a informação adquirida. Portanto, os dados mostram que uma deficiência subclínica de tiamina em gestantes é capaz de interferir, principalmente no período final da gestação, com o comportamento alimentar, parâmetros bioquímicos (níveis de tiamina e seus derivados e BDNF) sistêmicos e cerebrais da mãe e com o desenvolvimento dos fetos.

PALAVRAS-CHAVES: gestação; restrição de tiamina; TMP e TDP; BDNF; comportamento; sangue; tálamo; hipocampo; ratas Wistar.

The purposes of the present study were to verify the effects of thiamine (vitamin B1) restriction and pregnancy on the central and peripheral levels of thiamine and its derivatives, neurotrophin BDNF and behavioral aspects. Several authors have shown that thiamine deficiency causes lesions in different brain regions and affects central neurochemical circuits, which are related to various aspects of behavior. Researchers have also used the model of thiamine deficiency in pregnant rats and/or lactating rats, in order to verify the effects on neurobiological and behavioral aspects, in the offspring. However, as far as we know, there is only one study conducted in 1965, in which the authors used an experimental model to evaluate the effects of the thiamine deficiency on pregnant rats. Thus, as a first step to characterize a rat model of maternal restriction of thiamine, the aim of the present study were to assess biochemical changes - levels of thiamine and its derivatives and BDNF in the blood and brain areas - and cognitive and emotional aspects of the experimental subjects. Seventy two females rats, three months old, were divided into four subgroups: Standard Pregnant rats (n = 18), Standard Non-Pregnant rats (n = 18), Thiamine-Restricted Pregnant rats (n = 18) and Thiamine-Restricted Non-Pregnant rats (n = 18). Following the rats from each of these groups were subdivided according to three distinct periods in relation to the pregnancy process (period 1: 1st week; Period 2: 1st and 2nd weeks and Period 3: 1st, 2nd and 3rd weeks). Animals from each group were submitted to behavioral tests, to evaluate emotional and cognitive aspects, in the elevated T maze. After the behavioral tests the animals were killed and peripheral samples (blood and plasma) and brain areas (thalamus and hippocampus) were collected for thiamine and its derivatives analysis by High Performance Liquid Chromatography and BDNF immunassay by ELISA. Thiamine restriction affects weight gain only in the period corresponding to the 3rd week of pregnancy. In addition, the effects of this restriction on food consumption were more pronounced in pregnant rats than in non-pregnant rats. The rats of all groups were able to learn the inhibitory avoidance task and

succeeded to retrieve the information acquired 72 hours before. In conclusion, the data show that subclinical thiamine deficiency in pregnant rats interferes, mainly in the late-stage of pregnancy, with the feeding behavior, biochemical parameters (levels of thiamine and its derivatives and BDNF) in the dam's blood and brain regions. In addition, the present results show that a subclinical thiamine restriction adversely affects the development of the fetus.

KEYWORDS: pregnancy; thiamine restriction; TMP and TDP; BDNF, behavior; blood; thalamus; hippocampus; Wistar rats.

1. Aspectos gerais

Os fenômenos abordados no presente estudo são a gestação e a restrição da vitamina B1, também denominada tiamina. Uma das questões centrais levantadas é se os efeitos da deficiência de tiamina são diferentes em grávidas, quando comparado aos efeitos em fêmeas não grávidas. Ou seja, a gravidez tornaria os indivíduos mais ou menos susceptíveis aos efeitos da deficiência de tiamina, ou não afetaria essa susceptibilidade?

Existem evidências que a tiamina, além da função como coenzima em reações do metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs, desempenha um papel específico no sistema nervoso, como por exemplo, na regulação de canais iônicos (Oliveira et al., 2007). A deficiência de tiamina induz a neurodegeneração em regiões específicas do sistema nervoso central (SNC), resultando em alterações neurológicas, comportamentais e cognitivas, que caracterizam uma síndrome denominada Síndrome de Wernicke (Navarro et al., 2005). Dependendo da gravidade do comprometimento cognitivo, com manifestações de quadros de amnésia, essa síndrome passa a ser denominada Síndrome de Wernicke-Korsakoff (Vetreno et al., 2012). Nosso grupo tem trabalhado com o modelo da deficiência de tiamina em roedores, como um instrumento para estudar as relações entre disfunções neurobiológicas e aspectos comportamentais e cognitivos (Ferreira-Vieira, 2010; Freitas-Silva et al., 2010; Oliveira et al., 2007; Carvalho et al., 2006; Pires et al., 2005). Esse modelo representa uma estratégia interessante para se conhecer os substratos neurobiológicos de fenômenos comportamentais. Estendendo esses estudos, nossa equipe (Ferreira-Vieira, 2010; Freitas-Silva et al., 2010; Oliveira et al., 2007) e outros autores (Ramakrishnan et al, 1999; Bâ et al., 1999; Bâ et al., 2005), têm utilizado esse modelo de deficiência de tiamina em ratas grávidas e/ou lactantes, com a finalidade de verificar as consequências, em aspectos neurobiológicos e

comportamentais, na prole. No entanto, existem poucos estudos delineados com o objetivo de se entender as consequências da deficiência dessa vitamina na própria gestante. Alguns poucos estudos clínicos tem sido executados (Vir et al., 1980; Butterworth et al., 1993; Baker et al., 2002), mas não encontramos na literatura nenhum estudo experimental com o objetivo de caracterizar o modelo da deficiência de tiamina maternal, com enfoque em alterações bioquímicas e aspectos específicos do comportamento da gestante.

O presente trabalho representa um primeiro passo no sentido de contribuir para o entendimento das relações entre os efeitos da gestação e da deficiência de tiamina na própria gestante. Com esse objetivo, propomos caracterizar alguns aspectos do modelo experimental de deficiência de tiamina maternal, como por exemplo, determinações da variação de peso corporal, dos consumos de alimentos e também dos níveis de tiamina e seus derivados fosforilados em regiões do sistema nervoso central e sangue periférico. Incluímos ainda determinações de um dos fatores neurotróficos envolvidos no desenvolvimento e plasticidade neuronal, *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Além disto, aspectos comportamentais, especificamente ansiedade e medo, foram também avaliados.

De acordo com alguns autores, por ser um período vulnerável, a gestação não protege a futura mãe de transtornos de humor e sim envolve alterações psíquicas e biológicas, podendo refletir na saúde mental da mãe e do filho (Camacho et al., 2006; Eros & Hajós, 2011). No entanto, outros pesquisadores consideram a gestação um período no qual a mulher está mais protegida de estímulos ambientais, que poderiam ser fatores de risco para o aparecimento de distúrbios funcionais e comportamentais para ela e para o bebê (Romano et al., 2006; Dunkel & Tanner, 2012). Independente dessa controvérsia sabe-se que no período gestacional acontecem alterações metabólicas, que caracterizam um estado homeostático no qual os efeitos de

estímulos ambientais podem gerar respostas diferentes, quando comparadas às aquelas que ocorrem em mulheres não grávidas. Essas alterações biológicas (p.ex. hormonais) e comportamentais (p.ex. distúrbios do humor) que conseqüentemente podem interferir na susceptibilidade, maior ou menor, aos estímulos ambientais, podem afetar a gestante e o desenvolvimento do feto.

Além da importância como um modelo para se entender as relações entre mecanismos neurobiológicos e aspectos comportamentais, o conhecimento das possíveis interações entre gestação e deficiência de tiamina se torna particularmente relevante no entendimento de questões relacionadas à saúde pública em países em desenvolvimento. Nesses países, em determinadas regiões é observado um baixo índice de desenvolvimento socioeconômico, com maior probabilidade de ocorrência de carências nutricionais, incluindo a deficiência de vitamina B1. Portanto, a associação da deficiência de tiamina com o estado gestacional pode ser um fator de risco tanto para a mãe como para o feto (p.ex. alta incidência de natimorto) e a compreensão dos mecanismos envolvidos nessa possível interação se torna também relevante para a aplicação de medidas preventivas.

2. Gestação e demanda nutricional

A gravidez, por ser um período de maior demanda nutricional, interfere na intensidade metabólica (Baker et al., 1975) e pode acarretar uma deficiência de elementos essenciais para o desenvolvimento fetal (Blackburn, 2003). A quantidade consumida de nutrientes pelas gestantes aumenta com o progresso da gravidez e pode levar a uma desnutrição fetal (Bamji, 1976; Bamji et al., 2008), resultando no aumento da incidência de abortos, nascimento de

prematturos, baixo peso corporal (Naeye et al., 1969; Scholl, 2008) e podendo levar ao retardo mental (Ramakrishnan et al., 1999).

De acordo com Baker et al. (1975), a má alimentação gestacional pode afetar o metabolismo e a embriogênese. O funcionamento e o crescimento do SNC (Sistema Nervoso Central) também são comprometidos pela desnutrição matutnal e esses efeitos muitas vezes não podem ser sanados por uma boa nutrição pós-natal (Martin, 1973; Granados-Rojas et al., 2002).

Scrimshaw (1970) mostrou que a desnutrição durante o 1º ano de vida leva à diminuição da habilidade de aprendizado e memória de curto prazo nas crianças. Déficit no aprendizado também foi visto em estudos com animais desnutridos submetidos em dieta com restrição calórica, como dietas de baixas proteínas (Cowley, 1968; Ranade et al., 2008). De acordo com Martin (1973), a privação calórica em modelos animais durante o desenvolvimento cerebral leva a prejuízos no peso do cérebro, no número e no tamanho celular, na quantidade de DNA e de mielina.

São conhecidas e estudadas algumas causas de desnutrição matutnal, tais como má absorção dos alimentos por causa de doença ou por ingestão inadequada, falta de conhecimentos sobre a nutrição pré-natal (Gittelsohn et al., 1997) e, hiperemese gravídica (van Stuijvenberg et al., 1995).

A hiperemese gravídica é caracterizada por náuseas e vômitos que persistem após a décima quarta semana de gravidez. Apesar de ocorrer em uma pequena porcentagem entre as mulheres grávidas, a hiperemese precisa ser tratada no início (van Stuijvenberg, 1995). Essa disfunção pode ser considerada uma doença de alto risco, pois, provoca desidratação, perda de

peso, desequilíbrio eletrolítico, afeta o metabolismo e a ingestão nutricional, provocando também debilidade física e psicológica (Ismail & Kenny, 2007; Christodoulou et al., 2008). Devido a hiperemese pacientes podem ter complicações devido a falta de nutrientes, como as vitaminas B1 (tiamina), e B6, a vitamina A e proteína ligada ao retinol (Ismail & Kenny, 2007). Dentre essas complicações, os pacientes com hiperemese gravídica podem desenvolver Encefalopatia de Wernicke (EW) (provocada pela deficiência de tiamina), anomalias renais, sistema imunológico debilitado, podendo levar à morte materna e fetal (Levine & Esser, 1988). Dados da literatura sobre o papel da tiamina e as consequências de sua deficiência, que são focos do presente estudo, estão apresentados abaixo.

Devido à gravidez ser um período vulnerável para a saúde da gestante e do feto, intervenções sobre a nutrição gestacional pode levar a prevenção de deficiências ao longo da vida (Ramakrishnan et al., 1999). Como muitas enzimas e vitaminas atravessam a placenta e caem na circulação fetal (Baker et al., 1975), deficiências desses nutrientes podem levar a prejuízos na gestação (Ramakrishnan et al., 1999). A suplementação de micronutrientes na gestação é sugerida por Ladipo (2000) como recurso de saúde pública em países em desenvolvimento, onde a desnutrição materna é generalizada.

3. Tiamina e as consequências de sua deficiência

A tiamina é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel, que desempenha um papel central no metabolismo cerebral (Héroux & Butterworth, 1995; Martin et al., 2003) e na integridade da membrana de células neuronais (Bâ, 2008). Sua síntese ocorre naturalmente em plantas, fungos e outros microorganismos e é adquirida pelo nosso corpo através do consumo de alimentos, como carnes e cereais (Singleton & Martin, 2001).

De acordo com Singleton e Martin (2001), a vitamina B1 é encontrada no corpo humano em maior concentração nos músculos esqueléticos, no coração, fígado, cérebro e rins. Após ser capitada pelos tecidos, a vitamina B1 é ativada dando origem a forma ativa difosforilada, denominada tiamina pirofosfato (TPP) ou difosfato (TDP), que atua como cofator das enzimas transcetolase, complexo piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, enzimas chaves na manutenção do metabolismo energético celular (Haas, 1988; Berg et al, 2004). Através da atuação nessas reações, participa no metabolismo de neurotransmissores, tais como acetilcolina, GABA, glutamato e aspartato (Martin et al., 2003; Mulholland, 2006). A forma fosforilada TDP representa 80% do total de tiamina presente no SNC (Bâ, 2008).

Além do papel no metabolismo energético, estudos evidenciam outros papéis da tiamina no SNC. Ramakrishna (1999) demonstrou o aumento do conteúdo desta vitamina durante a sinaptogênese sugerindo um possível envolvimento na condução nervosa. Estudos em cultura primária de neurônios sugerem a atuação da tiamina na modulação de canais iônicos (Oliveira et al., 2007). Outros estudos evidenciam suas funções sobre a integridade da membrana de células neuronais (Goldberg et al., 2004; Bâ, 2008), na atuação contra agentes indutores de citotoxicidade (Bâ et al., 1996; Aberle et al., 2004) e na participação em vias fosforilativas de transdução de sinais (Czerniecki et al., 2004). Além da TDP, existem outros derivados fosforilados da tiamina presentes nos tecidos, porém em menor quantidade, como a tiamina monofostato (TMP) e a tiamina trifosfato (TTP) (Makarchikov et al., 2003). Suas funções ainda não estão muito claras, mas algumas evidências indicam que a TTP atua na manutenção da membrana da célula nervosa (Hass, 1988) e na modulação de canais de cloreto (Bettendorff et al., 1994).

A deficiência de tiamina (DT) é induzida pela diminuição da ingestão e/ou absorção, como ocorre na desnutrição associada ou não ao abuso de álcool (Harper, 2009; Kopelman et al., 2009), na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Alcaide et al., 2003) e em doenças gastrointestinais (Butterworth, 2009). Essa deficiência também pode ocorrer pelo aumento da demanda ou pela perda de B1 por hiperemese, que ocorrem durante a gravidez (Butterworth et al., 1993; Baker et al., 2002).

Devido ao requerimento absoluto do metabolismo oxidativo pelo sistema cardiovascular e sistema nervoso, a DT induz à insuficiência cardíaca e à perda neuronal (Gangolf et al., 2010). No SNC, a DT pode causar danos como morte mitocondrial e apoptose celular (Singleton & Martin, 2001), que podem estar associadas às alterações neurológicas conhecidas como Beriberi, Encefalopatia de Wernicke (EW) e Síndrome de Wernicke–Korsakoff (WKS) (Navarro et al., 2005; Vetreno et al., 2012). Os principais sintomas da EW são: oftalmoplegia, ataxia, perda de memória, confusão mental (Butterworth, 2009) e hipoatividade da marcha e da postura (Zubaran et al., 1997).

A DT pode ser reproduzida em modelos animais, como roedores, através da administração de uma dieta deficiente de tiamina associada ou não a uma administração parenteral de pirritiamina, um inibidor da pirofosfocinase, enzima responsável pela produção da forma ativa da tiamina, a TPP (Hakim & Pappius, 1983; Hass, 1988; Vortmeyer & Colmant, 1988; Langlais et al., 1996). Dados obtidos de estudos com modelo experimental mostram que essa deficiência em ratos causa degeneração de axônios do córtex, perda de neurônios e células da glia no tálamo medial e corpos mamilares (Langlais & Zhang, 1997), inflamação, anormalidade no metabolismo oxidativo (Langlais & Savage., 1995; Zhang et al., 2005), além de perdas celulares em regiões encefálicas, como hipocampo, cerebelo, amígdala, tálamo,

colículo inferior e complexo olivar superior (Vortmeyer & Colmant, 1988; Martin et al., 2003). Os sinais característicos da deficiência de tiamina em animais são anorexia, queda de pêlo, hiperatividade a estímulos, hipotonia postural, ataxia, perda do reflexo de endireitamento e convulsões, podendo evoluir para a morte (Mousseau et al., 1996; Ciccia & Langlais, 2000).

Utilizando modelos experimentais, alterações motoras, alterações morfológicas e neuroquímicas, como perda celular e diferentes tipos de lesões no SNC, disfunções nos sistemas GABAérgico, glutamatérgico e colinérgico estão sendo observadas e estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, do Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LaNeC) da UFMG (Ferreira-Vieira, 2010; Freitas-Silva et al., 2010; Oliveira et al., 2007; Carvalho et al., 2006; Pires et al., 2005) e por outros autores (Roland & Savage, 2009; Roland et al., 2008; Bâ, 2008; Shi et al., 2007; Navarro et al., 2005).

Dados obtidos em diversos estudos realizados em modelos experimentais também têm demonstrado que a deficiência de tiamina pode ocasionar alterações cognitivas, representadas principalmente por déficit no aprendizado e memória espacial (Pires et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Zhao et al., 2008) e alterações emocionais (Onodera et al., 1981; Nakagawasai et al., 2001). Com nove dias de DT, baseada em dieta deficiente de tiamina, Zhao et al. (2008) verificaram déficit no aprendizado no labirinto em Y em camundongos e Nakagawasai et al. (2001) verificaram perda de memória em tarefas como esquiva passiva e mudanças no comportamento emocional em tarefas de nado forçado em animais com 25 dias de deficiência. Resultados de estudos com DT induzida por piritiamina também vem mostrando que essa deficiência causa déficits em memória espacial acompanhados por alterações neuroquímicas (Vetreno et al, 2012). Esses prejuízos cognitivos dependem do grau de lesão diencefálica e

cortical, principalmente lesões no tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal (Langlais et al., 1992; Langlais & Savage 1995, Pitkin & Savage, 2004).

4. Deficiência Maternal de Tiamina

A deficiência de tiamina é um dos grandes problemas de saúde pública em muitas populações (McGready et al., 2001). Em amostras de população gestante, de acordo com Baker et al. (2002), a deficiência de tiamina, entre outras vitaminas (vitamina A, niacina e B6), foi observada em cada trimestre de gestação, sugerindo que essas vitaminas são necessárias para o desenvolvimento do feto. Esses autores mostraram que a deficiência de B1 e de outras vitaminas durante a gravidez atingem cerca de 20 a 30% das mulheres grávidas, sendo esse período caracterizado por um aumento da demanda nutricional. Esse aumento pode ser responsável pela desnutrição neonatal a qual pode ser considerada um problema social mundial, ocorrendo com frequência, principalmente, em países em desenvolvimento (WHO, 1999).

Estudos com mulheres grávidas de campo de refugiados na fronteira da Tailândia mostraram que essas mulheres apresentavam deficiência de tiamina desde o início da gestação e que uma suplementação de tiamina não foi suficiente para acabar com a deficiência em 58% das gestantes. Os mesmos autores perceberam que, além da deficiência afetar as mães, a causa da mortalidade infantil foi o beribéri (McGready et al., 2001).

Em 1976, Bamji já relatava que a maior demanda de vitamina B1 durante a gestação ocorre principalmente no último trimestre da gestação, o que pode ser resultado do seqüestro de vitaminas pela placenta e pelo feto e também pelos efeitos metabólitos dos níveis de

hormônios femininos circulantes. Sabe-se que a alta demanda nutricional e fisiológica pode resultar na deficiência maternal de tiamina. Além disto, a vitamina B1 pode ser perdida durante a hiperemese gravídica, resultando também em um quadro de deficiência (Butterworth et al., 1993; Baker et al., 2002).

Vir et al. (1980) ao avaliarem o status da tiamina em mulheres grávidas durante os 3 trimestres e um período pós-parto, observaram que 28 a 39 por cento dessas mulheres grávidas possuíam deficiência de tiamina, sendo que nenhuma dessas possuíam a deficiência durante todos os 3 períodos.

A suplementação de tiamina em mulheres grávidas deveria ser uma medida de saúde pública (Butterworth, 2001), pois de acordo com Bakker et al. (2000) a reposição de tiamina melhora a tolerância das gestantes à glicose e estimula o crescimento intra-uterino, prevenindo assim o baixo peso ao nascer.

Há evidências (Bâ, 2009) de que a deficiência de tiamina pré-natal aumenta (84,47%) o aborto espontâneo, sendo um potente fator de risco nas ocorrências de natimortos, diminuindo (-72,7%) o tamanho da ninhada.

Dados histológicos (Bâ et al., 1999; Bâ et al., 2005), neuroquímicos e comportamentais (Freitas-Silva et al., 2010) obtidos de estudos realizados na prole de ratas que sofreram deficiência de tiamina durante à gestação, indicam a importância desta vitamina em épocas posteriores da vida.

De acordo com Ramakrishnan et al (1999), a deficiência de tiamina em ratas grávidas resulta em seqüelas na prole, tais como defeito do tubo neural, da placenta e do feto, retardo do crescimento intra-uterino, baixo peso ao nascer. Dados da literatura mostram que a ontogênese cerebral é prejudicada por esse tipo de avitaminose (Greenwood & Craig 1987). A falta da tiamina durante o desenvolvimento fetal diminui a atividade das enzimas dependes de tiamina (transcetolase, complexo piruvato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase) no córtex cerebral dos filhotes provenientes das ratas deficientes de tiamina. Sabendo-se que essas enzimas são essenciais para o metabolismo cerebral, sugere-se que a deficiência maternal de tiamina pode levar a seqüelas neurológicas na prole, podendo refletir na vida adulta (Fournier & Butterworth, 1990). Nesse último estudo os autores também mostraram que a avaliação das enzimas dependentes de tiamina nas mães, que receberam dieta deficiente em tiamina, durante a gestação não tiveram alterações significativas quando comparadas àquelas vistas na prole, e sim apenas os efeitos da deficiência foram acentuados em relação às ratas controle (Fournier & Butterworth, 1990). Assim, Butterworth et al. (1993) sugerem que o cérebro em desenvolvimento é mais suscetível à deficiência de tiamina do que o cérebro adulto.

Bell & Stewart (1979) ao avaliarem filhotes de fêmeas gestantes deficientes de tiamina, verificaram como a falta de tiamina leva a disfunção neurológica na prole, as quais tiveram déficit permanente de aprendizagem e memória.

Estudos realizados por Bâ et al. (1999, 2005) utilizando o modelo animal de deficiência de tiamina durante a gestação e lactação em 3 períodos, pré-natal, peri-natal (deficiência do sétimo dia de gestação ao décimo dia de amamentação) e pós-natal (deficiência durante todo o período de amamentação), mostraram que a DT maternal diminui a densidade e o tamanho

nuclear das células do hipocampo fetal, sugerindo que o hipocampo é uma região vulnerável à DT. Os estudos histológicos do hipocampo foram realizados nos filhotes jovens (45 dias), o que indica que a tiamina é importante para o desenvolvimento cerebral e que suas conseqüências podem perdurar ao longo da vida.

Dados obtidos com técnica de cultura neuronal do cerebelo da prole de ratas gestantes deficientes de tiamina mostraram que a DT provoca a diminuição da condutância dos canais de potássio dependentes de voltagem, aumentando a frequência de despolarização, podendo resultar na morte neuronal (Oliveira et al., 2007).

Trabalhos realizados no LaNeC-UFMG mostraram que a DT maternal provoca, na prole, alterações neuroquímicas, cognitivas e motoras. Freitas-Silva et al. (2010) utilizando o modelo de restrição maternal de tiamina (10% de tiamina em relação a dieta padrão) durante a lactação mostraram que um déficit cognitivo espacial foi detectado na prole jovem, enquanto que na prole adulta, foram observadas alterações nas concentrações de GABA e glutamato nas regiões do hipocampo, córtex pré-frontal e tálamo. Ferreira-Vieira (2010) avaliou ratos de ~6 meses de idade provenientes de fêmeas restritas em tiamina durante o período perinatal e mostraram que a deficiência maternal de tiamina afeta significativamente o desempenho motor no tarefa de equilíbrio sobre uma barra giratória (*rotarod*), o padrão da marcha e concentrações de GABA e glutamato no tálamo e no cerebelo, respectivamente. Esses resultados indicam a importância desta vitamina para o desenvolvimento cerebral.

5. Gestação e estado emocional

Estresse, ansiedade, depressão durante e após a gravidez provocam conseqüências negativas para o filho e para a saúde mental da mãe. Dentre essas, estão as complicações na maturação fetal, ganho de peso inadequado, nascimento pré-maturo, além de distúrbios cognitivo e emocional dos filhos durante a infância (Marcus, 2009; Brummelte & Galea, 2010). Nas mães, o equilíbrio no estado emocional é de grande importância, pois o transtorno mental pode levar a uma falta de cuidado com sua própria saúde, sendo propícias ao uso de drogas e álcool, com alimentação precária e sem acompanhamento médico pré-natal (Fischer et al., 2007).

Através da análise de estudos sobre a ansiedade e depressão materna, Alder et al. (2007) mostraram que os níveis de sintomas depressivos estão associados com complicações obstétricas. McFarland et al. (2011) demonstraram que o transtorno depressivo maior durante a gravidez afeta o apego materno-fetal sugerindo que essa relação emocional entre mãe e filho tem início na gravidez.

Estima-se uma prevalência de depressão na gravidez de 7,4% no primeiro, 12,8% no segundo e 12% no terceiro trimestre (Bennett et al., 2004). A incidência de depressão maior após o parto é de 15-20% até 6 meses após o nascimento (Eros & Hajós, 2011). Sabe-se que esses transtornos acometem mulheres que tenham história de doença psiquiátrica prévia (Camacho et al., 2006) e com esses transtornos durante a gravidez, há um aumento da morbidade e mortalidade materna e das crianças (Ramakrishnan et al., 1999).

De acordo com Dayan et al. (2010), nível de educação, história psiquiátrica e estresse relacionado à saúde do feto são fatores de risco para a depressão pré-natal. O conhecimento desses fatores é importante para ajudar na redução dos transtornos de humor e ansiedade pós-natal e facilitar o tratamento dos sintomas (Buist et al., 2002) além de prevenir o desenvolvimento de depressão pré-natal nas futuras mães (Eros & Hajós, 2011).

Dados de estudos com modelos animais de depressão gestacional, analisados por Brummelte & Galea (2010), mostraram que o eixo HPA (eixo hipotálamo-pituitária-adrenal) é desregulado, alterando o sistema endócrino durante um evento estressor. De acordo com Camacho et al (2006), alterações de humor durante a gravidez pode ser resultado dessas alterações hormonais, onde os níveis de estrógeno e progesterona são superiores a de mulheres não gestantes. Além dessas alterações hormonais, Suda et al. (2008) verificaram uma diminuição de BDNF em fêmeas em período pós-parto (gravidez simulada por hormônios), sugerindo que essa diminuição poderia contribuir para o comportamento depressivo. Corroborando com os resultados anteriores, Lommatzch et al. (2006) também verificaram baixos níveis de BDNF em mulheres com depressão pós parto. Resultados de estudos em modelos comportamentais de depressão favorecem as hipóteses de que o estresse diminui a expressão de BDNF e de outros fatores de crescimento, o que possivelmente contribui para a depressão e, além disto, propõem que a regulação do BDNF desempenha um papel nas ações antidepressivas (Duman & Monteggia, 2006). Estudos em animais experimentais também sugerem que mudanças induzidas pelo BDNF no hipocampo pode desempenhar um papel na ansiedade. De acordo com Casarotto et al. (2012), a facilitação da sinalização de BDNF através da injeção de BDNF no hipocampo dorsal de ratos, parece aumentar a neurotransmissão serotoninérgica exercendo assim um efeito ansiogênico, o qual foi visto em tarefas de esquiva inibitória no Labirinto em T elevado (LTE).

Instrumentos para estudo do estado emocional, ansiedade e medo, em modelo experimental animal são necessários para investigação pré-clínica, com intuito de obter resultados que devem assemelhar com o estado emocional humano. Dentre os instrumentos mais utilizados estão os labirintos elevados (labirinto em cruz elevado e labirinto em T elevado - LTE), campo aberto (*open field*) e caixa de claro e escuro (Ramos, 2008). No LTE avalia-se o estado de ansiedade através de tarefas de esquivas inibitórias e o estado de medo por meio de tarefas de fuga (Graeff et al., 1993). De acordo com a abordagem de Blanchard & Blanchard (1988), Graeff (2007) descreve a ansiedade como o estado emocional que está relacionado ao comportamento de avaliação de risco que ocorre onde há um perigo incerto, também denominado como ameaça potencial, e descreve medo como estratégias defensivas que ocorrem em resposta a ameaça presente, perigo real.

6. BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

As neurotrofinas são formadas por proteínas diméricas importantes no desenvolvimento do SNC. Além do papel biológico de prevenção da morte celular programada (apoptose) de neurônios específicos, essas proteínas desempenham funções sobre a atividade sináptica, além de regular a conectividade neuronal no SNC, em períodos de desenvolvimento e na fase adulta (Lewin & Barde, 1996). Nos mamíferos, a família das neurotrofinas é composta por quatro proteínas: Fator de Crescimento Neuronal (NGF: *Nerve Growth Factor*), Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), Neurotrofina 3 (NT-3: *Neurotrophin 3*) e Neurotrofina 4 (NT-4: *Neurotrophin 4*), as quais possuem características bioquímicas semelhantes, porém são codificadas por genes distintos (Lewin & Barde, 1996, Szapacs et al., 2004).

O BDNF é uma proteína homodimérica de 27kDa que se liga a dois tipos de receptores, o p75, membro da família de fator de necrose tumoral (TNF: *Tumoral Necrose Factor*), e o receptor tirosina cinase B (TrkB), o qual está envolvido com a sobrevivência e diferenciação neuronal (Szapacsá et al., 2004; Fayard et al., 2005). É considerado a neurotrofina mais abundante no cérebro, sendo distribuída em todas as sub-regiões do hipocampo, no córtex cerebral (Conner et al., 1997; Bramham & Messaoudi, 2005) e hipotálamo (Coupé et al., 2009). É sintetizado, armazenado e liberado em neurônios glutamatérgicos (Lessmann et al., 2003).

Conforme mencionado, o BDNF está envolvido, desde o início da vida até a idade adulta, em aspectos do desenvolvimento do SNC (Bramham & Messaoudi, 2005; Klein et al., 2011) e do sistema cardiovascular (Chen et al., 2004). De acordo com Klein et al. (2011), o BDNF também é expresso no fígado (Cassiman et al., 2001) e no músculo esquelético (Matthews et al., 2009). No sangue é armazenado principalmente nas plaquetas, tendo sua maior fração no soro do que no plasma (Fujimura et al., 2002).

O BDNF é considerado o principal mediador da plasticidade neuronal, desempenhando importante papel no crescimento e sobrevivência neuronal desde o desenvolvimento do SNC até a vida adulta (Klein et al., 2011). Também é conhecido como um potente modulador da composição e da transmissão sináptica, contribuindo para as respostas neuronais rápidas ou adaptativas, como a potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD) (Huang & Reichardt, 2001; Bramham & Messaoudi, 2005), mecanismos eletrofisiológicos celulares, associados aos processos de aprendizagem e memória (Figurov et al., 1996). Está também envolvido em processos, como migração, proliferação e sobrevivência neuronal e

estimulação da liberação de neurotransmissores ou síntese de neuropeptídios (Tapia-Arancibia et al., 2004).

Pan et al. (1998) consideram o BDNF como um potencial agente terapêutico para doenças neurodegenerativas, desempenhando um papel neuroprotetor (Henningan et al., 2007). De acordo com Pan et al. (1998) e Elfving et al. (2010) uma série de evidências indicam o papel do BDNF no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como Doença de Alzheimer (Durany et al., 2000), Doença de Parkinson (Lindsay et al., 1993) e possivelmente de Esclerose Amiotrófica Lateral (Louvel et al., 1997) e em distúrbios psiquiátricos como esquizofrenia (Shoval & Weizman, 2005) e depressão maior (Brunoni et al., 2008; Laske et al., 2010).

O BDNF é produzido no cérebro e em tecidos periféricos (Elfving et al., 2010). Dados obtidos em estudos em modelos animais (Pan et al., 1998) evidenciaram que esse fator neurotrófico atravessa a barreira hemato-encefálica em ratos. Além disto, outros autores mostraram que níveis do BDNF no sangue e no plasma se correlacionavam com os níveis no hipocampo (Klein et al., 2011). De acordo com resultados desses e outros estudos, o BDNF está sendo considerado como um biomarcador para doenças neurodegenerativas e transtornos de humor (Elfving et al., 2010).

A diminuição dos níveis de BDNF no sangue de pacientes depressivos e em amostras de tecido do hipocampo obtido de modelos animais de depressão tem corroborado a hipótese de que o BDNF está associado com a fisiopatologia da depressão. Enquanto o BDNF diminui mediante ao estresse, o tratamento com drogas antidepressivas produz ações opostas, aumentando os níveis dessa neurotrofina (Laske et al., 2010; Duman & Monteggia 2006).

Shirayama et al. (2002) demonstraram que a infusão de BDNF em áreas centrais do cérebro de ratos, tem ação antidepressiva.

Sabendo da relação entre depressão e níveis de BDNF, Lommatzsch et al. (2006) sugeriram que a diminuição de BDNF durante a gestação pode ser um indicativo de sintomas depressivos nas grávidas. Essa associação pode ser prejudicial para as gestantes e, principalmente, para o feto, pois durante a gravidez o BDNF tem um papel essencial na implantação do blastocisto, no desenvolvimento da placenta e no crescimento fetal (Kawamura et al., 2009).

Além da depressão durante e após a gestação, a desnutrição também pode ser indício de efeitos sobre a produção de BDNF, como foi visto no trabalho de Coupé et al. (2009), os quais induziram desnutrição perinatal maternal em modelo experimental e mostraram que a desnutrição gestacional também tem efeito sobre a produção do BDNF, e sobre a proliferação celular em certas subáreas específicas do hipocampo e hipotálamo, durante o desenvolvimento da prole. Distúrbio no sistema do BDNF no início da vida tem conseqüências na vida adulta, tais como o aumento da atividade locomotora, hiperfagia, obesidade (Vickers et al., 2001) e redução de funções cognitivas (Gomez-Pinilla and Vaynman, 2005). Sugeriu-se também que a diminuição dos níveis plasmáticos do BDNF durante a gravidez pode ser um indicativo de desenvolvimento futuro de autismo na criança (Croen et al. 2008).

Resumindo, os antecedentes científicos descritos acima, indicam que (i) a hiperemese, a demanda nutricional e o baixo consumo de nutrientes durante a gestação podem interferir com os níveis de tiamina cerebrais; (ii) a desnutrição gestacional pode interferir com os níveis

cerebrais e plasmáticos de BDNF; (iii) a tiamina e o BDNF desempenham importantes papéis em processos neurobiológicos centrais, relacionados com aspectos comportamentais. A partir desses dados levantamos as seguintes questões: a gestação *per se* (sem hiperemese) interfere nos níveis de tiamina e BDNF, periféricos e cerebrais? As conseqüências desse efeito dependeriam da fase gestacional? A deficiência de tiamina durante a gestação interfere com os níveis de BDNF no hipocampo da gestante? Existe uma associação entre níveis periféricos ou cerebrais de tiamina e níveis plasmáticos ou cerebrais de BDNF em gestantes? Durante a gestação, os níveis plasmáticos de BDNF refletem alterações nos níveis deste fator no SNC? Quais as conseqüências da restrição de tiamina em aspectos comportamentais, emocionais e cognitivos, da gestante? Os níveis de BDNF estariam relacionados ao estado emocional e a capacidade cognitiva da gestante? Existem diferenças entre as alterações nesses parâmetros biológicos e comportamentais, quando avaliados em períodos diferentes da gestação?

Hipótese:

A restrição de tiamina e a gestação afetam parâmetros bioquímicos (níveis de tiamina e seus derivados fosforilados e níveis de BDNF) centrais e sistêmicos, sendo que essas alterações se relacionam com disfunções comportamentais (no aprendizado, memória e estado emocional).

Vários autores incluindo o nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNeC) da Universidade Federal de Minas Gerais, têm investigado os efeitos deletérios da deficiência de tiamina no sistema nervoso central de ratos *adultos*, com o intuito de elucidar os mecanismos neurobiológicos das alterações comportamentais associadas à essa deficiência. Existem evidências de que a deficiência dessa vitamina causa alterações neuroquímicas, emocionais, cognitivas e motoras. Porém, vários pontos continuam obscuros com relação aos mecanismos moleculares responsáveis por essas disfunções/lesões.

Dados obtidos em estudos prévios, realizados pelo nosso grupo, utilizando *modelo de restrição maternal* de tiamina mostraram que essa restrição pode causar na prole, alterações comportamentais além de disfunções neuroquímicas (Freitas-Silva et al., 2010; Ferreira-Vieira, 2010). Outros autores, também usando *modelo de deficiência maternal de tiamina* verificaram, na prole, alterações morfológicas no hipocampo (Bâ et al., 1999; Bâ et al., 2005). Entretanto, até o presente momento, encontramos apenas uma publicação de 1965 (Brown & Snodgrass, 1965), que apresenta alguns dados sobre os efeitos da deficiência dessa vitamina na própria gestante. Além disto, pouco se sabe sobre as características do modelo de deficiência maternal de tiamina.

Um aspecto importante a ser considerado é estado emocional durante o processo de gestação associado à restrição de tiamina. Estudos com modelos experimentais relatam que a depressão gestacional altera o sistema endócrino (Brummelte & Galea, 2010) e fatores neurotróficos (Suda et al, 2008). Sabendo que os fatores neurotróficos, como o BDNF, são importantes durante a gestação (Kawamura et al., 2009) e também em estados emocionais como o estresse, depressão e ansiedade (Casarotto et al., 2012), estudos que objetivam esclarecer o

envolvimento desses parâmetros, relacionados aos aspectos emocionais, nas alterações causadas pela deficiência de tiamina e/ou gestação são relevantes. Outro ponto a ser destacado com relação ao BDNF na gestação associada à deficiência da vitamina B1 é que o conhecimento de possíveis relações entre as concentrações centrais e periféricas do BDNF e/ou da tiamina podem representar um primeiro passo para a proposta destes fatores como candidatos a biomarcadores periféricos de eventos cerebrais.

Trabalhos que possibilitem ampliar os conhecimentos acerca das disfunções cerebrais causadas pela deficiência de tiamina adquirem relevância à medida que podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de disfunções biológicas e comportamentais fornecendo assim substratos para a elaboração de projetos na área de saúde pública que visam prevenir e evitar a deficiência de tiamina durante o período gestacional.

1. Geral

Estudar, em modelo experimental animal, os efeitos da restrição de tiamina e da gestação sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais e as correlações entre eles.

2. Específicos

2.1. Estabelecer as condições ótimas de acondicionamento, processamento e análise de amostras de sangue e tecido cerebral, para ensaios a serem realizados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*).

Avaliar, em fêmeas Wistar, os efeitos da gestação e da restrição de tiamina, durante três etapas, sobre:

2.2. variação de peso corporal, a quantidade de ração e água consumida, peso do encéfalo, peso e número dos fetos;

2.3. o aprendizado, memória e o estado emocional (ansiedade e medo);

2.4. os níveis de tiamina, em amostras de sangue, hipocampo e tálamo;

2.5. os níveis de BDNF, em amostras de plasma e hipocampo;

2.6. as correlações entre os níveis hipocâmpais ou talâmicos e periféricos de tiamina e BDNF e entre esses parâmetros bioquímicos (plasmáticos, talâmicos e hipocâmpais) e dados comportamentais.

1. Modelo Animal e Delineamento Experimental

1.1. Desenvolvimento do modelo experimental: obtenção e manuseio de ratas gestantes controles e restritas em tiamina

O ciclo estral das ratas é constituído de 4 fases (Diestro, Proestro, Estro e Metaestro) com 24 horas de duração, as quais se diferem de acordo com a taxa de estrógeno e a citologia vaginal. De acordo com Cooper et al. (1993), durante a fase diestro, a concentração sanguínea de estrógeno é baixa e as células da mucosa vaginal se apresentam pequenas e esparsas (Figura 1A). À medida que a concentração de estradiol aumenta, as células tomam aspecto de “cachos de uva” tornando-se maiores e mais arredondadas (Figura 1B). Esta fase é chamada de proestro e é onde ocorre a ovulação. Com a ovulação e a formação do corpo lúteo, o nível de estradiol diminui ocasionando a redução da proliferação do epitélio vaginal durante a fase estro (Figura 1C). Após o estro, ocorre uma fase de transição, o metaestro, onde a mucosa vaginal possui células cornificadas e leucócitos (Figura 1D).

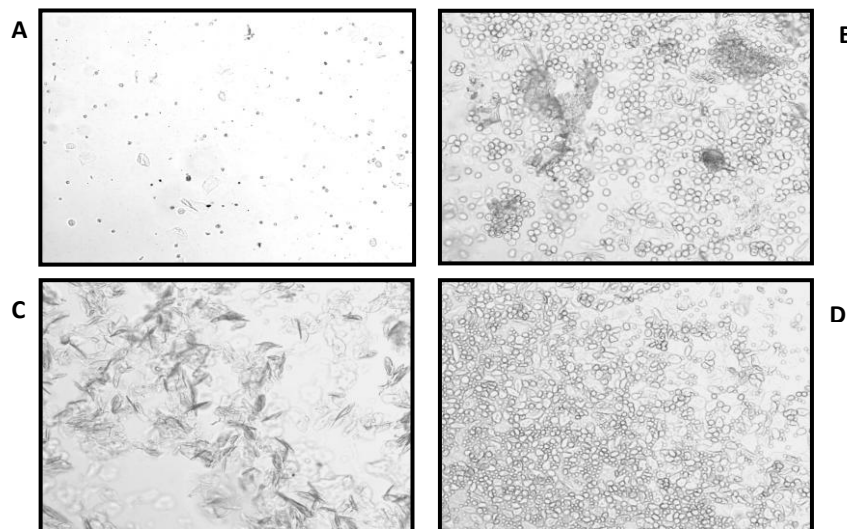


Figura 1: Fotomicrografia da citologia exfoliativa vaginal de ratas Wistar durante o ciclo estral. As fases constituintes do ciclo encontram-se representadas nos painéis: **A** (Diestro), **B** (Proestro), **C** (Estro) e **D** (Metaestro) - Figura retirada de Cooper et al. (1993).

O monitoramento diário do ciclo foi realizado por esfregaço vaginal com solução salina (cloreto de sódio 0,9%) e visualização das células em microscópio óptico. Esse acompanhamento ocorreu durante 15 dias. Após esse período, as fêmeas que se encontravam na fase proestro foram colocadas na presença do macho na proporção de duas fêmeas para um macho. No dia seguinte, a ocorrência de acasalamento foi avaliada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e por outras características, como sangramento ou substância escura na vagina das ratas. Após a confirmação do acasalamento, essas fêmeas foram classificadas como gestantes (Dia 1 = 1º dia de gestação) e agrupadas em um número de 3 ratas gestantes por gaiola. Esse agrupamento foi feito de acordo com o período gestacional das ratas. O período completo de gestação é de 21 dias e no presente estudo as ratas foram avaliadas em 3 etapas da gestação, aqui denominadas Período 1, 2 e 3, correspondentes à 1ª, 2ª e 3ª semana de gestação. Ratas não gestantes também foram agrupadas e pareadas no mesmo período que as ratas gestantes. Dentre esses grupos, gestantes e não gestantes, as ratas foram subdividas em grupos que receberam dietas com ração padrão ou dieta restrita em tiamina durante todos os períodos correspondentes à gestação (Período 1: 1ª semana; Período 2: 1ª e 2ª semanas e Período 3: 1ª, 2ª e 3ª semanas). A ração restrita continha 10% de tiamina em relação à quantidade de vitamina existente na ração padrão (Freitas-Silva et al., 2010), e os dois tipos de ração, padrão e restrita, foram produzidas no laboratório (Tabelas 1, 2, 3). A única diferença entre as duas rações foi a concentração de tiamina.

Composição das rações produzidas no laboratório

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

Tabela 1: Lista dos nutrientes (g/kg de ração) constituintes das rações produzidas no laboratório. *A caseína foi autoclavada, secada e triturada antes do uso para garantir a ausência de vitamina B1 na mesma. a Ver tabela 2, b Ver tabela 3

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

Tabela 2: Composição da mistura de sais

Vitaminas	% por mistura de vitaminas
Acetato de Retinol	0,40
Colecalciferol	0,06
Menadiona	0,05
i-Inositol	1,00
Niacina	0,40
Pantotenato de Cálcio	0,40
Riboflavina	0,08
Tiamina-HCl*	0,05
Piridoxina-HCl	0,05
Ácido fólico	0,02
Biotina	0,004
Vitamina B12	0,0003
Sacarose	97,49

Tabela 3: *Composição da mistura de vitaminas.*

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

1.2. Delineamento Experimental

Foram executados um experimento e uma réplica, utilizando 72 ratas fêmeas Wistar (n=36 cada) provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos no biotério em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Os cuidados e o uso dos animais foram de acordo com o *National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1985). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA 107/10 – Cópia do Certificado na sessão Anexos, página 117).

As fêmeas foram separadas aleatoriamente e o ciclo estral de todas as ratas foi monitorado de acordo com o método descrito por Cooper et al. (1993), conforme detalhado acima. Considerando dados obtidos em experimentos prévios, realizados em nosso laboratório, de

que apenas uma proporção (~50%) das fêmeas se engravida, cada experimento/réplica foi iniciado com aproximadamente 54 fêmeas. O ciclo estral dessas fêmeas foi monitorado e dessas, 36 ratas foram acasaladas com o objetivo de se obter 18 ratas grávidas. Portanto, após o acasalamento de 36 fêmeas (em cada experimento), a presença de espermatozóides em 18 ratas foi confirmada e aquelas que não tiveram o acasalamento confirmado foram retiradas do experimento. Outras 36 fêmeas (n=18 para cada experimento) que não tiveram contato com o macho constituíram o grupo de ratas não gestantes. Assim tivemos uma amostra total de 72 ratas (experimento + réplica).

Os animais (n=72) foram divididos em dois grupos, de acordo com os seguintes tratamentos: (i) animais tratados com ração padrão: **Gestantes Padrão (GP, n=18)** e **Não-Gestantes Padrão (NGP, n=18)**; (ii) animais tratados com ração restrita em tiamina (10%): **Gestantes Restritas de tiamina (GR, n=18)** e **Não-Gestantes Restritas de tiamina (NGR, n=18)**. As gestantes do grupo restrito (GR) foram submetidas à dieta a partir do 1º dia de gestação até o final da gestação (~ 21 dias), ou seja, durante o período pré-natal. As não-gestantes do grupo restrito (NGR) também receberam ração restrita em tiamina em período correspondente ao período de gestação das ratas do grupo GR. Com exceção dos episódios de restrição de tiamina durante a gestação (GR) ou período correspondente à gestação (NGR), todos os animais (GP e NGP) receberam ração padrão nas demais etapas experimentais. O peso corporal dos animais foi registrado em dias alternados e o consumo de água e ração foi medido diariamente, ao longo de todo o experimento.

Os animais de cada grupo (NGP, NGR, GP e GR) foram avaliados em três períodos distintos de acordo com o tempo de gestação das fêmeas:

a) Período 1: corresponde a 1ª semana de experimento (n = 72).

- b) Período 2: corresponde as 1^a e 2^a semanas (n = 48).
- c) Período 3: correspondente as 1^a, 2^a e 3^a semanas de experimento (n = 24).

No penúltimo dia de cada período 1/3 das ratas (n = 24, ou seja, n = 6 para cada grupo) foram submetidas aos testes comportamentais conforme detalhado abaixo. No último dia de cada período esses animais que passaram pelos testes comportamentais um dia antes, foram sacrificados por decapitação. A cada período, amostras biológicas – sangue, hipocampo e tálamo, foram coletadas para procedimentos e ensaios bioquímicos. Após cada sacrifício, o peso do encéfalo de cada animal foi registrado. Para confirmar a gestação, a presença de fetos foi verificada. A quantidade de fetos e o peso de cada um dos fetos foram registrados para cada gestante (grupos GP e GR).

A Figura 2 apresenta um esquema do delineamento experimental descrito acima.

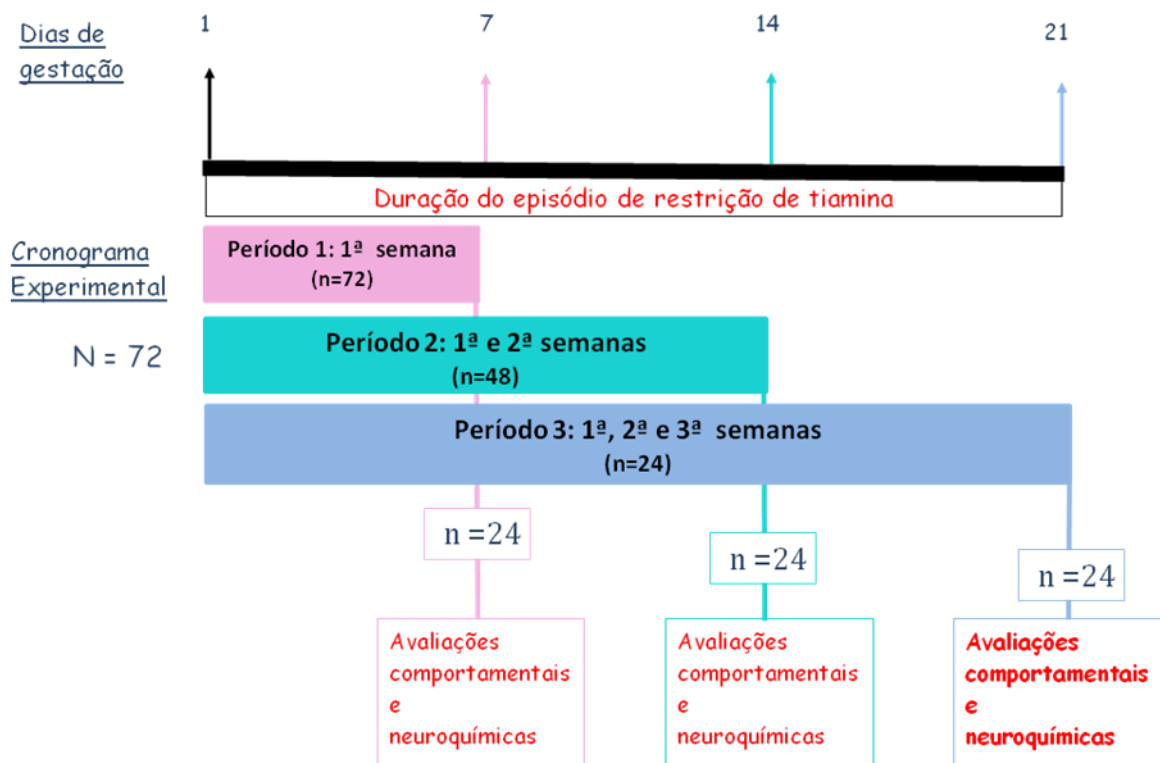


Figura 2: Esquema do *delineamento experimental* adotado no presente estudo. A barra preta mostra a escala temporal em dias de gestação.

De acordo com o delineamento acima (Figura 2), o experimento iniciou com n=72 ratas, as quais foram tratadas por uma semana (Período 1= 1ª semana). Dessas 72 ratas, 24 foram submetidas ao teste comportamental nos dias 1, 2 e 5 e, posteriormente, sacrificadas por decapitação para o estudo bioquímico no 6º dia. As 48 ratas remanescentes continuaram o tratamento por mais uma semana (Período 2 = 1ª e 2ª semanas) e dessas, 24 ratas foram submetidas ao teste comportamental nos dias 8, 9 e 12 e, a seguir, submetidas à decapitação para o estudo bioquímico no 13º dia. As últimas 24 ratas remanescentes continuaram o tratamento por mais uma semana (Período 3 = 1ª, 2ª e 3ª semanas), sendo submetidas ao teste comportamental nos dias 15, 16 e 19 e sacrificadas no 20º dia.

1.2.1. Expressão dos resultados referentes ao de peso corporal

a) Varição de peso corporal (g): dados do peso corporal foram registrados em dias alternados, durante cada período de experimento. No *Período 1* (1ª semana), os dados foram registrados (n=72 ratas) em 3 dias (Dias: 1, 3 e 5). Durante o *Período 2* (1ª e 2ª semanas), os dados foram registrados (n=48) em 7 dias (Dias: 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13), enquanto no *Período 3* (1ª, 2ª e 3ª semanas), os animais (n = 24) foram pesados em 10 dias alternados (Dias: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19).

b) Varição de peso corporal por período: a diferença (Δ) entre os pesos registrados no antepenúltimo ou penúltimo dia e primeiro dia, para cada um dos períodos:

Δ período 1: peso 5º - peso 1º dias (n=72);

Δ período 2: peso 13º - peso 1º dias (n=48);

Δ período 3: peso 19º - 1º dias (n=24).

c) Varição de peso semanal (g): a diferença dos pesos registrados em cada semana em intervalos de 5 dias/por semana:

1ª Semana: Δ peso = 5º - 1º dias;

2ª Semana: Δ peso = 11º - 7º dias;

3ª Semana: Δ peso = 19º - 15º dias.

1.2.2. Expressão dos dados referentes ao consumo de ração (g) e água (ml)

a) Registros do consumo de ração e água ao longo do experimento: dados obtidos diariamente em cada período de experimento, sendo 5 registros (n=72 ratos) entre os dias 1 e 5 (Período 1: 1ª semana), 12 registros (n=48 ratos) entre os dias 1 e 12 (Período 2: 1ª e 2ª semanas) e 19 registros (n=24 ratos) entre os dias 1 e 19 (Período 3: 1ª, 2ª e 3ª semanas). Devido ao agrupamento das ratas em gaiolas (n=3 cada), a ração/água restante

de cada gaiola foi registrada diariamente e a média do consumo foi calculada para cada animal.

- b) Consumo de ração e água por semana: média dos dados de consumo de ração e água em cada semana:

1ª Semana: consumo entre o 1º e 6º dias

2ª Semana: consumo entre o 7º e 12º dias

3ª Semana: consumo entre o 14º e 19º dias

1.2.3. Expressão dos dados referentes aos pesos encefálicos

Registro dos pesos encefálicos por período: média \pm erro padrão dos pesos encefálicos, para cada grupo, em cada período (Períodos 1, 2 e 3, n=24 cada).

1.2.4. Expressão dos dados referentes às avaliações dos fetos:

- a) Registro do número de fetos: média \pm erro padrão do número de fetos provenientes de gestantes (GP e GR) em cada período (Períodos 1, 2 e 3).
- b) Registro dos pesos dos fetos: média \pm erro padrão dos pesos dos fetos provenientes das gestantes de cada grupo (GP e GR) nos Períodos 2 e 3. Os fetos provenientes das ratas sacrificadas com uma semana de gravidez (Período 1) eram muito pequenos o que inviabilizou, em termos práticos, a separação e a pesagem dos mesmos. No caso dos fetos do Período 2 foi possível a pesagem de todos juntos provenientes de cada uma das gestantes (padrão ou restrita). O peso de cada feto foi obtido dividindo-se o peso médio pelo número de fetos/gestante.

2. Estudo Comportamental

A avaliação do estado emocional dos animais, ansiedade e medo, foi realizada utilizando-se o modelo comportamental do Labirinto em T-Elevado (LTE), medindo-se as respostas de esquivas inibitória e fuga, respectivamente. Esse modelo foi desenvolvido e validado por Graeff et al. (1993), Zangrossi e Graeff (1997) e Zangrossi et al. (2001).

2.1. Equipamento - Labirinto em T-Elevado (LTE)

O aparelho (Figura 3) foi construído de acordo com as especificações mencionadas por Zangrossi e Graeff (1997). O aparato de madeira consiste de três braços de iguais dimensões (50 x 12 cm). O braço que constitui o tronco do T é fechado por paredes de 40 cm de altura e está perpendicular aos dois braços que são abertos. Esses possuem uma parede de acrílico de 1 cm de altura para evitar que o animal caia. O labirinto se encontra elevado a 50 cm do chão. No teto, na direção acima do equipamento, encontra-se uma câmera (marca HDL, modelo HM21/2004) que capta as imagens que são gravadas e posteriormente analisadas. Os resultados são expressos em latência (s), que é o tempo que o animal permanece no braço fechado no teste de esquivas inibitória ou no braço aberto no teste de fuga.

2.1.1. Esquiva Inibitória e Fuga

Para avaliar o desempenho cognitivo e o estado emocional, ansiedade, em tarefas de Esquiva Inibitória, e medo, em tarefas de Fuga, todos os animais (Grupos: GP, GR, NGP e NGR) foram submetidos a testes comportamentais no LTE. As avaliações foram executadas de acordo com Zangrossi e Graeff (1997), Zangrossi et al. (2001) e de Paula Soares et al. (2011), conforme descrito abaixo.

2.1.2. Procedimentos

No primeiro dia do experimento os animais, mantidos em uma caixa de acrílico colocada na sala de testes, foram manuseados por 5 minutos pelo experimentador. No segundo dia, denominado de *pré-exposição*, o animal foi colocado e deixado na extremidade do braço aberto por 30 min. Durante essa *pré-exposição* o LTE foi modificado através da colocação de placas de madeira na interseção entre os braços abertos e a plataforma central (linha imaginária em vermelho na figura 3). No terceiro dia, foi aplicado o *treino (aprendizado)* constituído por tentativas (Linha de base, Esquiva 1 e Esquiva 2), onde o animal foi colocado por três vezes consecutivas, com intervalos inter-tentativas de 30s, no braço fechado (tarefas de Esquiva Inibitória). Antes da primeira tentativa, o animal é colocado, por 60 s, numa caixa de acrílico individual, que se encontra dentro da sala onde o treino é executado. A cada tentativa é registrado o tempo (latência em segundos) que o animal leva para ultrapassar com as quatro patas a linha demarcatória (interseção entre o braço fechado e os braços abertos, indicada em verde na figura 3). Após essa ultrapassagem ou após 300 s, o que acontecer primeiro, o animal é retirado do equipamento e recolocado na caixa de acrílico por 30s. Após a 3ª tentativa (Esquiva 2) do treino nessa tarefa de esquiva inibitória, os animais foram submetidos ao *treino (aprendizado)* em tarefas de Fuga. Esse treino também consiste de 3 tentativas (Fuga 1, 2 e 3) com intervalos inter-tentativas de 30s, onde o animal é colocado por três vezes consecutivas no braço aberto. A cada tentativa é registrado o tempo (latência em segundos) que o animal leva para fugir do estímulo aversivo (braço aberto) ultrapassando com as quatro patas a linha demarcatória (interseção entre o braço fechado e os braços abertos, indicada em vermelho na figura 3). Após essa ultrapassagem ou após 300 s, o que ocorrer primeiro, o animal é retirado do equipamento e recolocado na caixa de acrílico por 30s. Conforme mencionado, o tempo máximo estabelecido para cada tentativa nos *treinos (aprendizado)* nas tarefas de esquiva inibitória e fuga foi de 300s. Após 72 horas dos treinos,

no sexto dia, os animais foram submetidos aos *testes de memória*, os quais consistem de uma tentativa na Esquiva Inibitória (Esquiva 3) e uma tentativa na Fuga (Fuga 4). Esses testes seguem o mesmo protocolo que os treinos, porém consistindo apenas de uma tentativa em cada um dos testes.

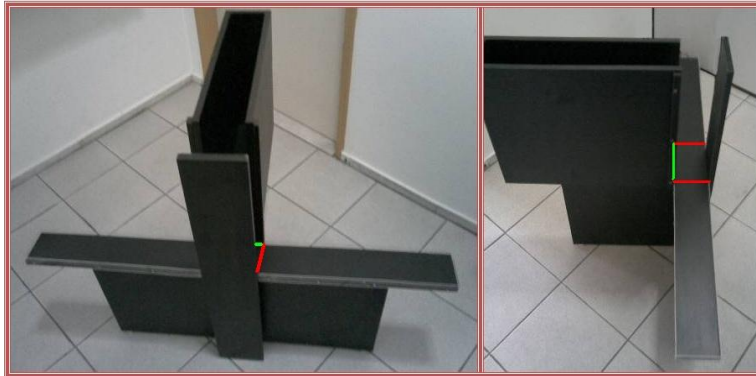


Figura 3: Foto do *Labirinto em T Elevado* utilizado no presente estudo - Marca vermelha: Limite do braço aberto; Marca Verde: Limite do braço fechado.

3. Estudos Bioquímicos

3.1. Obtenção das amostras biológicas

No dia seguinte ao teste comportamental os animais de cada grupo foram mortos por decapitação. Amostras de sangue, aproximadamente 2 ml/rato, foram coletadas através da incisão da decapitação, colocadas em frascos contendo 6% de EDTA. Metade do volume foi usada para obtenção de plasma (centrifugação: 10.000 x g por 20 minutos à 4° C), que foi mantido a -80°C por ~ 6 meses e a outra metade das amostras de sangue foi mantida até o dia do ensaio, por no máximo de 2 dias, no freezer a -20°C. Os encéfalos foram rapidamente retirados das cavidades cranianas, pesados e dissecados, de acordo com as coordenadas apresentadas por Paxinos & Watson (2004). Os encéfalos foram posicionados ventralmente sobre uma superfície com indicações de escala milimetrada, tomando-se como ponto zero a parte mais distal da região anterior. Um corte sagital foi realizado para a separação dos dois

hemisférios. O tálamo foi retirado da superfície medial da região diencefálica dos dois hemisférios e após a remoção do mesencéfalo, o hipocampo exposto foi cuidadosamente dissecado da região cortical. As amostras de sangue, os tálamos e, de forma aleatória, o hipocampo de um dos hemisférios cerebrais foram destinados para determinações de tiamina e seus derivados através do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC). Essas amostras de tálamo e hipocampo foram mantidas a -80°C, por no máximo 15 dias, até o momento dos ensaios. As amostras de plasma e o hipocampo do outro hemisfério foram reservados para dosagens do fator neurotrófico, *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) por *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA), as quais foram mantidas a -80°C, por ~ 6 meses. Esses métodos estão descritos abaixo.

3.2. Determinações dos níveis de tiamina e suas formas fosforiladas

3.2.1. Avaliação das condições de ensaio cromatográfico

Como mencionado, a determinação das concentrações de tiamina (vitamina B1) e seus derivados fosforilados (TMP e TDP) nas amostras biológicas (centrais: tálamo e hipocampo; e periféricas: sangue) foi realizada por HPLC.

3.2.1.1. Equipamento cromatográfico e princípios de funcionamento

O HPLC, ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, é constituído de um reservatório para o tampão de separação (fase móvel), bomba, válvula de injeção, pré-coluna, coluna (fase estacionária), detector de fluorescência e integrador (Figura 4). Para o seu funcionamento, a bomba impulsiona o tampão de separação até a coluna. A amostra injetada é arrastada por essa fase móvel até a coluna, onde ocorre a separação dos componentes da mistura, de acordo

com o grau de polaridade. Os compostos separados são detectados por um detector fluorimétrico (no caso desse experimento) por meio de comprimentos de ondas, de excitação e de emissão. A fluorescência obtida em cada material separado é registrada em um integrador, como picos, que constituem o perfil cromatográfico daquela separação. Para obtenção e confirmação das substâncias separadas e suas concentrações, foram realizadas curvas padrões, em que obtemos a concentração de acordo com a área do pico obtida durante a análise (resultados em nmol/g de tecido ou nmol/L de sangue).

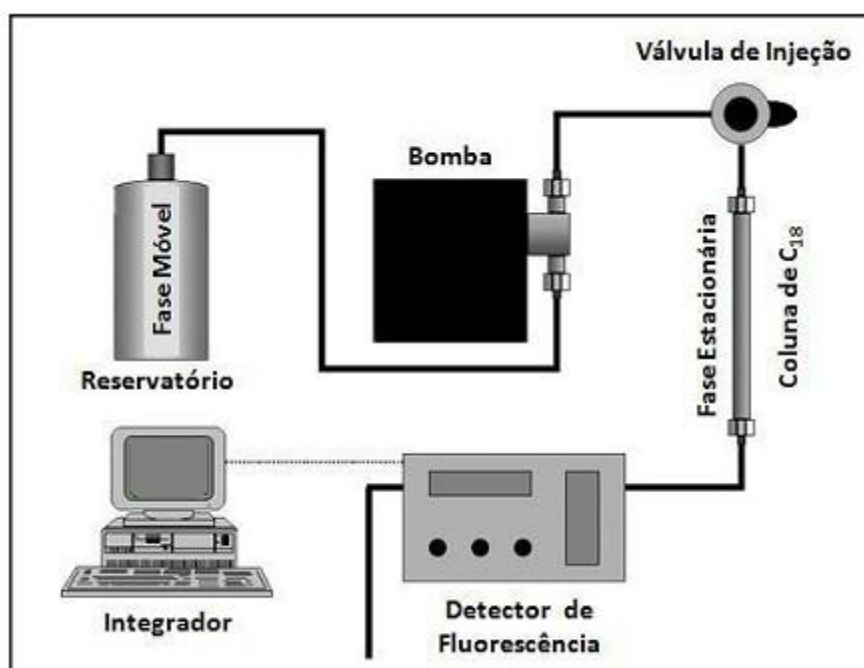


Figura 4: Representação esquemática dos componentes de um aparelho de *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)* – Figura retirada do site: <http://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>, acesso em 20-01-12.

3.2.1.2. Condições Cromatográficas

O sistema cromatográfico utilizado foi um cromatógrafo *Shimadzu* (LC-10AD, *Tokyo*, *Japão*) com válvula injetora de 200 μ L (*Rheodyne* 7725-I, *California*, *USA*) e detector fluorescente (FLD - *Shimadzu spectrofluorometric detector* RF-551, *Tokyo*, *Japan*) acoplado a uma bomba modelo LC-10. Os comprimentos de onda, de excitação e emissão, utilizados foram de 367 e

435 nm, respectivamente. Uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (250 mm × 4,6 mm, ID, *Purospher® Star RP-18 endcapped*) e uma pré-coluna (RT 250-4 E. *Merck, Darmstadt* E.R., Germany) foram utilizadas nas análises. O integrador (*Shimadzu C-R7Ae plus*) acoplado ao sistema cromatográfico forneceu a área dos picos dos cromatogramas, a partir da intensidade de fluorescência obtida nas análises.

No presente estudo, a fase móvel isocrática utilizada consistiu de uma solução fosfato 0.10M e metanol (70:30, v/v), com pH ajustado a 7,0. A fase móvel foi filtrada em filtro membrana Durapore 0,45µm (Millipore) através da bomba e vácuo. A análise cromatográfica ocorreu a 25±2° C. Os componentes foram eluídos isocraticamente a 15 min de corrida em um fluxo de 1ml/min. A Figura 5 mostra o perfil cromatográfico da separação da tiamina (8.4') e seus derivados mono (3.8') e difosfatos (3.2'), de amostras de sangue de ratos Wistar.

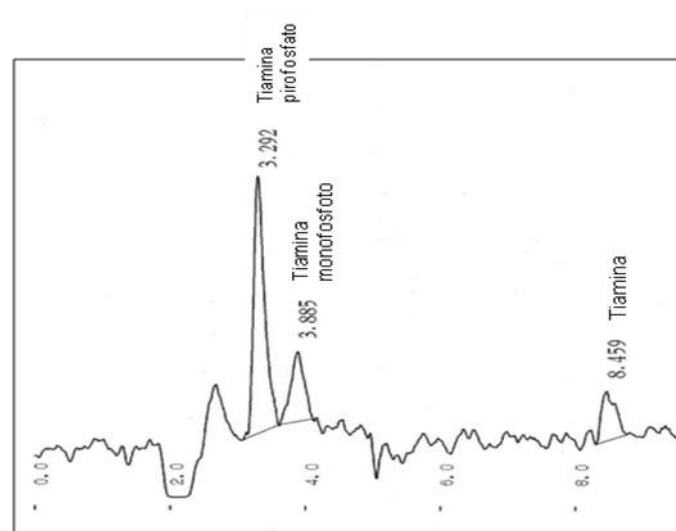


Figura 5: *Cromatograma representativo da análise das concentrações de tiamina e suas formas fosforiladas presentes no sangue de ratos Wistar.*

Considerando que o método cromatográfico utilizado no presente estudo, desenvolvido por Lu & Frank (2008), foi implantado no Laboratório de Neurociências (LaNeC-UFMG) com modificações (como descrito abaixo), “*Curvas Padrões*” para tiamina e seus derivados foram

realizadas nas condições do LaNeC (p.ex. aparelho, reagentes). Além disto, ensaios de “reprodutibilidade”, “estabilidade” e “recuperação” foram também executados, conforme detalhado abaixo. Esses ensaios foram realizados de forma independente com relação aos experimentos executados nesse trabalho. Para esses ensaios foram utilizadas amostras de hipocampo obtidas de ratos Wistar machos.

3.2.1.3. Curvas de calibração

Obtenção das curvas de calibração a partir das concentrações de soluções padrão:

B1: 10, 50, 80, 100, 150 ng/ml,

TMP: 10, 50, 100, 175, 250 ng/ml,

TDP: 100, 325, 550, 775, 1000 ng/ml.

3.2.1.4. Variabilidade experimental

Para avaliar a variabilidade experimental, reprodutibilidade intra-dia foi calculada a partir de 10 injeções consecutivas de amostras hipocampais no mesmo dia, e reprodutibilidade inter-dias foi obtida pela comparação entre as médias destas réplicas ao longo de dois dias consecutivos.

3.2.1.5. Estabilidade do derivatizado com ferricianeto de potássio

Para a formação de um composto fluorescente e detectável pelo HPLC, foi utilizada uma solução derivatizante constituída por ferricianeto de potássio. A avaliação da estabilidade dos compostos derivatizados à temperatura ambiente foi verificada após 1, 30, 60, 120 e 240 minutos de derivatização com ferricianeto de potássio. Portanto, esses tempos representam o intervalo entre o procedimento de derivatização e aplicação da amostra no HPLC.

3.2.1.6. Recuperação da tiamina e seus derivados

Para avaliar a recuperação da B1, TMP e TDP, uma mistura destes aminoácidos, a partir de soluções padrão, foi adicionada a uma amostra do hipocampo no momento da homogeneização, nas concentrações finais:

B1: 20, 40, 60, 80 e 100 ng / mL,

TMP: 25, 75, 125, 175 e 250 de ng / ml,

TDP: 100, 250, 400, 550 e 700 ng / ml.

3.2.2. Processamento das amostras de tálamo, hipocampo e sangue obtidas das ratas dos quatro grupos experimentais

Amostras de tálamo e hipocampo foram retiradas do freezer -80° C e homogeneizadas com TCA 10%, em 15 vezes o volume correspondente de cada estrutura. Enquanto que para cada 500µl de sangue, foi utilizado o mesmo volume de TCA 10% (1:2). As suspensões foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e mantidas no gelo por 15 minutos. Após o tempo de repouso, as amostras foram novamente homogeneizadas em vortex, por 1 minuto, e centrifugadas (Sorvall RC-5B) a 4° C, durante 15 minutos, em uma força centrífuga relativa de 10.000 x g. O sobrenadante obtido de cada amostra foi coletado e filtrado (Millipore 0,45µm, 13mm). Para a retirada do TCA do tecido, para cada 100µl de amostra foi adicionado 500µl de éter saturado com água milli-Q (5:1 vol/vol) e essa solução foi homogeneizada. A separação da amostra do éter foi realizada, e para cada 100µl de amostra acrescentamos 31µl de metanol. A amostra preparada foi mantida no gelo até a etapa de derivatização.

3.2.2.1. Procedimento de Derivatização

Para a formação de compostos fluorescentes de tiamina e seus derivados fosforilados, que pudessem ser detectáveis pelo HPLC, foi utilizada uma solução derivatizante constituída por

ferricianeto de potássio 30,37mM em hidróxido de sódio 3,75 M. Essa foi preparada diariamente e acrescentada à amostra na proporção (1:2 v/v). Após 1 minuto de reação, a solução foi injetada no sistema cromatográfico. Figura 6 representa a reação de derivatização utilizada no método.

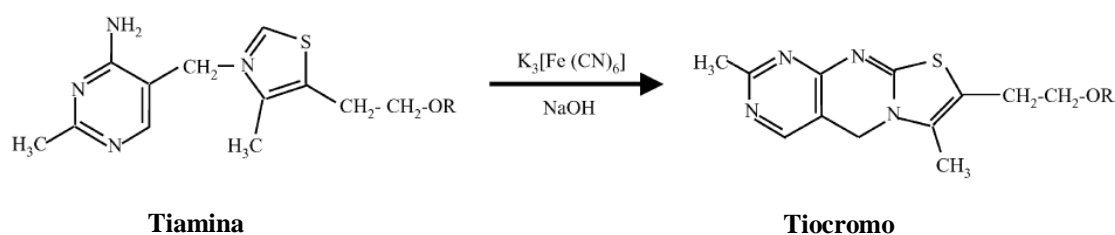


Figura 6: Representação esquemática da *reação de derivatização de tiamina com ferricianeto de potássio em condições alcalinas gerando tiocromo (composto fluorescente)* (Lu & Frank, 2008).

3.2.2.2. Expressão dos dados referentes à dosagem de tiamina e suas formas fosforiladas

Concentrações de B1, TMP e TDP: foram obtidas as médias das concentrações de tiamina e derivados nas amostras de sangue, hipocampo e tálamo, expressas como nmol/L de sangue ou nmol/g de tecido.

3.3. Determinação dos níveis de BDNF

As concentrações de *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) em amostras de plasma e hipocampo dos animais dos quatro grupos foram determinadas por técnica de imunensaio, *Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA sanduíche (ELISA: *ChemiKine BDNF Sandwich ELISA Kit CYT306; Chemicon International, Temecula, CA*), de acordo com Greisen et al. (2005) e Cahir et al. (2008).

3.3.1. Processamento das amostras

Plasma: diluídos 1:2 em tampão diluente da amostra, conforme *kit CYT306 - Chemicon International*.

Hipocampo: homogêneos com tampão de lise, 10ml/g tecido (20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, NP40 1%, Glicerol 10%, 1mM PMSF, 10mM EDTA, 10µM E-64, 0,5mM Vanadato de Sódio). As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos à 4° C. Sobrenadantes foram coletados e diluídos com tampão diluente de amostra (1:2 v/v).

Padrão de BDNF liofilizado (presente no kit) foi reconstituído e diluições seriadas foram realizadas para a obtenção da curva padrão (0-500 pg/ml). Análises das amostras e padrões foram realizadas em duplicatas e as etapas da técnica (figura 7) foram seguidas de acordo com o protocolo que acompanha o *Kit CYT306 - Chemicon International*. A concentração de BDNF, em pg/mg tecido, foi determinada a partir da densidade óptica (OD) em 450nm.

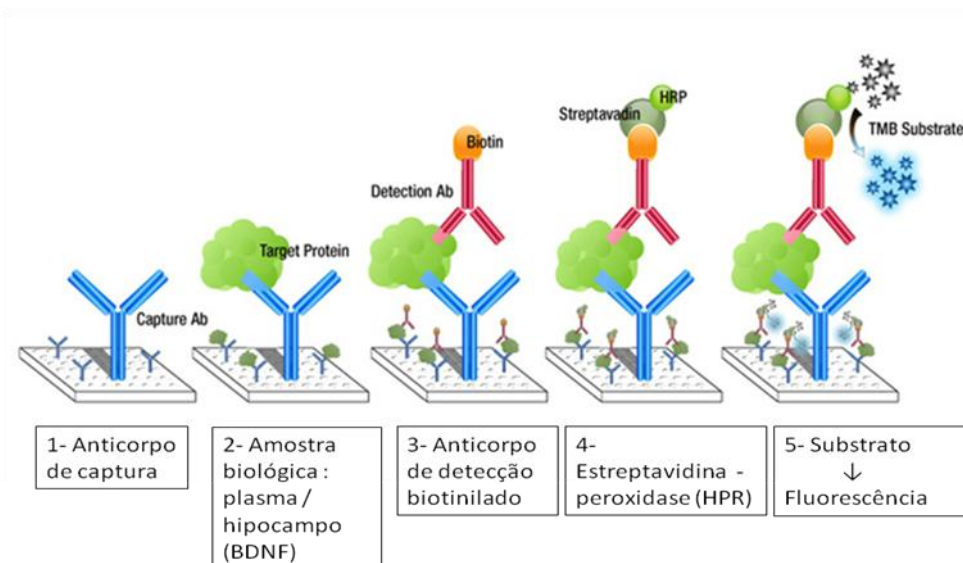


Figura 7: Representação esquemática das etapas do teste de imunoenensaio ELISA - Figura retirada no endereço http://www.epitomics.com/products/product_info/6111-1 (acesso em 23/01/2012).

Expressão dos dados referentes à dosagem de BDNF: pg/mg de tecido hipocampal ou pg /ml de plasma.

4. Análises Estatísticas

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

Os dados dos *pesos encefálicos* dos animais (n=72) foram analisados utilizando ANOVA 2 x 2 x 3, avaliando os seguintes fatores: restrição de tiamina (dois níveis: dieta padrão e restrita), gravidez (fêmeas grávidas e não-grávidas) e período de gravidez (três níveis: Período 1, Período 2 e Período 3).

Os dados dos números e dos pesos dos filhotes das gestantes (restritas e não restritas) foram analisados pelo teste *t-student*.

Os dados dos *pesos corporais* (dados expressos na forma de logaritmo) foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) fatorial 2 x 2 x r, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: restrição de tiamina (dois níveis: dieta padrão e restrita), gravidez (fêmeas grávidas e não-grávidas) e peso ao longo dos períodos de gravidez, sendo os números de registros de peso iguais a 3 (Período 1), 7 (Período 2) e 10 (Período 3). Para análise da *variação de peso corporal por período*, considerando-se a diferença entre o peso no final e no início de cada período, utilizou-se o teste ANOVA fatorial 2 x 2, com os seguintes fatores: restrição de tiamina (dois níveis), gestação (dois níveis). Com objetivo de verificar o efeito do tempo (semanas), foram realizadas análises considerando os dados referentes aos animais

que passaram pelo tratamento durante o Período 2 e Período 3. Assim, foi realizada ANOVA fatorial 2 x 2 x r, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores para o Período 2 (n=48 ratos): restrição de tiamina (dois níveis), gestação (dois níveis) e semanas (1^a e 2^a semanas) e para o Período 3 (n=24 ratos): restrição de tiamina (dois níveis), gestação (dois níveis) e semanas (1^a, 2^a e 3^a semanas).

Os *consumos de ração e água* (dados do consumo de água expressos na forma de logaritmo), durante os três períodos foram analisados por ANOVA fatorial 2 x 2 x r, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: restrição de tiamina (dois níveis), gestação (dois níveis), tempo (dias de registro do consumo ao longo do experimento) variando entre 5 (Período 1: 1^a semana), 12 (Período 2: 1^a e 2^a semanas) e 19 (Período 3: 1^a, 2^a e 3^a semanas). Os resultados obtidos no Período 3 foram seguidos pelo teste *Post Hoc* Bonferroni. Os *consumos de ração e água por semana* foram analisados por ANOVA 2 x 2 x 2 com medida repetida no último elemento (gestação, restrição e semanas= 1^a e 2^a semanas) para os dados do *Período 2* e ANOVA 2 x 2 x 3 com medida repetida no último elemento (gestação, restrição e semanas= 1^a, 2^a e 3^a semanas) para os dados do *Período 3*.

Os dados obtidos no LTE durante o *treino (aprendizado) e teste (memória)*, nas tarefas de Esquiva Inibitória e Fuga foram analisados utilizando o Modelo de Cox para Análise de Sobrevida. Este modelo se aplica para o caso de uma distribuição não paramétrica, com o uso de um critério de censura, referente ao tempo limite de 300 segundos de permanência do animal nos braços fechado/aberto – no modelo de Cox denominado “tempo de sobrevivência”. Essas análises foram executadas utilizando o *software* ‘R’ versão 2.13.0.

Na análise de sobrevivência, a variável resposta é aquela mensurada até ocorrência de um evento de interesse, e é denominada tempo de falha, que nos testes de esquiva e fuga (LTE) significa o tempo que o animal permanece nos braços fechado/aberto sem ultrapassar, com as 4 patas, as linhas demarcatórias. No caso específico do teste no LTE a denominação tempo de falha para a esquiva pode parecer não apropriado. No entanto, com o objetivo de usar a mesma denominação dessa variável para os dois testes, esquiva e fuga, mantivemos o mesmo termo para os dois. A variável aleatória não negativa T , que representa o tempo de falha, é usualmente especificada em análise de sobrevivência pela sua função de sobrevivência ou pela taxa de falha ou risco. A função de sobrevivência $S(t)$ é uma das principais funções probabilísticas usadas para descrever estudos de sobrevivência, e pode ser definida como a probabilidade de uma observação não falhar até determinado tempo t , ou seja: $S(t) = P(T \geq t)$ (Colosimo & Giolo, 2006). A principal característica em estudos de sobrevivência é a presença de censura, que é a observação parcial da resposta. Por exemplo, como mencionado acima, o tempo máximo de observação no aparato LTE foi 300 segundos o que caracteriza uma censura.

A Análise de Sobrevivência no Modelo de Cox foi utilizada para verificar os efeitos dos tratamentos (grupos: NGP, NGR, GP e GR), períodos (1, 2 e 3) e tentativas (1 a 4: linha de base, esquiva 1, 2 e 3 ou Fugas 1, 2, 3 e 4) nos testes de esquiva inibitória/fuga. Para cada análise de sobrevivência, análises de variâncias foram utilizadas com o intuito de verificar as interações entre os fatores: tratamentos*períodos*tentativas; tratamentos*períodos; tratamentos*tentativas; tentativas*períodos. Foram utilizados os seguintes *scripts* para o Modelo de Cox para esquiva/fuga:

- *out 1: coxph (Surv(latência, status1) ~ factor (tratamentos)*factor (periodos)*factor (tentativas) + cluster (ratos), method=c("breslow"), data=dados). = verifica se há interação de 3ª ordem (tratamentos, períodos, tentativas)*
- *out 2: coxph (Surv(latência, status1) ~ factor (tratamentos)*factor (tentativas) + factor (periodos)*factor (tratamentos) + factor (periodos)*factor (tentativas) + cluster (ratos), method=c("breslow"), data=dados). = verifica se há interação de 2ª ordem (grupos e tentativas, tratamentos e períodos, períodos e tentativas).*
- *ANOVA (out1, out2): verifica se as interações de 3ª ordem são significativas.*
- *out 3: coxph (Surv(latência, status1) ~ factor (tratamentos) + factor (periodos) + factor (tentativas) + cluster (ratos), method=c("breslow"), data=dados): verifica se há efeitos significativos entre os fatores analisados separadamente (tratamentos, períodos, tentativas)*
- *ANOVA (out2, out3): verifica se as interações entre tratamentos*tentativas, tratamentos *períodos e períodos*tentativas são significativas.*

Caso as interações de 3ª e 2ª ordem não forem significativas, o uso do modelo denominado como out 3 é o mais adequado.

Para cada fator analisado foi utilizada uma referência para comparação, sendo: NGP (Não Gestante Padrão) a referência para *tratamentos* e Período 1 para *períodos*, tanto nas tarefas de esquiwa inibitória quanto nas tarefas de fuga. Para as *tentativas* na esquiwa inibitória foi utilizado a Linha de Base como referência de tentativas para os *treinos (aprendizado)* e Esquiwa 2 como referência de tentativas para o *teste (memória)*. Para as tentativas na fuga foi utilizado a Fuga 1 como referência de tentativas para os *treinos (aprendizado)* e Fuga 3 como referência de tentativas para o *teste (memória)*.

Para a representação descritiva dos dados dos testes de Esquiva Inibitória e Fuga utilizou-se a variável *Porcentagem de Latência* considerando-se 100% a maior latência, que nesses casos foi de 300 segundos de permanência dos animais nos braços do LTE: fechado (Esquiva Inibitória) e aberto (Fuga).

As *análises bioquímicas* foram realizadas em duplicatas. Os dados paramétricos - concentrações de tiamina e seus derivados fosforilados e BDNF - foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) fatorial 2 x 2 x 3, sendo os fatores: dieta (dois níveis: dieta padrão e restrita), gravidez (fêmeas grávidas e não-grávidas) e período de gravidez (três níveis: Período 1, Período 2 e Período 3).

Análises de regressão linear (Winer, 1962) foram usadas para verificar as correlações entre os parâmetros bioquímicos (centrais e periféricos) e entre esses e os dados comportamentais.

Os dados do modelo experimental (peso corporal, consumo de água e ração) e os dados bioquímicos foram analisados - utilizando-se os testes mencionados acima - usando-se o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 17.0. Todos os valores foram expressos como média \pm erro-padrão (S.E.M). Diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % ($p < 0,05$).

1. Modelo Experimental

1.1. Variação do Peso Corporal

Como mencionado na sessão de Métodos, o número total de **registros de peso (g)** ao longo dos períodos foram vinte ($n = 72$ ratos), sendo 3 registros ($n=72$ ratos) entre os dias 1 e 5 (Período 1: 1ª semana), 7 registros ($n=48$ ratos) entre os dias 1 e 13 (Período 2: 1ª e 2ª semanas) e 10 registros ($n=24$ ratos) entre os dias 1 e 19 (Período 3: 1ª, 2ª e 3ª semanas). Esses dados estão apresentados na Figura 8, painéis A, B e C para os três períodos, respectivamente.

ANOVA com medidas repetidas no último elemento, $2 \times 2 \times 3$ (1ª semana), $2 \times 2 \times 7$ (1ª e 2ª semanas) e $2 \times 2 \times 10$ (1ª, 2ª e 3ª semanas) mostraram:

Período 1: ausência de efeitos da gestação [$F_{(1,68)} = 1,3$; $p = 0,249$] e da restrição [$F_{(1,68)} = 0,2$; $p = 0,679$]; efeito significativo do tempo [$F_{(2,136)} = 189,3$; $p = 0,000$] e interação significativa somente entre os fatores gestação e tempo [$F_{(2,136)} = 26$; $p = 0,000$]. Não houve interações entre gestação e restrição [$F_{(1,68)} = 1,6$; $p = 0,214$], restrição e tempo [$F_{(2,136)} = 0,3$; $p = 0,771$] e gestação, restrição e tempo [$F_{(2,136)} = 0,2$; $p = 0,826$].

Período 2: efeito significativo do tempo [$F_{(2,111)} = 310,6$; $p = 0,000$] e ausência de efeitos da gestação [$F_{(1,44)} = 1,2$; $p = 0,279$] e da restrição [$F_{(1,44)} = 0,2$; $p = 0,692$]. As análises mostraram interação significativa entre gestação e tempo [$F_{(2,111)} = 64,3$; $p = 0,000$] e ausência de interações entre gestação e restrição [$F_{(1,44)} = 1,1$; $p = 0,305$], restrição e tempo [$F_{(2,111)} = 0,4$; $p = 0,742$] e entre os 3 fatores estudados [$F_{(2,111)} = 0,7$; $p = 0,543$].

Período 3: efeitos significativos da gestação [$F_{(1,20)} = 10,34$; $p = 0,004$] e do fator tempo [$F_{(2,45)} = 183,7$; $p = 0,000$]. Não houve efeito da restrição [$F_{(1,20)} = 0,0$; $p = 0,994$] e nem interação entre gestação e restrição [$F_{(1,20)} = 0,3$; $p = 0,595$] e uma tendência de interação

entre restrição x tempo [$F_{(2,45)} = 2,8$; $p = 0,06$]. Foram observadas interações significativas entre: gestação x tempo [$F_{(2,45)} = 68,7$; $p = 0,000$], gestação x restrição x tempo [$F_{(2,45)} = 5,4$; $p = 0,006$].

Em relação ao efeito significativo da gestação no *Período 3* o teste *Post Hoc – Bonferroni* - mostrou que as fêmeas GR (Gestante Restrita) ganharam mais peso a partir do 13º dia de gestação e as fêmeas GP (Gestante Padrão) começaram a ganhar peso de forma significativa a partir do 15º dia ($p < 0,05$). A diferença se manteve significativa até o 19º dia.

Variação do Peso corporal

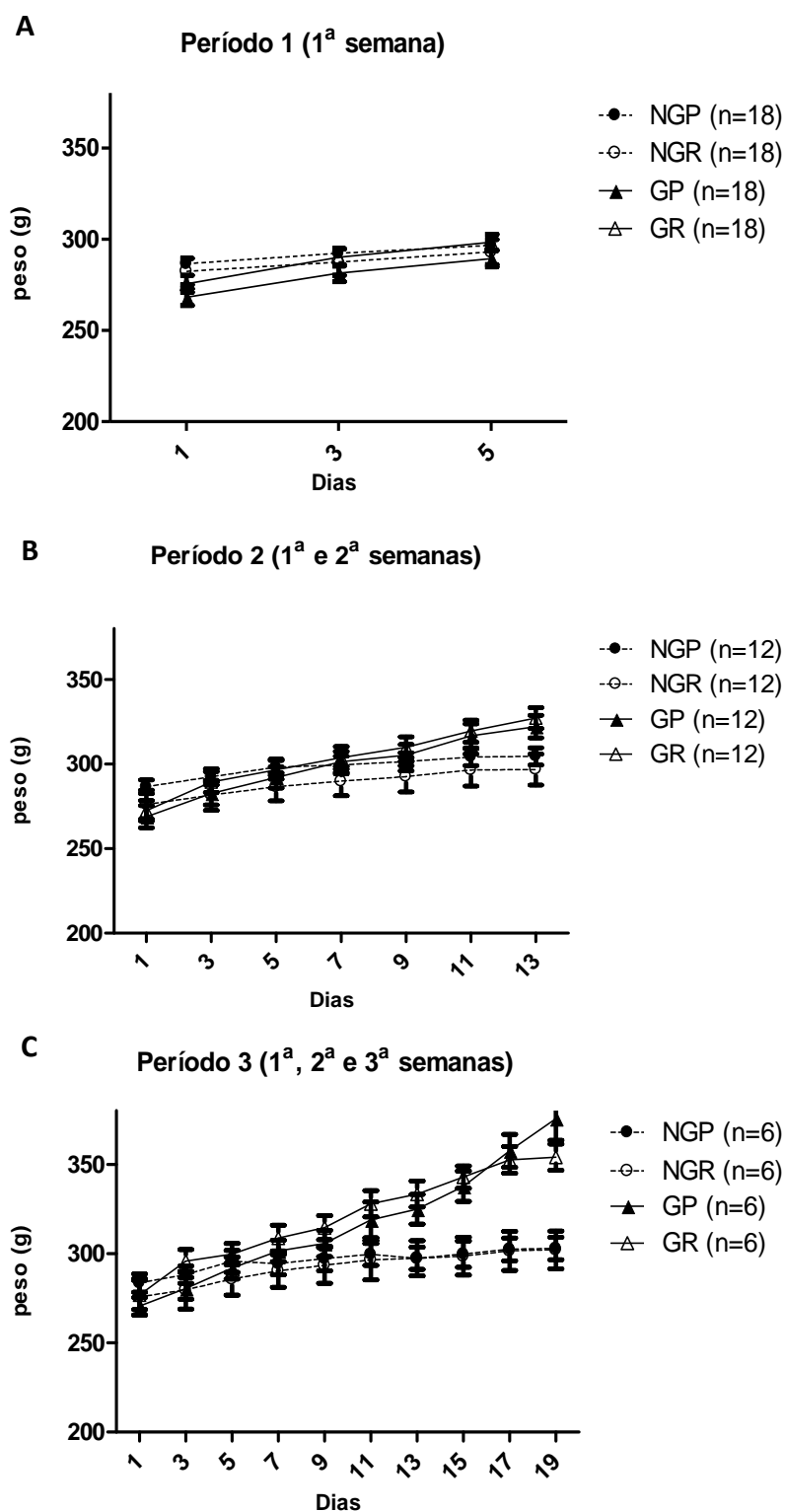


Figura 8: Média (g) \pm erro padrão da **VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL**. Nos painéis A, B e C estão representados os pesos dos animais ao longo do Período 1 (1ª semana, n=72), Período 2 (1ª e 2ª semanas, n=48) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas, n=24), respectivamente. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita. Os dados brutos dos pesos estão apresentados nas tabelas 13, 14, 15 e 16 na sessão “Anexos”.

Na Figura 9 estão apresentados os dados da *variação de peso corporal por período*.

Denominamos “*Variação de peso corporal por período*” a diferença (Δ) entre os pesos registrados no antepenúltimo ou penúltimo dia e primeiro dia, para cada um dos períodos:

Δ período 1: peso 5° - peso 1° dias (n=72)

Δ período 2: peso 13° - peso 1° dias (n=48)

Δ período 3: peso 19° - 1° dias (n=24).

ANOVA 2x2 (gestação x restrição) mostrou: Δ período 1: efeito significativo somente da gestação [$F_{(1,68)} = 38,5$; $p = 0,000$], não houve efeito significativo da restrição [$F_{(1,68)} = 0,4$; $p = 0,526$] e nem interação entre esses fatores [$F_{(1,68)} = 0,1$; $p = 0,757$]; Δ período 2: efeito significativo da gestação [$F_{(1,44)} = 68,0$; $p = 0,000$] e ausência de efeito significativo da restrição [$F_{(1,44)} = 1,2$; $p = 0,275$] e ausência de interação entre esses fatores [$F_{(1,44)} = 0,1$; $p = 0,800$]; Δ período 3: efeitos significativos dos dois fatores, gestação [$F_{(1,20)} = 43,5$; $p = 0,000$] e restrição [$F_{(1,20)} = 16,8$; $p = 0,001$] e interação entre eles [$F_{(1,20)} = 17,7$; $p = 0,000$].

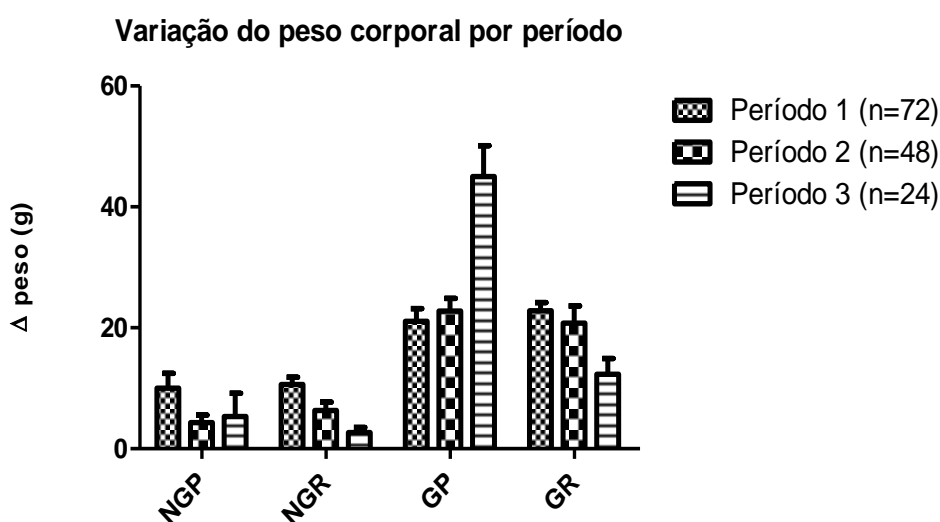


Figura 9: Média (g) \pm erro padrão da diferença (Δ) entre os pesos registrados nos antepenúltimo ou penúltimos dias e primeiros dias de cada período (**VARIAÇÃO DE PESO POR PERÍODO**): Δ Período 1 (1ª semana, n=72), Δ Período 2 (1ª e 2ª semanas, n=48) e Δ Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas, n=24). Grupos: NGP=Não Gestante Padrão; NGR=Não Gestante Restrita; GP=Gestante Padrão e GR=Gestante Restrita.

Com a finalidade de verificar o efeito da semana, foram realizadas análises considerando os dados referentes aos animais que passaram pelo tratamento durante o Período 2 e Período 3, separadamente. *Período 2*, ANOVA 2x2x2 - com medida repetida no último elemento: gestação, restrição e semana (1ª e 2ª, n=48 ratos) e *Período 3*: ANOVA 2x2x3 - com medida repetida no último elemento, gestação, restrição e semanas (1ª, 2ª e 3ª, n=24 ratos). Com esse objetivo de avaliar o efeito da semana, a **variação de peso semanal** foi calculada através dos pesos registrados em cada semana em intervalos de 5 dias/ por semana:

1ª Semana: Δ peso = 5º - 1º dias

2ª Semana: Δ peso = 11º - 7º dias

3ª Semana: Δ peso = 19º - 15º dias.

Esses dados estão apresentados na Figura 10, painéis A e B, respectivamente. As análises mostraram:

Período 2: efeitos significativos da gestação [$F_{(1,44)} = 46,5$; $p = 0,000$] e da semana [$F_{(1,44)} = 30,5$; $p = 0,000$]. Não foi observado efeito da restrição [$F_{(1,44)} = 0,1$; $p = 0,745$] e nem interações significativas entre os fatores analisados: gestação x restrição [$F_{(1,44)} = 0,01$; $p = 0,940$], gestação x semana [$F_{(1,44)} = 1,2$; $p = 0,281$], restrição x semana [$F_{(1,44)} = 0,2$; $p = 0,685$], gestação x restrição x semana [$F_{(1,44)} = 0,5$; $p = 0,499$];

Período 3: efeito significativo da gestação [$F_{(1,20)} = 34,9$; $p = 0,000$] e interações significativas entre os fatores: gestação x semana [$F_{(2,40)} = 3,6$; $p = 0,035$], restrição x semana [$F_{(2,40)} = 7,7$; $p = 0,001$], gestação x restrição x semana [$F_{(2,40)} = 8,7$; $p = 0,001$]. Ausência de efeitos da semana [$F_{(2,40)} = 2,6$; $p = 0,085$] e da restrição [$F_{(1,20)} = 2,5$; $p = 0,126$], e de interação entre gestação e restrição [$F_{(1,20)} = 2,2$; $p = 0,153$].

Varição de peso semanal

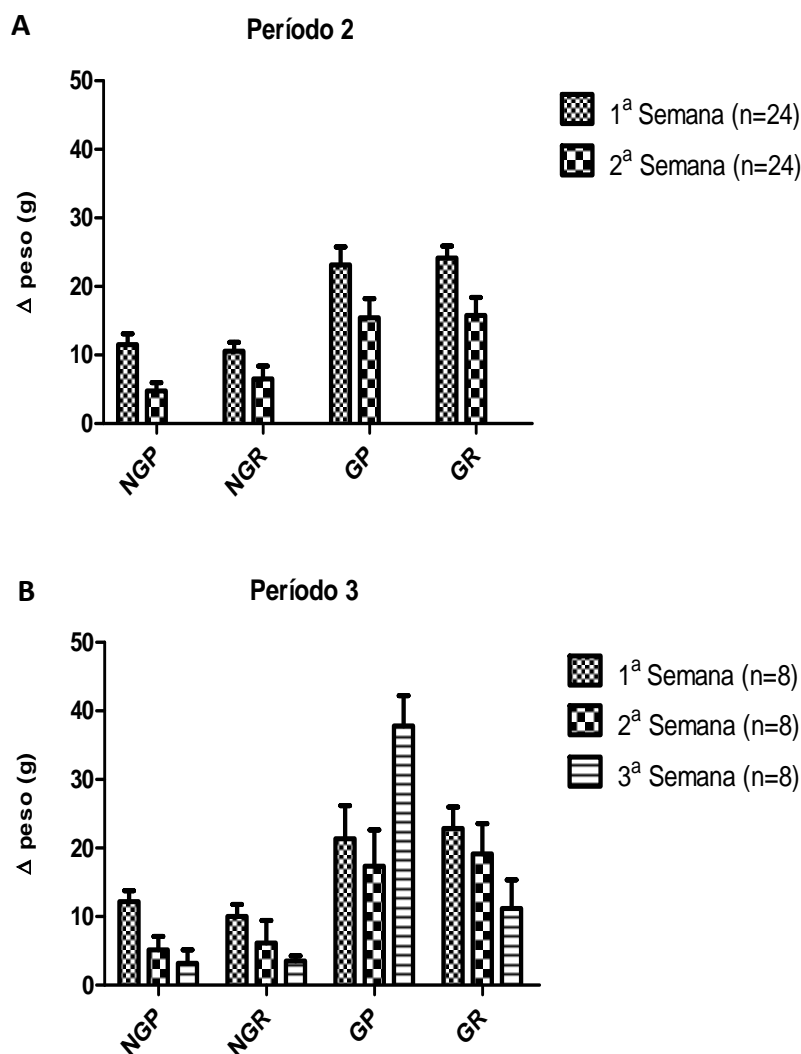


Figura 10: Média (g) \pm erro padrão da diferença (Δ) entre os pesos registrados em intervalos de 5 dias/por semana, durante os períodos 2 e 3 (**VARIAÇÃO DE PESO SEMANAL**): 1ª Semana: Δ peso= 5º - 1º dias, 2ª Semana: Δ peso= 11º - 7º dias; 3ª Semana: Δ peso= 19º - 15º dias. Grupos: NGP=Não Gestante Padrão; NGR=Não Gestante Restrita; GP=Gestante Padrão e GR=Gestante Restrita.

1.2. Consumo de Ração

O número total de **registros do consumo de ração** (g) ao longo do experimento (*períodos 1, 2 e 3*) foram 36 (n=72 ratos). Sendo 5 registros (n=72 ratos) entre os dias 1 e 5 (Período 1: 1ª semana), 12 registros (n=48 ratos) entre os dias 1 e 12 (Período 2: 1ª e 2ª semanas) e 19

registros (n=24 ratos) entre os dias 1 e 19 (Período 3: 1^a, 2^a e 3^a semanas). Esses dados estão apresentados na Figura 11, painéis A, B e C para os três períodos, respectivamente. ANOVA 2x2x5 (Período 1: 1^a semana), 2x2x12 (Período 2: 1^a e 2^a semanas) e 2x2x19 (Período 3: 1^a, 2^a e 3^a semanas), com medidas repetidas nos últimos elementos, mostraram:

Período 1: efeito significativo do tempo [$F_{(2,168)} = 15,6$; $p = 0,000$] e ausência de efeitos significativos da gestação [$F_{(1,68)} = 0,8$; $p = 0,361$] ou restrição [$F_{(1,68)} = 0,3$; $p = 0,581$] e de interações entre: gestação e restrição [$F_{(1,68)} = 0,1$; $p = 0,985$], gestação e tempo [$F_{(2,168)} = 1,9$; $p = 0,139$], restrição e tempo [$F_{(2,168)} = 1,5$; $p = 0,223$], e entre os 3 fatores (gestação, restrição e tempo) [$F_{(2,168)} = 0,8$; $p = 0,491$].

Período 2: efeitos significativos dos fatores gestação [$F_{(1,44)} = 8,3$; $p = 0,006$] e tempo [$F_{(4,183)} = 10,8$; $p = 0,000$] e interação significativa entre esses fatores (gestação x tempo) [$F_{(4,183)} = 3,9$; $p = 0,004$]. Não houve efeitos significativos do fator restrição [$F_{(1,44)} = 0,5$; $p = 0,473$] e interações entre os fatores: gestação x restrição [$F_{(1,44)} = 0,5$; $p = 0,473$], restrição x tempo [$F_{(4,183)} = 1,0$; $p = 0,376$] e gestação x restrição x tempo [$F_{(4,183)} = 1,5$; $p = 0,204$].

Período 3: efeitos significativos da gestação [$F_{(1,20)} = 8,7$; $p = 0,008$] e do tempo [$F_{(3,67)} = 15,7$; $p = 0,000$]. Não houve efeito da restrição [$F_{(1,20)} = 1,8$; $p = 0,206$] e nem interação entre gestação e restrição [$F_{(1,20)} = 1,1$; $p = 0,308$]. Interações significativas foram observadas entre gestação e tempo [$F_{(3,67)} = 6,1$; $p = 0,001$], restrição e tempo [$F_{(3,67)} = 5,0$; $p = 0,002$] e entre os 3 fatores (gestação, restrição, tempo) [$F_{(3,67)} = 3,8$; $p = 0,011$].

O teste *Post Hoc- Bonferroni* - mostrou que existem diferenças significativas entre os grupos gestantes e não gestantes, no consumo de ração, em duas “janelas” do experimento, entre os dias 09 e 13 e entre os dias 17 e 19. As ratas gestantes (GP e GR) começaram a consumir mais ração que as ratas NGP e NGR a partir do 9^o e 10^o dias ($p < 0,05$), respectivamente, até o 13^o dia de gestação. Não foram verificados efeitos significativos entre os dias 14 e 16. A partir do

17º dia, foi verificado efeito entre as ratas gestantes, com o aumento do consumo pelas GP ($p < 0,05$) e diminuição do mesmo pelas GR ($p < 0,05$). A comparação do consumo entre as ratas gestantes e não gestantes, entre os dias 17 e 19, mostrou efeitos significativos ($p < 0,05$).

Consumo de Ração

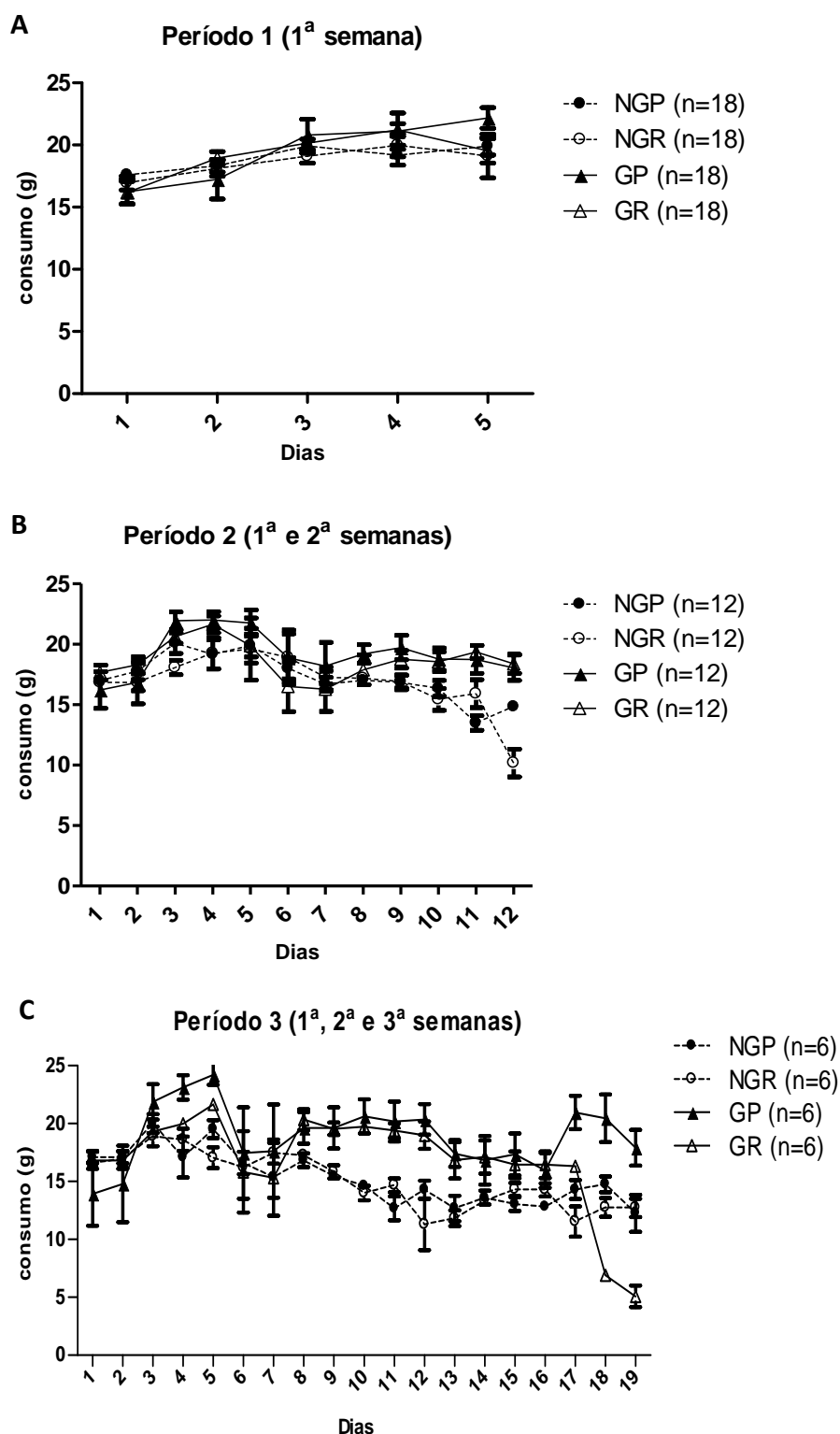


Figura 11: Média (g) \pm erro padrão do CONSUMO DE RAÇÃO AO LONGO DOS PERÍODOS 1, 2 e 3. Nos painéis A, B e C estão representados o consumo durante os Período 1 (1ª semana, n=72), Período 2 (1ª e 2ª semanas, n=48) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas, n=24), respectivamente. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita. Os dados brutos estão apresentados nas tabelas 17, 18, 19, 20 na sessão “Anexos”.

O efeito da semana sobre o consumo de ração foi avaliado usando dados obtidos de grupos de animais de experimentos independentes, em dois períodos. O *Período 2* (n=48 ratos) correspondente as 1ª e 2ª semanas e o *Período 3* (n=24 ratos), correspondente as 1ª, 2ª e 3ª semanas.

A média do consumo de ração em cada semana dos respectivos períodos foi calculada.

1ª Semana: consumo entre o 1º e 6º dias

2ª Semana: consumo entre o 7º e 12º dias

3ª Semana: consumo entre o 14º e 19º dias.

Os dados estão apresentados na Figura 12, painéis A e B, para o período 2 e 3, respectivamente. ANOVA 2x2x2 com medida repetida no último elemento (gestação, restrição e semanas = 1ª e 2ª) para os dados do *Período 2* e ANOVA 2x2x3, com medida repetida no último elemento (gestação, restrição e semanas = 1ª, 2ª e 3ª) para os dados do *Período 3*, mostraram:

Período 2: efeitos significativos da gestação [$F_{(1,44)} = 8,2; p = 0,006$] e da semana [$F_{(1,44)} = 28,5; p = 0,000$] e interação significativa entre esses dois fatores [$F_{(1,44)} = 7,9; p = 0,007$]. Não foi observado efeito da restrição [$F_{(1,44)} = 0,5; p = 0,473$], e não houve interações significativas entre gestação e restrição [$F_{(1,44)} = 0,01; p = 0,908$]; restrição e semana [$F_{(1,44)} = 0,01; p = 0,966$] e, gestação, restrição e semana [$F_{(1,44)} = 0,01; p = 0,959$].

Período 3: efeitos significativos da gestação [$F_{(1,20)} = 7,8; p = 0,011$] e da semana [$F_{(2,40)} = 77,6; p = 0,000$] e interações significativas entre gestação e semana [$F_{(2,40)} = 12,9; p = 0,000$]. Observou-se ausência de efeito da restrição [$F_{(1,20)} = 1,7; p = 0,200$] e de interação entre gestação e restrição [$F_{(1,20)} = 1,2; p = 0,284$]. Interações significativas foram verificadas entre os fatores: restrição e semana [$F_{(2,40)} = 9,1; p = 0,001$] e entre gestação, restrição e semana [$F_{(2,40)} = 7,9; p = 0,001$].

Consumo Médio de Ração por Semana

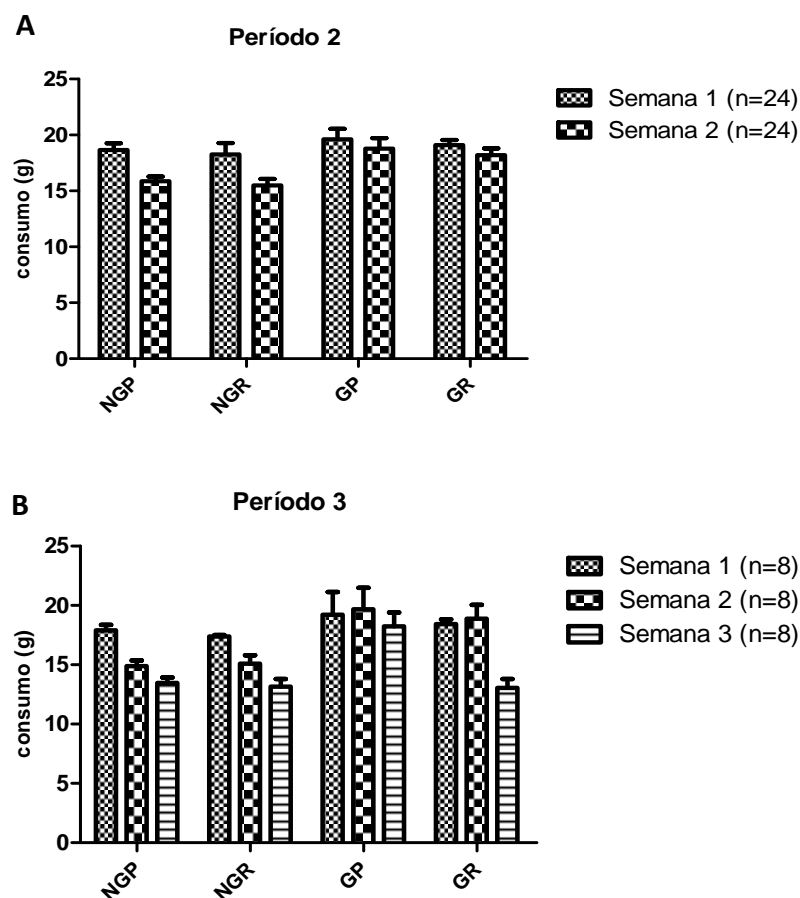


Figura 12: Média (g) \pm erro padrão do CONSUMO DE RAÇÃO POR SEMANA nos Períodos 2 e 3. Nos painéis A e B estão representados o consumo durante o Período 2 (1ª e 2ª semanas, n=48) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas, n=24), respectivamente. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita.

1.3. Consumo de Água

Os registros de consumo de água (ml) ao longo dos períodos foram realizados juntamente com a coleta de dados de consumo de ração. Esses dados estão apresentados na Figura 13, painéis A, B e C para os três períodos, respectivamente. ANOVA 2x2x5 (Período 1: 1ª semana), 2x2x12 (Período 2: 1ª e 2ª semanas) e 2x2x19 (Período 3: 1ª, 2ª e 3ª semanas) mostraram:

Período 1: efeitos significativos dos fatores gestação [$F_{(1,68)} = 9,6; p = 0,003$] e tempo [$F_{(2,189)} = 19,8; p = 0,000$] e interação significativa entre gestação e tempo [$F_{(2,189)} = 3,9; p = 0,011$].

Ausência de efeito significativo da restrição [$F_{(1,68)} = 0,001$; $p = 0,979$], e interações entre os fatores gestação e restrição [$F_{(1,68)} = 1,9$; $p = 0,162$], restrição e tempo [$F_{(2,189)} = 2,1$; $p = 0,108$], e entre gestação, restrição e tempo [$F_{(2,189)} = 0,8$; $p = 0,445$].

Período 2: efeitos significativos dos fatores gestação [$F_{(1,44)} = 25,3$; $p = 0,000$] e tempo [$F_{(4,183)} = 17,9$; $p = 0,000$] e interações significativas entre esses fatores (gestação x tempo) [$F_{(4,183)} = 2,5$; $p = 0,040$] e entre gestação e restrição [$F_{(1,44)} = 9,3$; $p = 0,004$]. Não foi verificado efeito do fator restrição [$F_{(1,44)} = 2,4$; $p = 0,126$] e nem interações entre os fatores: restrição x tempo [$F_{(4,183)} = 1,7$; $p = 0,134$] e gestação x restrição x tempo [$F_{(4,183)} = 1,2$; $p = 0,304$].

Período 3: efeitos significativos da gestação [$F_{(1,20)} = 82,1$; $p = 0,000$] e tempo [$F_{(3,70)} = 15,4$; $p = 0,000$] e interação significativa entre gestação e tempo [$F_{(3,70)} = 4,3$; $p = 0,005$]. Não foi observado efeito da restrição [$F_{(1,20)} = 1,9$; $p = 0,180$] e nem interação entre os fatores: gestação e restrição [$F_{(1,20)} = 0,01$; $p = 0,921$], restrição e tempo [$F_{(3,70)} = 1,1$; $p = 0,362$] e entre os 3 fatores analisados (gestação, restrição, tempo) [$F_{(3,70)} = 0,6$; $p = 0,600$].

O teste *Post Hoc – Bonferroni* - mostrou que as fêmeas gestantes (GP e GR) apresentaram maior consumo de água em relação às fêmeas não gestantes (NGP e NGR) a partir do 11º dia de experimento ($p < 0,05$).

Consumo de Água

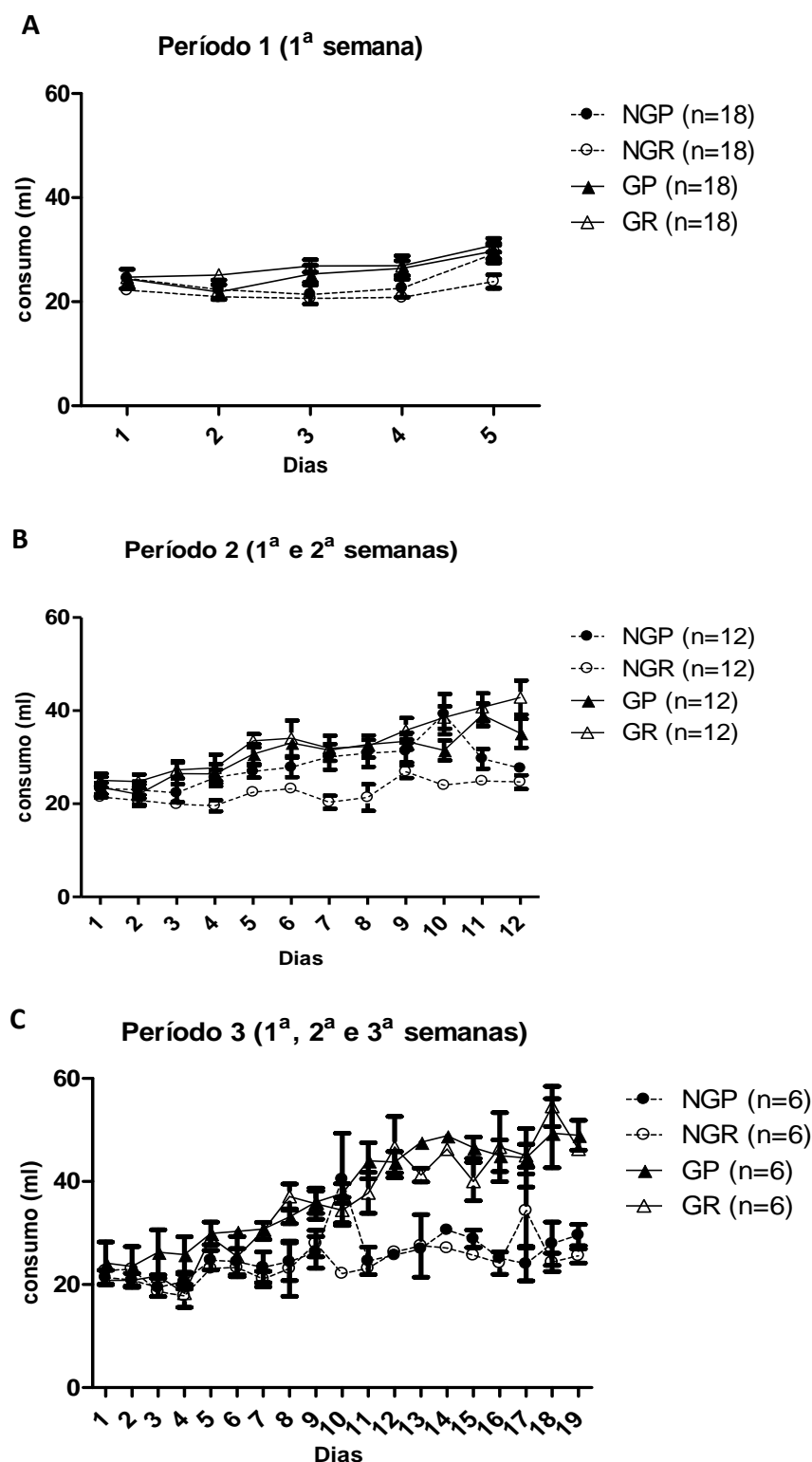


Figura 13: Média (ml) \pm erro padrão do CONSUMO DE ÁGUA AO LONGO DOS PERÍODOS 1, 2 e 3. Nos painéis A, B e C estão representados o consumo durante os Período 1 (1ª semana, n=72), Período 2 (1ª e 2ª semanas, n=48) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas, n=24), respectivamente. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita. Os dados brutos estão apresentados nas tabelas 21, 22, 23 e 24 na sessão "Anexos".

Na Figura 14, painéis A e B, apresentamos os dados do consumo médio de água por semana referente aos *Períodos 2 e 3*, respectivamente.

ANOVA 2x2x2 (gestação, restrição e semana = 1^a e 2^a) e ANOVA 2x2x3 (gestação, restrição e semana = 1^a, 2^a e 3^a) foram realizadas com o intuito de verificar o efeito das semanas, além dos efeitos da gestação e restrição sobre o consumo de água durante o *Período 2* (n=48 ratos) e *Período 3* (n=24 ratos), respectivamente. Para cada semana, foi calculada a média do consumo de água:

1^a Semana: consumo entre os 1^o e 6^o dias

2^a Semana: consumo entre os 7^o e 12^o dias

3^a Semana: consumo entre os 14^o e 19^o dias.

As análises mostraram:

Período 2: efeitos significativos da gestação [$F_{(1,44)} = 25,3$; $p = 0,000$] e semana [$F_{(1,44)} = 31,6$; $p = 0,000$] e ausência de efeito do fator restrição [$F_{(1,44)} = 2,4$; $p = 0,126$]. Foi observada interação significativa somente entre gestação e restrição [$F_{(1,44)} = 9,3$; $p = 0,004$]. Não houve interações entre gestação e semana [$F_{(1,44)} = 1,9$; $p = 0,165$], restrição e semana [$F_{(1,44)} = 0,7$; $p = 0,402$] e interação entre gestação, restrição e semana [$F_{(1,44)} = 0,9$; $p = 0,334$];

Período 3: efeitos significativos dos fatores gestação [$F_{(1,20)} = 83,1$; $p = 0,000$] e semana [$F_{(1,26)} = 417,4$; $p = 0,000$] e interação significativa entre esses fatores (gestação x semana) [$F_{(1,26)} = 35,6$; $p = 0,000$]. Não foi verificado efeito da restrição [$F_{(1,20)} = 1,4$; $p = 0,236$] e nem interações entre gestação e restrição [$F_{(1,20)} = 0,4$; $p = 0,506$], restrição e semana [$F_{(1,26)} = 0,4$; $p = 0,590$] e interação entre os 3 fatores avaliados [$F_{(1,260)} = 0,3$; $p = 0,629$].

Consumo Médio de Água por Semana

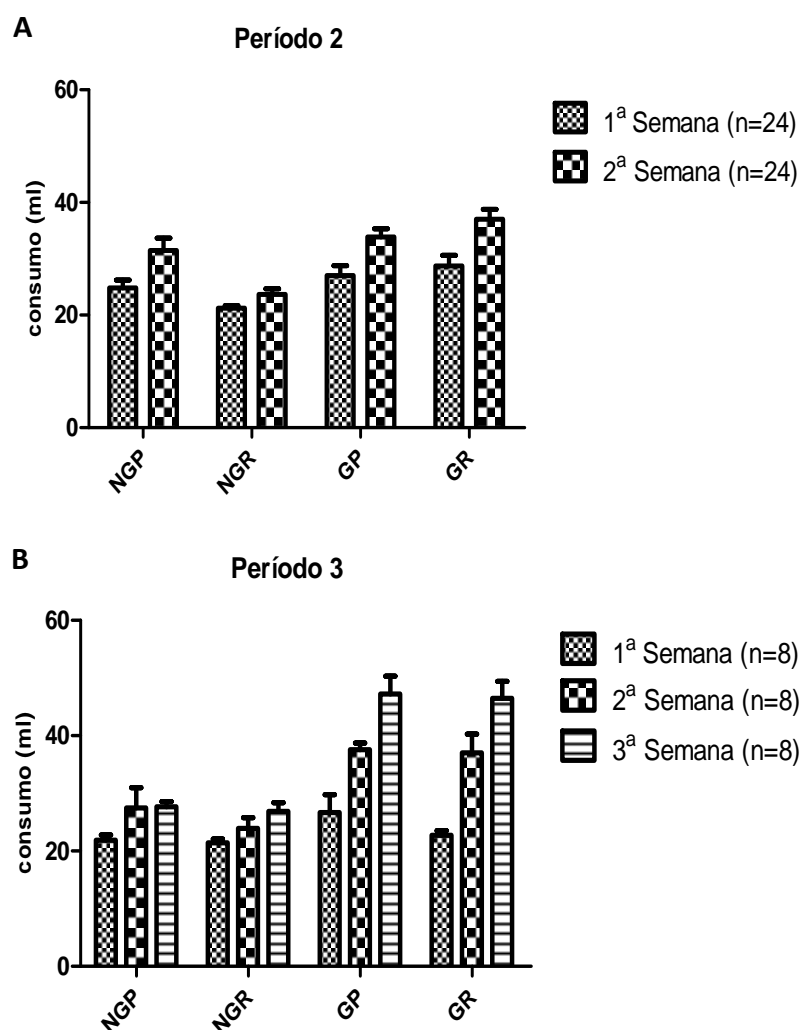


Figura 14: Média (g) \pm erro padrão do CONSUMO DE ÁGUA POR SEMANA nos Períodos 2 e 3. Nos painéis A e B estão representados o consumo médio durante o Período 2 (1ª e 2ª semanas, n=48) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas, n=24), respectivamente. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita.

1.4. Pesos Encefálicos

Os pesos dos encéfalos (g) dos animais dos 4 grupos no final de cada um dos 3 períodos foram registrados. Esses dados estão apresentados na Figura 15. ANOVA 2x2x3 (fatores: gestação; restrição e período) mostraram: ausência de efeito significativo: da gestação [$F_{(1,59)} = 0,32$; $p = 0,575$], restrição [$F_{(1,59)} = 2,8$; $p = 0,098$] e períodos [$F_{(2,59)} = 0,04$; $p = 0,958$].

Também não foram observadas interações significativas entre esses fatores: gestação x restrição [$F_{(1,59)} = 0,65$; $p = 0,423$], gestação x períodos [$F_{(2,59)} = 0,11$; $p = 0,889$], restrição x períodos [$F_{(2,59)} = 1,44$; $p = 0,243$], gestação x restrição x períodos [$F_{(2,59)} = 0,50$; $p = 0,607$].

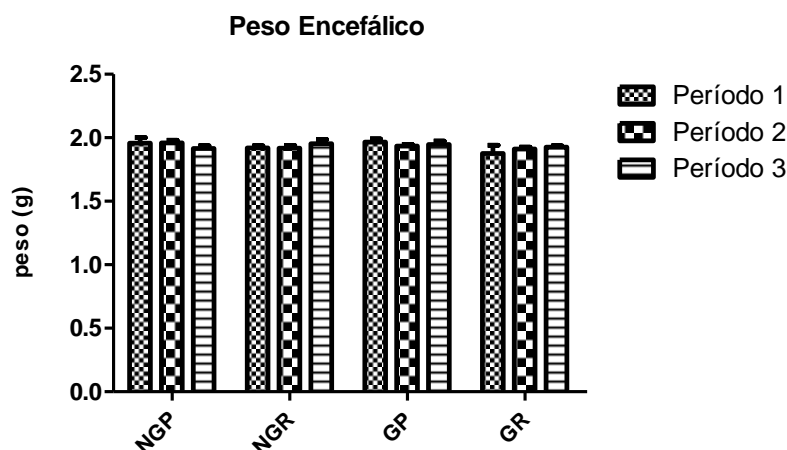


Figura 15: Média (g) \pm erro padrão do **PESO DOS ENCEFALOS** dos animais dos 4 grupos nos 3 Períodos (1, 2 e 3 $n=24$ cada). Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita. Os dados brutos estão apresentados nas tabela 25 na sessão “Anexos”.

1.5. Dados dos fetos

O **número de fetos (n)** provenientes das ratas gestantes, tanto de dieta padrão (GP) quanto restrita (GR) foi registrado em cada período. A Figura 16 mostra as médias dos números de fetos provenientes de gestantes padrões (GP, $n=6$ para cada período) e de gestantes restritas (GR, $n=6$ para cada período) nos Períodos 1, 2 e 3. Os resultados da análise Mann Whitney entre fetos (FP) das gestantes padrões e fetos (FR) das gestantes restritas, mostrou que não houve efeito significativo da restrição sobre o número de fetos em nenhum dos 3 períodos: *Período 1* [$Z = -1,72$, $p = 0,085$], *Período 2* [$Z = -0,16$, $p = 0,869$] e *Período 3* [$Z = 0,00$, $p = 1,00$].

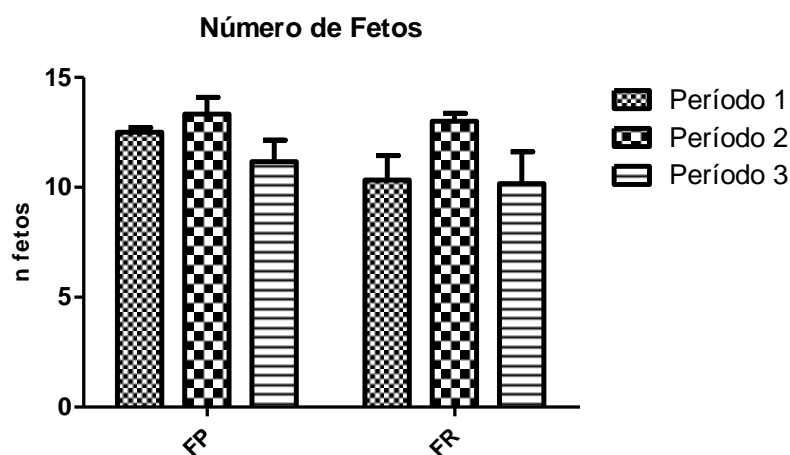


Figura 16: Média (g) \pm erro padrão do **NÚMERO DE FETOS** provenientes de gestantes (GP e GR) sacrificadas no fim de cada período (1,2 e 3). Grupos: FP = fetos provenientes de gestantes padrões (GP); FR = fetos provenientes de gestantes restritas (GR). Os dados brutos estão apresentados na tabela 26 na sessão “Anexos”.

Os fetos provenientes das ratas sacrificadas no final dos Períodos 2 e 3 foram pesados. Os fetos provenientes das ratas sacrificadas com uma semana de gravidez (Período 1) eram muito pequenos o que inviabilizou, em termos práticos, a separação e a pesagem dos mesmos. As médias \pm erro padrões dos *pesos dos fetos* provenientes de gestantes padrões e de gestantes restritas, fetos padrões (FP) e restritos (FR), respectivamente, estão representadas na Figura 17, painéis A e B. Painel A: dados dos fetos provenientes de gestantes do Período 2; Painel B: dados dos fetos provenientes de gestantes do Período 3. Os resultados do teste *t-student* entre FP e FR mostraram efeitos significativos da restrição sobre os pesos de fetos no *Período 2* ($p = 0,05$) e no *Período 3* ($p = 1,36 \times 10^{-7}$).

Peso dos fetos

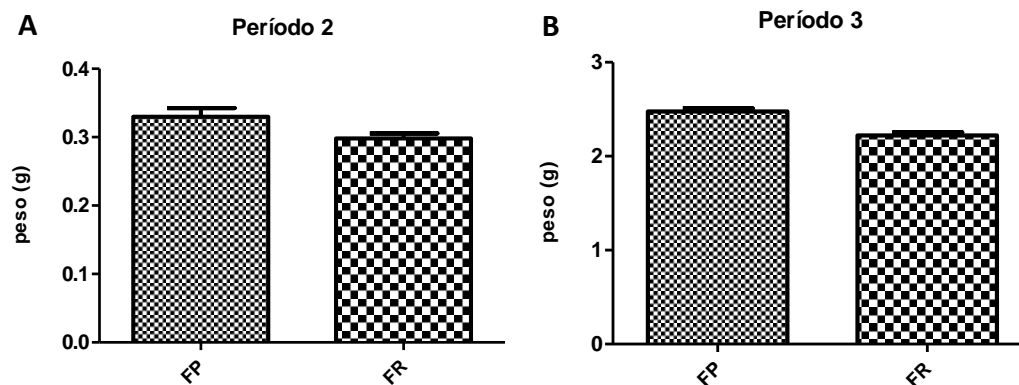


Figura 17: Média (g) \pm erro padrão dos **PESOS DOS FETOS** provenientes de gestantes padrão e restritas que foram sacrificadas no fim do período 2 (painel A) e período 3 (painel B). Grupos: FP = fetos provenientes de gestantes padrões; FR = fetos provenientes de gestantes restritas. As médias dos pesos dos fetos estão apresentadas na tabela 26, na sessão “Anexos”.

2. Estudos Comportamentais

2.1. Teste de Esquiva Inibitória – Aprendizado e memória

A análise dos dados obtidos no *treino (aprendizagem)* e no *teste (memória)* em **tarefas de Esquiva Inibitória**, para verificar os efeitos dos tratamentos (grupos: NGP, NGR, GP e GR), períodos (1, 2 e 3) e tentativas (linha de base, esquivas 1, 2 e 3) foi realizada utilizando o Modelo de Cox para Análise de Sobrevivência. Cada análise de sobrevivência foi seguida de análise de variância com o objetivo de verificar as interações entre os fatores: tratamentos *períodos * tentativas; tratamentos * períodos; tratamentos * tentativas; tentativas * períodos. Os resultados dessas análises mostraram que essas interações não foram significativas ($p > 0,05$).

Na ausência de interações de 3ª e 2ª ordens, análises com o Modelo de Cox foram aplicadas para avaliar cada fator separadamente (tratamentos=grupos ou períodos ou tentativas) com o

seguinte script: *coxph (Surv(latência, status1) ~ factor (tratamentos) + factor (periodos) + factor (tentativas) + cluster (ratos), method=c("breslow"), data=dados)*. Para cada fator, utilizamos uma referência para comparação, sendo: NGP (Não Gestante Padrão) a referência para tratamentos, Período 1, para períodos e Linha de Base para tentativas no *treino* (*aprendizado*) ou Esquiva 2 para tentativas no *teste* (*memória*).

Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 4.

<i>Esquiva Inibitória</i>				
<i>Fatores</i>	<i>exp (coef)</i>	<i>lower .95</i>	<i>upper .95</i>	<i>valor de p</i>
NGR	0.72	0.43	1.23	0.24
GP	1.32	0.84	2.08	0.22
GR	0.79	0.49	1.27	0.34
Período 2	0.97	0.65	1.44	0.89
Período 3	0.70	0.44	1.13	0.14
Esquiva 1	0.71	0.55	0.90	0.005
Esquiva 2	0.32	0.24	0.43	6.00 e ⁻¹⁵
Esquiva 3	1.50	1.22	1.85	0.0001

Tabela 4: Dados obtidos através da Análise de Sobrevivência, aplicando-se o Modelo de Cox aos resultados do desempenho dos animais no **TREINO (aprendizado) e no TESTE (memória) NA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA**. NGR = Não Gestantes Restritas; GP= Gestantes Padrão, GR=Gestantes Restritas, Período 2= 1ª e 2ª semanas de tratamento e Período3= 1ª, 2ª e 3ª semanas. Exp (coef) = taxa de falha na tarefa com relação à respectiva referência [(i) NGP=Não Gestante Padrão, (ii) Período 1, (iii) Linha de Base (treino) ou Esquiva 2 (teste) foram utilizadas como referências para (i) tratamentos, (ii) períodos e (iii) tentativas (Esquivas 1 e 2: treino ou Esquiva 3: teste), respectivamente]. Lower 0.95 e upper 0.95 = menor e maior taxa de falha, respectivamente, para um nível de significância de $p < 0.05$.

As análises mostraram ausência de efeitos significativos em relação aos *tratamentos* e aos *períodos* ($p < 0,05$).

Em relação às *tentativas* no *treino* (Linha de base, Esquiva 1 e 2), a taxa de falha na Esquiva 1 (2ª tentativa) foi aproximadamente 0,7 vezes a taxa de falha na Linha de Base (1ª tentativa) ($p = 0,005$). Ou seja, o tempo de permanência no braço fechado durante a esquiva 1 (2ª tentativa) foi maior comparado ao desempenho na linha de base. Na Esquiva 2 (3ª tentativa), as ratas

também permaneceram mais tempo no braço fechado comparando com a latência na Linha de base (1ª tentativa), sendo a taxa de falha 0,3 vezes a taxa na linha de base ($p = 6,00 \times 10^{-15}$).

O desempenho em termos da recuperação da informação aprendida durante o treino na tarefa de esquiva inibitória, ou seja, desempenho no *teste (memória)*, foi avaliado comparando o desempenho na Esquiva 3 com o desempenho na Esquiva 2. Assim, os resultados das análises mostraram que o tempo de permanência no braço fechado durante a Esquiva 3 foi menor em relação ao tempo registrado na Esquiva 2, sendo que a taxa de falha da Esquiva 3 foi de 1,5 vezes a taxa de falha da Esquiva 2 ($p = 0,0001$).

Na Figura 18, painéis A, B, C e D, estão apresentadas as Taxas de Falhas para os fatores avaliados nas tarefas de esquiva inibitória: tratamentos, períodos, tentativas no treino e tentativas no teste respectivamente.

Esquiva Inibitória

(Aprendizado e Memória)

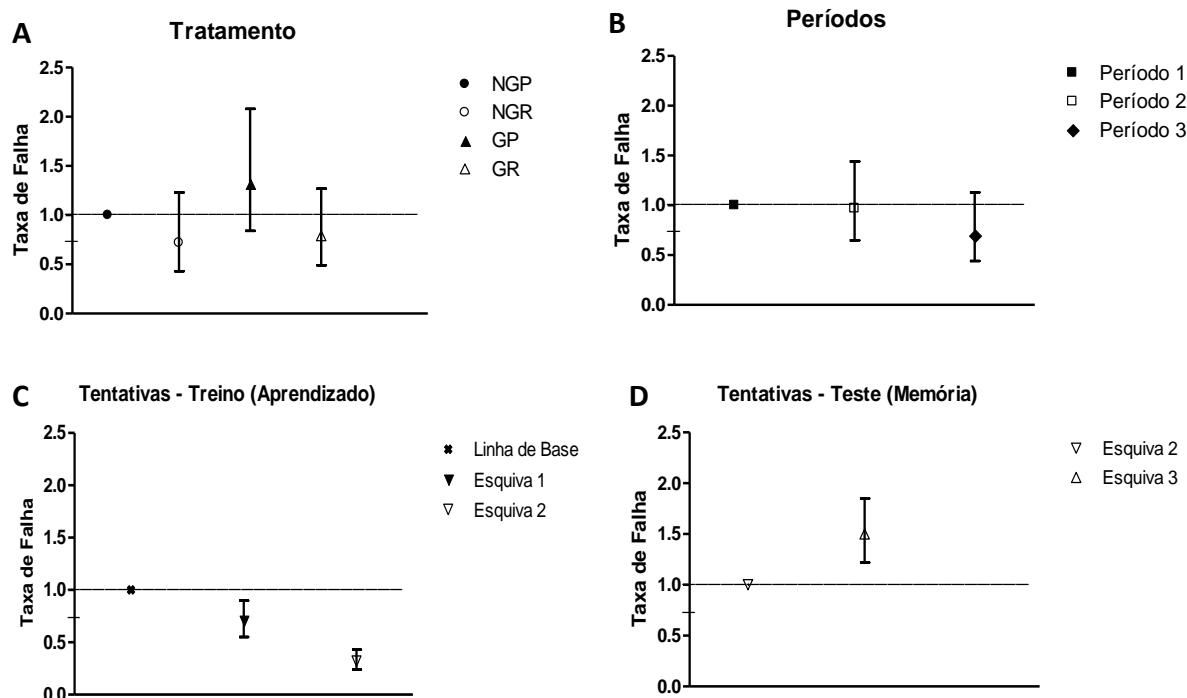


Figura 18: Dados do desempenho dos animais no **TREINO** (Aprendizado - painéis A, B e C) E NO **TESTE** (Memória - painel D) DA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA expressos como Taxa de Falha em relação ao respectivo fator de referência, com Taxa de Falha igual a 1. Barras verticais indicam as maiores e menores Taxas de Falhas. Nos painéis A, B, C e D estão apresentadas as Taxas de Falhas quando se considera os efeitos dos tratamentos, períodos e tentativas, com relação às respectivas referências [(i) NGP, (ii) Período 1 e (iii) Linha de Base (treino) ou Esquiva 2 (teste) foram utilizadas como referências para (i) tratamentos, (ii) períodos e (iii) tentativas (Esquivas 1 e 2: treino ou Esquiva 3: teste), respectivamente]. NGP= Não Gestante Padrão; NGR = Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita.

Com a finalidade de se ter uma descrição do comportamento dos animais dos diferentes grupos, com relação ao desempenho na tarefa de Esquiva Inibitória, em termos de latência, esses dados estão sendo apresentados na Figura 19. Nessa figura podem-se observar os dados referentes ao desempenho dos animais (n=72) dos quatro grupos no treino: aprendizado (Linha de base, Esquiva 1 e Esquiva 2) e no teste: memória (Esquiva 3). Os dados são expressos como *Porcentagem de Latência*, sendo a porcentagem de 100% equivalente a maior latência (300 segundos) de permanência dos animais no braço fechado do LTE, ou seja,

quanto mais tempo o animal permanecer no braço fechado, se esquivando do braço aberto (estímulo aversivo), maior sua *Porcentagem de Latência*.

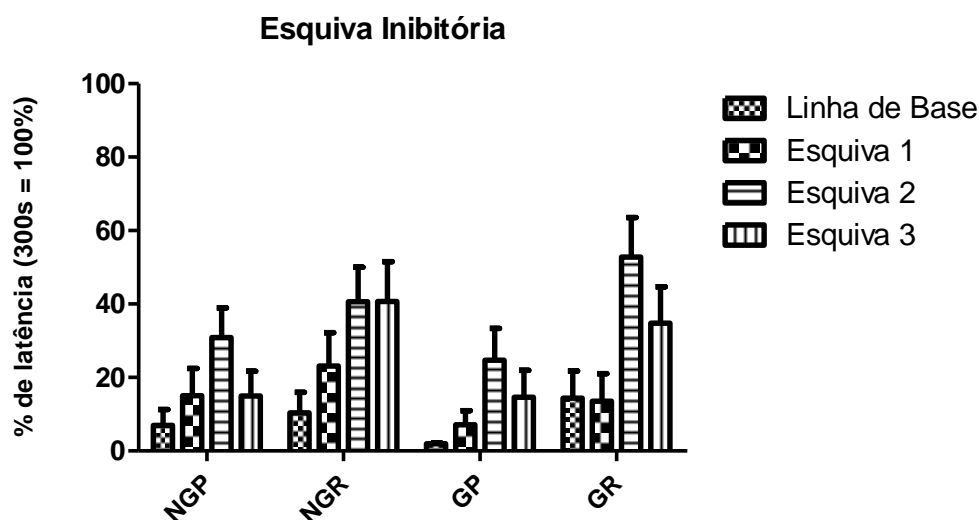


Figura 19: Dados do *DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO TREINO (Aprendizado) E TESTE (Memória) NA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA*. Média \pm Erro padrão da porcentagem de latência no braço fechado do labirinto em T-elevado, em cada tentativa, por grupo. Porcentagem de Latência equivale ao tempo (segundos) de permanência no braço fechado do labirinto em T-elevado, sendo que 300 segundos = 100% de latência. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR = Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita. Os dados referentes ao desempenho dos animais (latências) estão apresentados nas tabelas 27, 28, 29 e 30 na sessão “Anexos”.

2.2. Teste de Fuga - Aprendizado e memória

O desempenho dos animais no *treino (aprendizagem)* e no *teste (memória)* na **tarefa de Fuga** no LTE também foi avaliado utilizando-se o Modelo de Cox para Análise de Sobrevida, com a finalidade de se verificar os efeitos dos tratamentos (grupos: NGP, NGR, GP e GR), períodos (1, 2 e 3) e tentativas (fugas 1, 2, 3 e 4). Cada análise de sobrevivência foi seguida de análise de variância para verificar o nível de significância das interações entre os fatores: tratamentos * períodos * tentativas; tratamentos * tentativas; tratamentos * períodos; tentativas * períodos. Os resultados dessas análises mostraram que não houve nenhuma interação significativa ($p > 0,05$).

A ausência de interações significativas de 3ª e 2ª ordens possibilitou uma análise separada de cada fator (tratamentos=grupos ou períodos ou tentativas) com o seguinte *script*: *coxph (Surv(latência, status1) ~ factor (tratamentos) + factor (periodos) + factor (tentativas) + cluster (ratos), method=c("breslow"), data=dados)*. Para cada fator foi utilizado uma referência de comparação, sendo: NGP (Não Gestante Padrão) para tratamentos, Período 1 para períodos e Fuga 1 para tentativas no *treino (aprendizado)* ou Fuga 3 para tentativas no *teste (memória)*.

Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 5.

<i>Fatores</i>	<i>exp (coef)</i>	<i>Fuga</i>		<i>valor de p</i>
		<i>lower .95</i>	<i>upper .95</i>	
NGR	1.39	0.91	2.13	0.11
GP	1.27	0.92	1.74	0.13
GR	0.94	0.62	1.42	0.78
Período 2	1.33	0.95	1.85	0.09
Período 3	0.73	0.51	1.03	0.08
Fuga 2	0.75	0.58	0.98	0.03
Fuga 3	0.64	0.48	0.84	0.001
Fuga 4	1.47	1.12	1.93	0.004

Tabela 5: Dados obtidos através da Análise de Sobrevivência, aplicando-se o Modelo de Cox aos resultados do desempenho dos animais no **TREINO (Aprendizado)** e no **TESTE (Memória) NA TAREFA DE FUGA**. NGR = Não Gestantes Restritas; GP= Gestantes Padrão, GR=Gestantes Restritas, Período 2= 1ª e 2ª semanas de tratamento e Período3= 1ª, 2ª e 3ª semanas. Exp (coef) = taxa de falha na tarefa com relação à respectiva referência [(i) NGP=Não Gestante Padrão, (ii) Período 1, (iii) Fuga 1 (treino) ou Fuga 3 (teste) foram utilizadas como referências para (i) tratamentos, (ii) períodos e (iii) tentativas (Fuga 2 e 3: treino ou Fuga 4: teste), respectivamente]. Lower 0.95 e upper 0.95 = menor e maior taxa de falha, respectivamente, para um nível de significância de $p < 0.05$.

As análises mostraram ausência de efeitos significativos em relação aos *tratamentos* ($p < 0,05$) e tendência de efeito em relação aos *períodos* ($p = 0,08$).

Em relação às *tentativas* do *treino* (Fugas 1, 2 e 3), a taxa de falha na Fuga 2 (2ª tentativa) foi aproximadamente 0,7 vezes a taxa de falha na Fuga 1 (1ª tentativa) ($p = 0,03$). Ou seja, o

tempo de permanência no braço aberto durante a Fuga 2 (2ª tentativa) foi maior comparado ao desempenho na Fuga 1. As ratas também demoraram mais tempo para fugir do estímulo aversivo (braço aberto) na Fuga 3 (3ª tentativa) em relação ao desempenho na Fuga 1 (1ª tentativa), sendo a taxa de falha 0,64 vezes a taxa na Fuga 1 ($p = 0,001$).

O desempenho no *teste (memória)* nas tarefas de fuga foi avaliado comparando o desempenho na Fuga 4 com o desempenho na Fuga 3. Assim, os resultados das análises mostraram que o tempo de permanência no braço aberto durante a Fuga 4 foi menor em relação ao tempo durante a Fuga 3, sendo que a taxa de falha da Fuga 4 foi aproximadamente 1,5 vezes a taxa de falha da Fuga 3 ($p = 0,004$).

A Figura 20, painéis A, B, C e D, apresenta as Taxas de Falhas para os fatores avaliados nas tarefas de fuga: tratamentos, períodos, tentativas do teste (aprendizado) e tentativas do treino (memória), respectivamente.

Fuga

(Aprendizado e Memória)

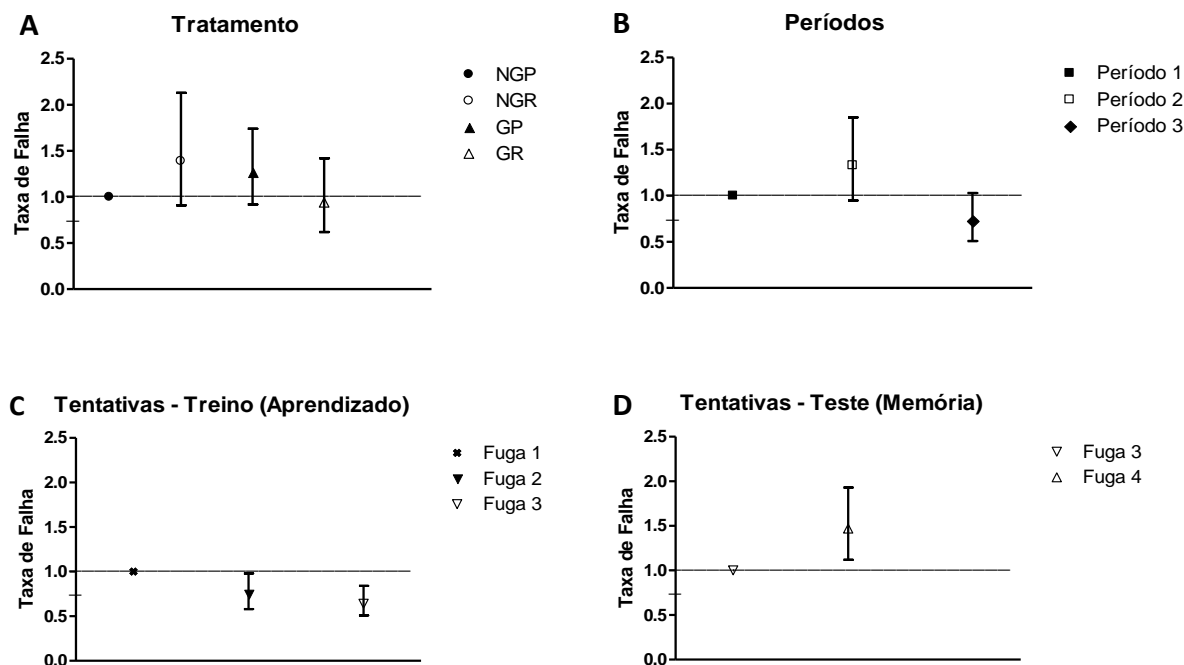


Figura 20: Dados do desempenho dos animais no **TREINO** (Aprendizado, painéis A, B e C) E **TESTE** (Memória, painel D) NA **TAREFA DE FUGA** expressos como Taxa de Falha em relação ao respectivo fator de referência, com Taxa de Falha igual a 1. Barras verticais indicam as maiores e menores Taxas de Falhas. Nos painéis A, B, C e D estão apresentados as Taxas de Falhas quando se considera os efeitos dos tratamentos, períodos e tentativas, com relação às respectivas referências [(i) NGP, (ii) Período 1 e (iii) Fuga 1 (treino) ou Fuga 3 (teste) foram utilizadas como referências para (i) tratamentos, (ii) períodos e (iii) tentativas (Fugas 2 e 3: treino; Fuga 4: teste), respectivamente]. NGP= Não Gestante Padrão; NGR = Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita.

Com a finalidade de se ter uma descrição do comportamento dos animais dos diferentes grupos, com relação ao desempenho na tarefa de fuga, esses dados estão sendo apresentados na Figura 21. Nessa figura pode-se observar os dados referentes ao desempenho dos animais (n=72) no *treino* (aprendizado) (Fugas 1, 2 e 3) e *teste* (memória) (Fuga 4).

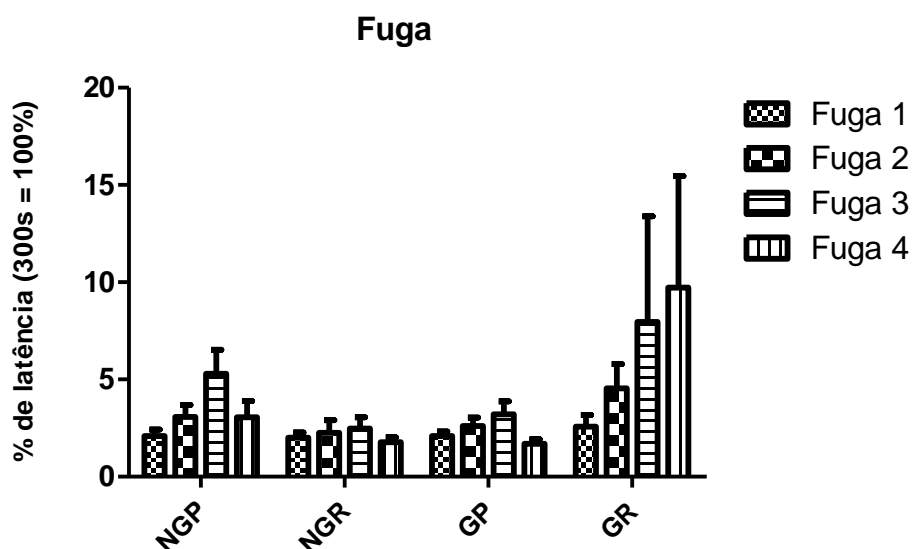


Figura 21: Dados do **DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO TREINO (Aprendizagem) e TESTE (Memória) NA TAREFA DE FUGA no labirinto em T-elevado**, expressos como média \pm erro padrão da porcentagem de latência em cada tentativa, por grupo. Porcentagem de Latência equivale ao tempo (segundos) de permanência no braço aberto do labirinto, sendo que 300 segundos = 100% de latência. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR = Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita. Os dados referentes ao desempenho dos animais (latências) estão apresentados nas tabelas 27, 28, 29 e 30 na sessão “Anexos”.

3. Estudos Bioquímicos

3.1. Determinações dos níveis de tiamina e suas formas fosforiladas (Lu & Frank, 2008)

3.1.1. Avaliações da precisão e exatidão do método utilizado para processamento das amostras e ensaio cromatográfico

Conforme descrito na sessão de métodos as concentrações de tiamina e seus derivados foram determinadas em um sistema isocrático de HPLC usando uma pré-derivatização com ferricianeto de potássio. Os experimentos foram realizados com amostras de hipocampo de ratos Wistar machos.

As determinações das concentrações de tiamina e seus derivados em soluções padrões e em amostras biológicas foram feitas através do cálculo da área do pico correspondente a cada um desses compostos identificados nos cromatogramas. Os tempos médios de eluição de TDP, TMP e B1 foram 3,82, 4,28 e 11,67 min, respectivamente. Assim, cada ensaio cromatográfico, para tiamina e seus derivados, foi executado em menos de 15 min.

Curvas de calibração obtidas a partir das soluções-padrões de B1 (10, 50, 80, 100, 150 ng/ml), de TMP (10, 50, 100, 175, 250 ng/ml) e de TDP (100, 325, 550, 775, 1000 ng/ml) são mostradas na Figura 22, painéis A, B e C, respectivamente. A linearidade foi determinada usando-se Análise de Regressão. Cada ponto, em cada uma das curvas, representa a média de determinações em triplicata. A análise de regressão mostrou um coeficiente de correlação não inferior a 0,990. Os padrões utilizados estão na faixa de linearidade para a quantificação da B1, TMP e TDP em amostras de tecido cerebral e sangue.

Curvas de calibração

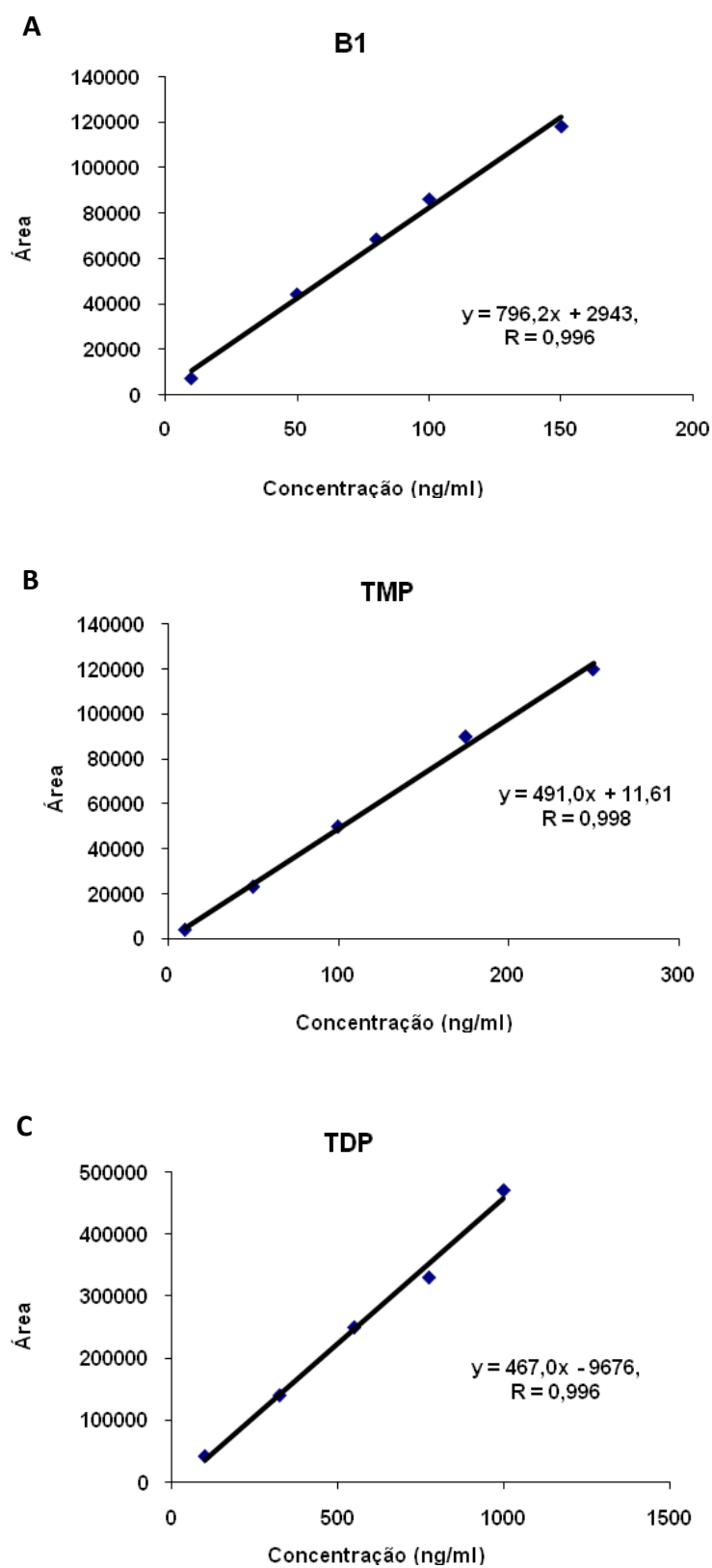


Figura 22: CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS. Nos painéis A, B e C estão representadas as curvas lineares para as concentrações de B1, TMP e TDP, respectivamente. B1= tiamina, TMP = tiamina monofosfato e TDP= tiamina difosfato.

A *variabilidade experimental* das análises é apresentada na Tabela 6. A reprodutibilidade intradia foi calculada a partir dos dados de 10 ensaios consecutivos de amostras do hipocampo, produzindo desvios padrões relativos (DPR) de 7,43%, 4,50% e 2,66 % para B1, TMP e TDP, respectivamente. Reprodutibilidade interdias foi obtida pela comparação entre as médias destas réplicas ao longo de dois dias consecutivos, obtendo-se os seguintes valores de DPR: 25,87%, 25,39% e 37,54 % para B1, TMP e TDP, respectivamente.

	Desvio padrão relativo (%)	
	Intradia	Interdia
B1	7.43	25.87
TMP	4.50	25.39
TDP	2.66	37.54

Tabela 6: REPRODUTIBILIDADE INTRADIA E INTERDIA PARA AS DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE B1, TMP E TDP em amostras de hipocampo.

A Figura 23, painéis A, B e C apresenta os dados referentes à estabilidade dos compostos derivatizados à temperatura ambiente, após a derivatização das amostras de hipocampo com ferricianeto de potássio, para determinações de B1, TMP e TDP. O tempo de *estabilidade do derivatizado com ferricianeto de potássio* foi inferior a 30 minutos. Foi verificado que quando as amostras foram homogeneizada, mas não derivatizada, essas se mantiveram estável durante 30 dias, quando armazenadas a -80 °C.

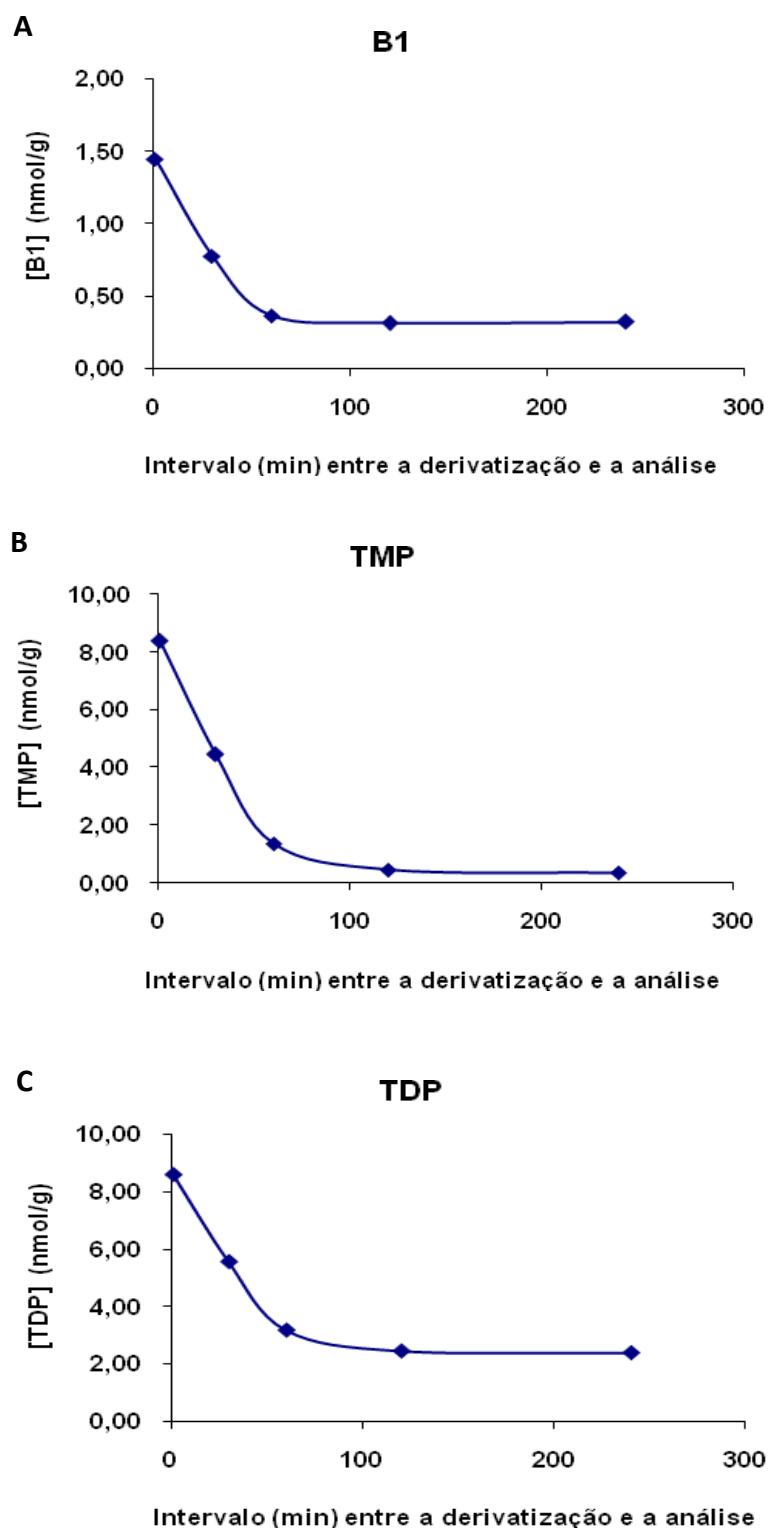
Estabilidade da Tiamina e seus derivados

Figura 23: ESTABILIDADE DA TIAMINA E SEUS DERIVADOS APÓS DERIVATIZAÇÃO COM FERRICIANETO DE POTÁSSIO. Nos painéis A, B e C estão representadas as concentrações de B1, TMP e TDP presentes em amostras de hipocampo como uma função do tempo entre a reação com ferricianeto de potássio e o momento da análise no HPLC.

Para avaliar a *recuperação* da B1, TMP e TDP, uma mistura destes compostos foi adicionada a uma amostra do hipocampo no momento da homogeneização, nas concentrações finais de 20, 40, 60, 80 e 100 ng/ml de B1, 25, 73, 125, 175 e 250 ng/ml de TMP e 100, 250, 400, 550 e 700 ng/ml de TDP. A Tabela 7 mostra que a recuperação obtida a partir da tiamina e seus derivados foi entre 90,98% e 104,55%.

Concentração adicionada (ng/mL)			Concentração encontrada (ng/mL)			% Recuperação		
B1	TMP	TDP	B1	TMP	TDP	B1	TMP	TDP
0	0	0	1,03	17,63	167,25	-	-	-
20	25	100	21,17	40,38	271,80	100,67	90,98	104,55
40	75	250	38,18	87,52	417,76	92,86	93,18	100,20
60	125	400	59,92	135,03	579,19	98,14	93,92	102,99
80	175	550	82,34	188,39	721,90	101,63	97,57	100,85
100	250	700	97,34	279,00	867,14	96,30	104,55	99,99

Tabela 7: RECUPERAÇÃO DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS DAS AMOSTRAS DE HIPOCAMPO. Concentrações adicionadas em amostras de hipocampo: [B1]: 20 a 100 ng/mL, [TMP]: 25 a 250 ng/mL, [TDP]: 100 a 700 ng/mL.

3.1.2. Determinações das concentrações de Tiamina e seus derivados nas amostras de sangue, hipocampo e tálamo obtidas das ratas dos quatro grupos experimentais

As concentrações de tiamina [B1]=[vitamina B1] e suas formas fosforiladas [TMP] ou [TDP] foram expressas em nmol/L de sangue ou nmol/g de tecido (hipocampo ou tálamo). Conforme detalhado abaixo, os tratamentos - restrição de tiamina, gestação - períodos e interações entre gestação e restrição, e entre gestação, restrição e períodos tiveram diferentes efeitos sobre as concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras biológicas estudadas.

SANGUE

Na Figura 24, painéis A, B e C, são apresentadas as médias das concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de sangue obtidas dos animais dos quatro grupos experimentais. A Tabela 8 apresenta os valores de *p* obtidos pela análise de variância (ANOVA) 2x2x3 (gestação, restrição e períodos).

ANOVA 2x2x3 mostrou: efeito significativo da gestação sobre o nível de B1 [$F_{(1,55)} = 9,57$; $p = 0,003$] e da restrição de tiamina sobre os níveis de B1 [$F_{(1,55)} = 18,70$; $p = 0,000$] e TDP [$F_{(1,59)} = 27,03$; $p = 0,000$]. Efeito dos períodos sobre todas as formas de tiamina: B1 [$F_{(2,55)} = 23,33$; $p = 0,000$], TMP [$F_{(2,54)} = 24,12$; $p = 0,000$] e TDP [$F_{(2,59)} = 5,97$; $p = 0,004$]. Tendência de interação significativa entre restrição, gestação e períodos sobre os níveis de TDP [$F_{(2,59)} = 2,80$; $p = 0,069$]. Não foram observadas interações significativas entre gestação x períodos, gestação x restrição e restrição x períodos ($p > 0,05$) para nenhuma das formas de tiamina.

Concentrações de tiamina e seus derivados – amostras: Sangue

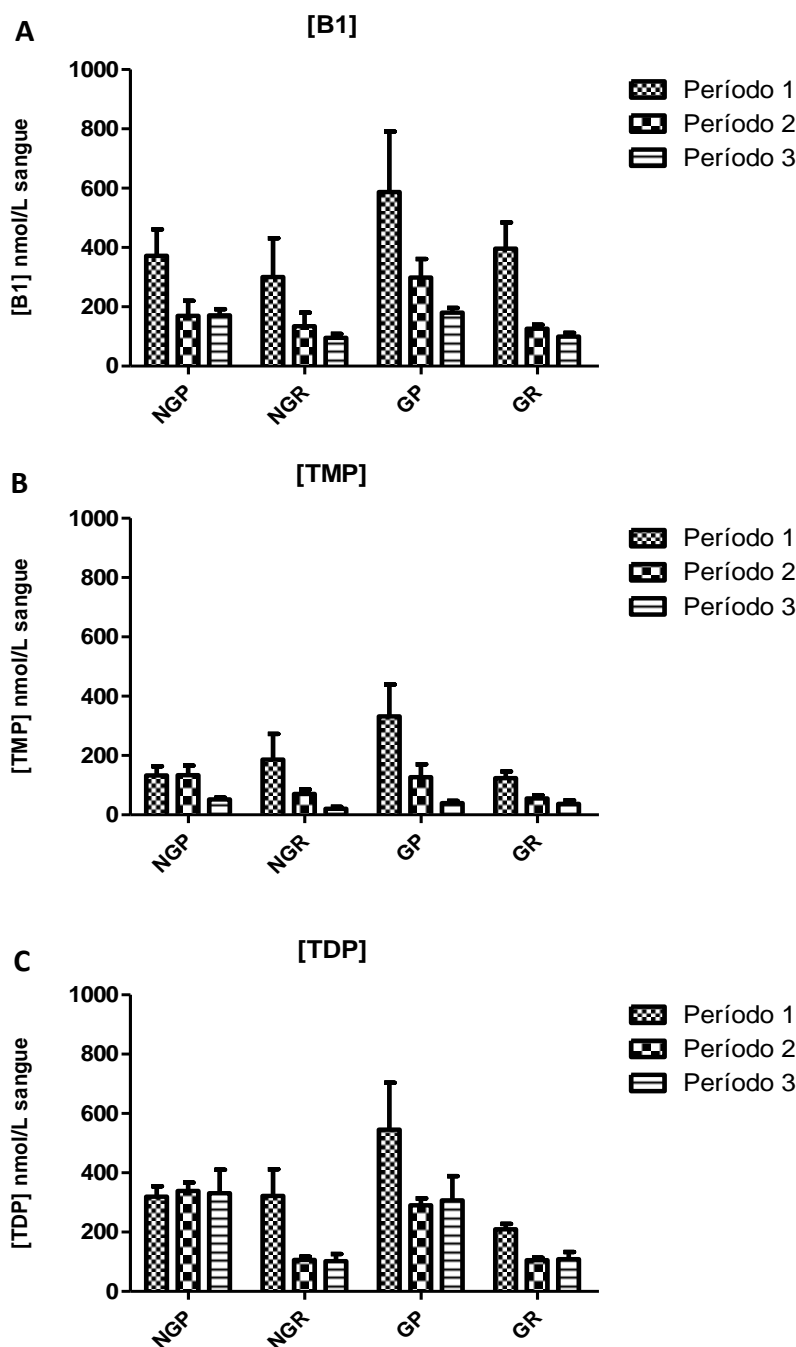


Figura 24: Média \pm erro padrão das **CONCENTRAÇÕES DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS NAS AMOSTRAS DE SANGUE**. Nos painéis A, B e C estão representadas as concentrações de B1 ($n=67$), TMP ($n=66$), TDP ($n=71$) em cada período: período 1= 1ª semana; período 2= 1ª e 2ª semanas e período 3= 1ª, 2ª e 3ª semanas. Algumas determinações de B1, TMP e TDP foram perdidas: 5, 6 e 1, respectivamente. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita. As concentrações médias de B1, TMP e TDP presentes nas amostras de sangue dos 4 grupos estudados estão apresentadas na sessão “Anexos”, na tabela 31.

ANOVA 2x2x3 (gestação, restrição, períodos)			
Tratamentos	Valores de p		
	B1 (n=67)	TMP (n=66)	TDP (n=71)
Gestação	0,003	0,395	0,842
Restrição	0,000	0,138	0,000
Períodos	0,000	0,000	0,004
Gestação * Restrição	0,774	0,131	0,257
Gestação * Períodos	0,954	0,561	0,647
Restrição * Períodos	0,159	0,828	0,857
Gestação * Restrição * Períodos	0,172	0,135	0,069

Tabela 8: Dados das Análises de Variância: Efeitos dos tratamentos sobre as **CONCENTRAÇÕES DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS FOSFORILADOS EM AMOSTRAS DE SANGUE** dos animais dos quatro grupos experimentais nos três períodos. Durante o processamento das amostras foram perdidas 5, 6 e 1 determinações referentes às concentrações de B1, TMP e TDP, respectivamente.

HIPOCAMPO

Na Figura 25, painéis A, B e C, estão representadas as médias das concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de hipocampo dos animais dos quatro grupos experimentais. A Tabela 9 apresenta os valores de p obtidos pela análise de variância (ANOVA) 2x2x3 (gestação, restrição e períodos).

As análises de variância (ANOVA) 2x2x3, mostraram efeitos significativos dos tratamentos: restrição de tiamina sobre os níveis de TMP [$F_{(1,55)} = 4,6$; $p = 0,036$] e TDP [$F_{(1,70)} = 9,1$; $p = 0,004$]; períodos sobre todas as formas de tiamina: B1 [$F_{(2,37)} = 37,0$; $p = 0,000$], TMP [$F_{(2,55)} = 28,73$; $p = 0,000$] e TDP [$F_{(2,70)} = 40,6$; $p = 0,000$]; interações entre gestação e restrição sobre as concentrações de TDP [$F_{(2,70)} = 6,4$; $p = 0,013$] e entre restrição e períodos sobre os níveis de B1 [$F_{(2,37)} = 6,4$; $p = 0,004$]. Não foram observados efeitos significativos da gestação e nem interações significativas entre gestação x períodos e entre gestação x restrição x períodos sobre todas as concentrações de tiamina e derivados ($p > 0,05$).

Concentrações de tiamina e seus derivados – amostras: Hipocampo

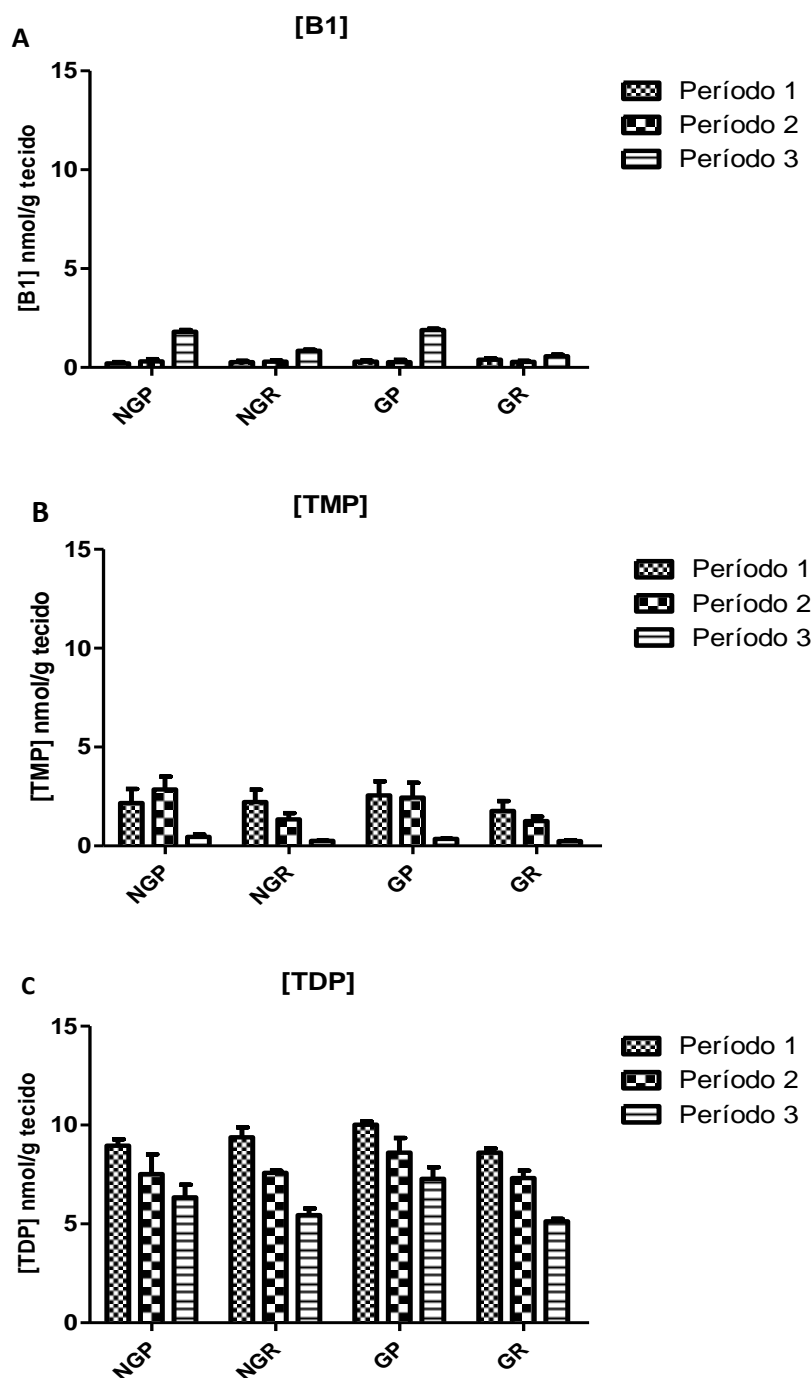


Figura 25: Média \pm erro padrão das **CONCENTRAÇÕES DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS NAS AMOSTRAS DE HIPOCAMPO**. Nos painéis A, B e C estão representadas as concentrações de B1 (n=49), TMP (n=67) e TDP (n=72) em cada período de experimento: período 1= 1ª semana; período 2= 1ª e 2ª semanas e período 3= 1ª, 2ª e 3ª semanas. Algumas determinações de B1 e TMP foram perdidas: 23 e 5, respectivamente. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita. As concentrações médias de B1, TMP e TDP presentes nas amostras de hipocampo dos 4 grupos estudados estão apresentadas na sessão “Anexos”, na tabela 31.

Os dados brutos encontram-se na sessão “Anexos”, na tabela 31.

ANOVA 2x2x3 (gestação, restrição, períodos)			
Tratamentos	Valores de <i>p</i>		
	B1 (n=49)	TMP (n=67)	TDP (n=72)
Gestação	0,771	0,652	0,327
Restrição	0,254	0,036	0,004
Períodos	0,000	0,000	0,000
Gestação * Restrição	0,257	0,762	0,013
Gestação * Períodos	0,215	0,908	0,931
Restrição * Períodos	0,004	0,679	0,287
Gestação * Restrição * Períodos	0,801	0,615	0,907

Tabela 9: Dados das Análises de Variância: Efeitos dos tratamentos sobre as **CONCENTRAÇÕES DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS FOSFORILADOS EM AMOSTRAS DE HIPOCAMPO** dos animais dos quatro grupos experimentais, dos três períodos. Durante o processamento das amostras foram perdidas 23 e 5 determinações referentes às concentrações de B1 e TMP, respectivamente.

TÁLAMO

As médias das concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de tálamo estão apresentadas na Figura 26, painéis A, B e C. A Tabela 10 apresenta os valores de *p* obtidos pela análise de variância (ANOVA) 2x2x3 (gestação, restrição e períodos).

ANOVA 2x2x3, mostrou efeitos significativos dos tratamentos: gestação sobre os níveis de B1 [$F_{(1,21)} = 9,2$; $p = 0,006$] e TMP [$F_{(1,48)} = 12,29$; $p = 0,001$]; restrição sobre os níveis de B1 [$F_{(1,21)} = 37,8$; $p = 0,000$] e TMP [$F_{(1,48)} = 25,67$; $p = 0,000$]; períodos sobre as concentrações de tiamina e suas formas fosforiladas: B1 [$F_{(2,21)} = 202,7$; $p = 0,000$], TMP [$F_{(2,48)} = 74,49$; $p = 0,000$] e TDP [$F_{(2,60)} = 12,1$; $p = 0,000$]. Interações significativas também foram observadas: restrição e gestação sobre os níveis de B1 [$F_{(1,21)} = 6,1$; $p = 0,022$], TMP [$F_{(2,48)} = 6,41$; $p = 0,015$] e TDP [$F_{(1,60)} = 3,7$; $p = 0,060$]; entre gestação e períodos sobre B1 [$F_{(1,21)} = 5,9$; $p = 0,009$] e TMP [$F_{(2,48)} = 8,12$; $p = 0,001$], entre restrição e períodos sobre B1

[F_(1,21) = 44,1; p = 0,000] e TMP [F_(2,48) = 12,13; p = 0,000], e interação entre os 3 fatores, gestação, restrição e períodos também sobre as concentrações de B1 [F_(1,21) = 4,8; p = 0,018] e TMP [F_(2,48) = 6,11; p = 0,004].

Concentração de tiamina e seus derivados – amostras: Tálamo

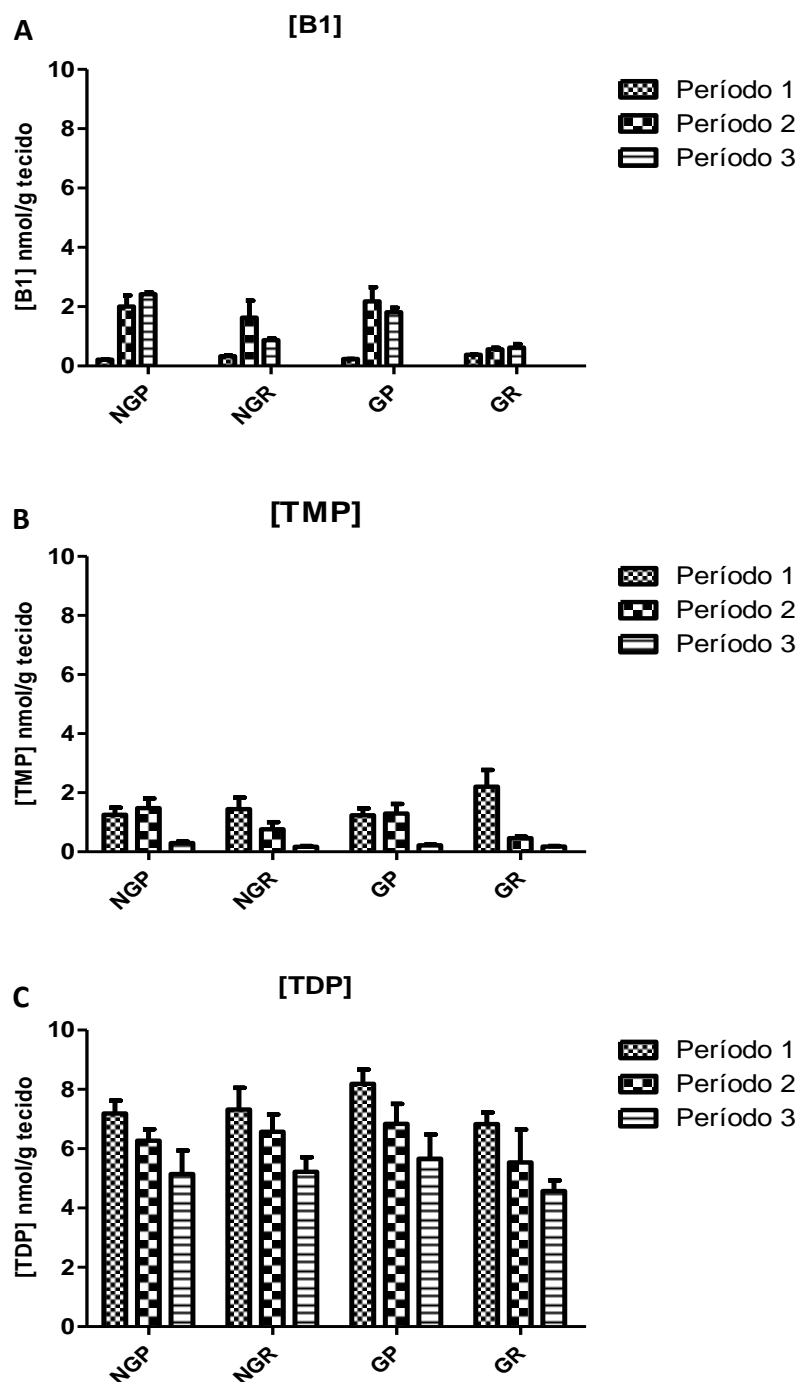


Figura 26: Média \pm erro padrão das **CONCENTRAÇÕES DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS NAS AMOSTRAS DE TÁLAMO**. Nos painéis A, B e C estão representadas as concentrações de B1 (n=33), TMP (n=60), TDP (n=72) dos animais dos quatro grupos experimentais. Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita em cada período. Durante o processamento das amostras foram perdidas 29 e 12 determinações referentes às concentrações de B1 e TMP respectivamente. As concentrações médias de B1, TMP e TDP presentes nas amostras de tálamo dos 4 grupos estudados estão apresentadas na sessão “Anexos”, na tabela 31.

ANOVA 2x2x3 (gestação, restrição, períodos)			
Tratamentos	Valores de p		
	B1 (n=33)	TMP (n=60)	TDP (n=72)
Gestação	0,006	0,001	0,967
Restrição	0,000	0,000	0,150
Períodos	0,000	0,000	0,000
Gestação * Restrição	0,022	0,015	0,060
Gestação * Períodos	0,009	0,001	0,861
Restrição * Períodos	0,000	0,000	0,990
Gestação * Restrição * Períodos	0,018	0,004	0,970

Tabela 10: Dados das Análises de Variância: Efeitos dos tratamentos sobre as **CONCENTRAÇÕES DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS FOSFORILADOS EM AMOSTRAS DE TÁLAMO** dos animais dos três períodos. Durante o processamento das amostras foram perdidas as quantidades de 29 e 12 determinações referentes às concentrações de B1, TMP respectivamente.

3.2. Determinações das concentrações de BDNF

As determinações de BDNF (*Brain derived neurothrophic factor*) foram realizadas através de imunoenaios ELISA e expressas em pg/ml de plasma ou pg/mg de tecido hipocampal.

PLASMA

O valor médio das concentrações de BDNF no plasma, para as ratas NGP (condição controle) foi aproximadamente 700 pg/ml.

ANOVA 2x2x3 (gestação, restrição e períodos) mostrou efeito significativo da gestação [$F_{(1,59)} = 3,76$; $p = 0,05$] e tendência a efeito significativo da restrição [$F_{(1,59)} = 3,57$; $p = 0,06$] e interação entre gestação e períodos [$F_{(2,59)} = 12,46$; $p = 0,000$]. Não foram observados efeitos significativos dos períodos e nem interações significativas entre gestação x restrição, restrição x períodos, gestação x restrição x períodos ($p > 0,05$). Esses dados estão apresentados na Figura 27. A Tabela 11 apresenta os valores de p obtidos na análise de variância.

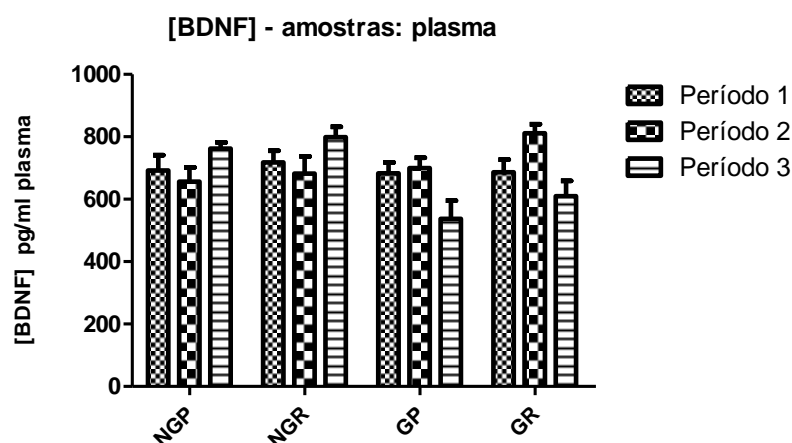


Figura 27: Média \pm erro padrão das **CONCENTRAÇÕES DE BDNF NAS AMOSTRAS DE PLASMA** dos animais dos 4 grupos em cada período (1, 2 e 3, $n=24$ cada) Grupos: NGP= Não Gestante Padrão ($n=17$); NGR= Não Gestante Restrita ($n=18$); GP= Gestante Padrão ($n=18$); GR= Gestante Restrita ($n=18$). Durante a obtenção do plasma, uma amostra de NGP foi perdida. As concentrações médias de BDNF presentes nas amostras de plasma dos 4 grupos estudados estão apresentadas na sessão “Anexos”, na tabela 32.

ANOVA 2x2x3 (gestação, restrição, períodos)	
Tratamentos	Valores de p
Gestação	0,050
Restrição	0,060
Períodos	0,498
Gestação * Restrição	0,492
Gestação * Períodos	0,000
Restrição * Períodos	0,646
Gestação * Restrição * Períodos	0,667

Tabela 11: Dados das Análises de Variância: Efeitos dos tratamentos sobre as **CONCENTRAÇÕES DE BDNF NAS AMOSTRAS DE PLASMA** dos animais dos quatro grupos experimentais, dos três períodos (período 1, $n=24$; período 2, $n=23$ e períodos 3, $n=24$).

HIPOCAMPO

O valor médio das concentrações de BDNF no hipocampo, para as ratas NGP (condição controle) foi aproximadamente 6 pg/mg de tecido.

ANOVA 2x2x3 (gestação, restrição e tempo=períodos) mostrou que não existe efeito significativo dos fatores analisados ($p > 0,05$). Esses dados estão apresentados na Figuras 28.

A Tabela 12 apresenta os valores de p obtidos pela ANOVA 2x2x3.

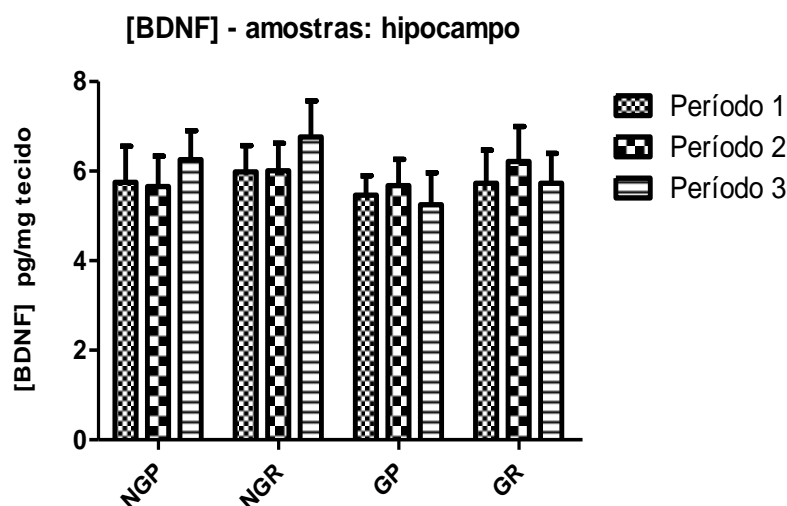


Figura 28: Média \pm erro padrão das **CONCENTRAÇÕES DE BDNF NAS AMOSTRAS DE HIPOCAMPO** dos animais dos 4 grupos em cada período (1, 2 e 3, $n= 24$ cada). NGP=Não Gestante Padrão ($n=18$); NGR=Não Gestante Restrita ($n=18$); GP=Gestante Padrão ($n=18$) e GR=Gestante Restrita ($n=18$). As concentrações médias de BDNF presentes nas amostras de hipocampo dos 4 grupos estudados estão apresentadas na sessão “Anexos”, na tabela 32.

ANOVA 2x2x3 (gestação, restrição, períodos)	
Tratamentos	Valores de p
Gestação	0,323
Restrição	0,317
Períodos	0,855
Gestação * Restrição	0,934
Gestação * Períodos	0,489
Restrição * Períodos	0,964
Gestação * Restrição * Períodos	0,993

Tabela 12: Dados das Análises de Variância: Efeitos dos tratamentos sobre as **CONCENTRAÇÕES DE BDNF NAS AMOSTRAS DE HIPOCAMPO** dos animais dos 4 grupos em cada período (1, 2 e 3, $n= 24$ cada).

4. Estudos de Correlação

Análises de Regressão Linear foram realizadas para avaliar a existência de possíveis correlações significativas entre os diversos parâmetros determinados. Os dados obtidos nos testes de *Esquiva Inibitória e Fuga (LTE)*, por envolverem valores definidos com “censura” – valor temporal limite para a análise do comportamento – não foram utilizados nas análises de regressão.

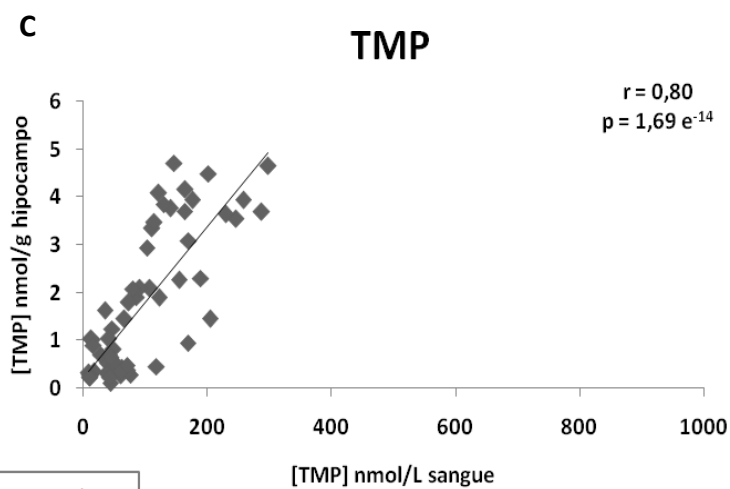
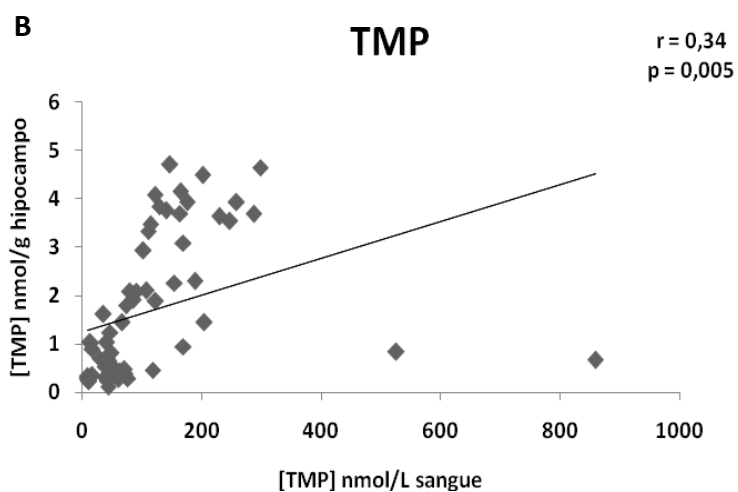
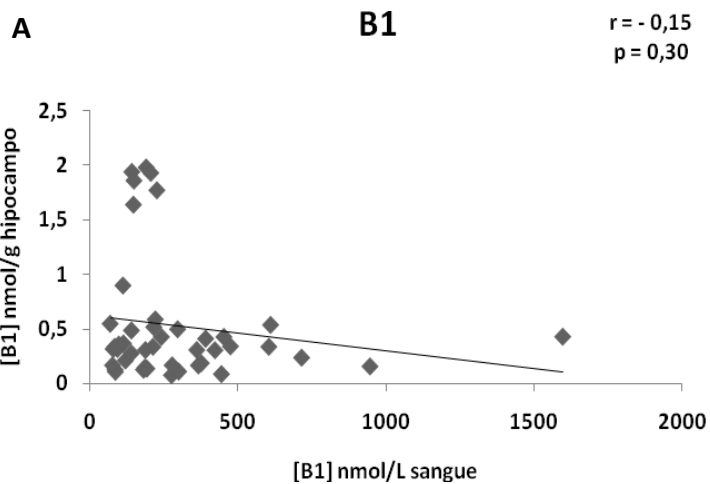
Foram avaliadas as existências de relações entre as concentrações de tiamina nas amostras cerebrais *versus* as concentrações de tiamina nas amostras periféricas e entre as concentrações de BDNF nas amostras hipocâmpais *versus* as concentrações de BDNF nas amostras plasmáticas. Os dados das análises de regressão linear encontram-se sumarizados na sessão Anexo (Tabela 33).

4.1. Concentrações de tiamina e seus derivados

Entre as amostras de tecido do SNC e periféricas, hipocampo e sangue, foram verificadas correlações significativas para as concentrações de TMP (com *outlier*) [$r = 0,34$; $p = 0,005$] e TMP (sem *outlier*) [$r = 0,80$; $p = 1,69 \times 10^{-14}$]. Não houve correlação significativa para os demais fatores B1 [$r = 0,15$; $p = 0,30$] e TDP [$r = 0,13$; $p = 0,29$]. Esses dados estão representados na Figura 29, painéis A, B, C e D. Painel A: [B1]; painel B: [TMP]; painel C: [TMP] sem *outlier*; painel D: [TDP].

Concentrações de tiamina e seus derivados – amostras:

Hipocampo x Sangue



Sem outlier

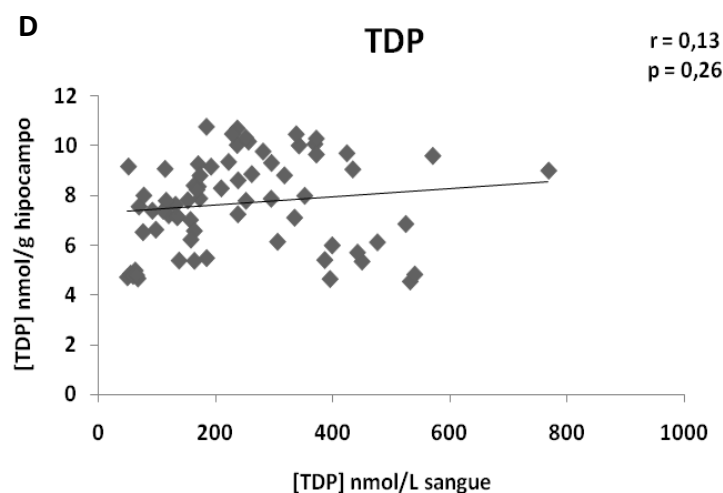
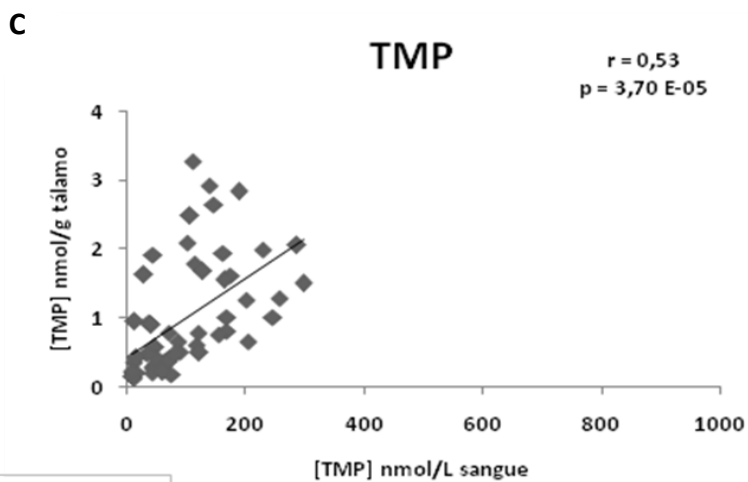
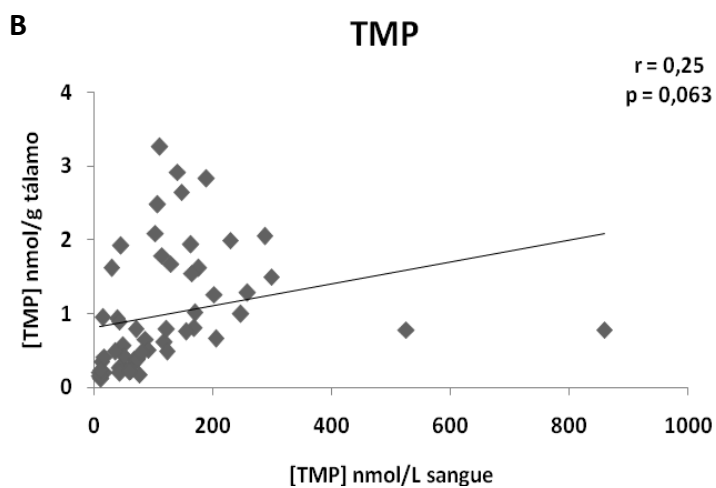
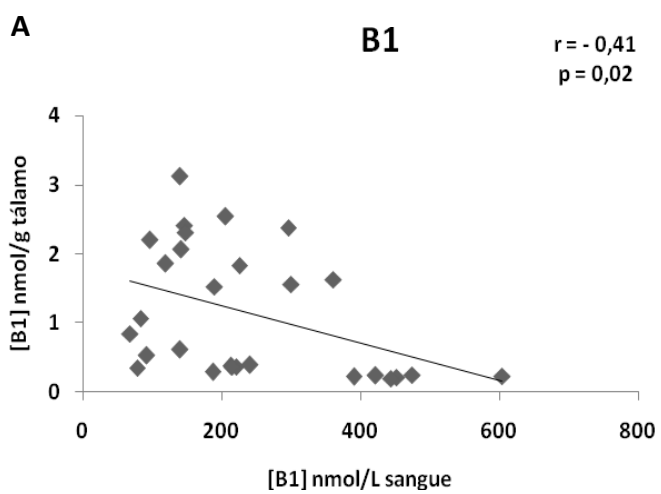


Figura 29: Gráficos de Dispersão, mostrando as correlações entre as concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de HIPOCAMPO e SANGUE. As análises foram realizadas usando os dados das concentrações de B1, TMP e TDP nas amostras de hipocampo (nmol/g) e no sangue (nmol/L). Nos painéis A, B, C e D estão representadas as concentrações de B1 (n=44), TMP (n=62), TMP (sem outlier) (n=60) e TDP (n=70) respectivamente. Os dados das análises de regressão linear encontram-se sumarizados na sessão Anexo, na Tabela 33.

Em relação às concentrações desses compostos nas amostras de tálamo e sangue, foram verificadas correlações significativas nas concentrações de tiamina e seus derivados: B1 [$r = 0,41$; $p = 0,02$], TMP [$r = 0,24$; $p = 0,06$], TDP [$r = 0,41$; $p = 0,0003$]. Refazendo as análises das concentrações de TMP sem os dois *outliers* presentes, os resultados deixaram de ser uma tendência e sim uma correlação significativa: TMP [$r = 0,53$; $p = 3,70 \times 10^{-5}$]. Esses dados estão representados na Figura 30, painéis A, B, C e D. Painel A: [B1]; painel B: [TMP]; painel C: [TMP] sem *outlier*; painel D: [TDP].

Concentrações de tiamina e seus derivados – amostras:

Tálamo x Sangue



Sem outlier

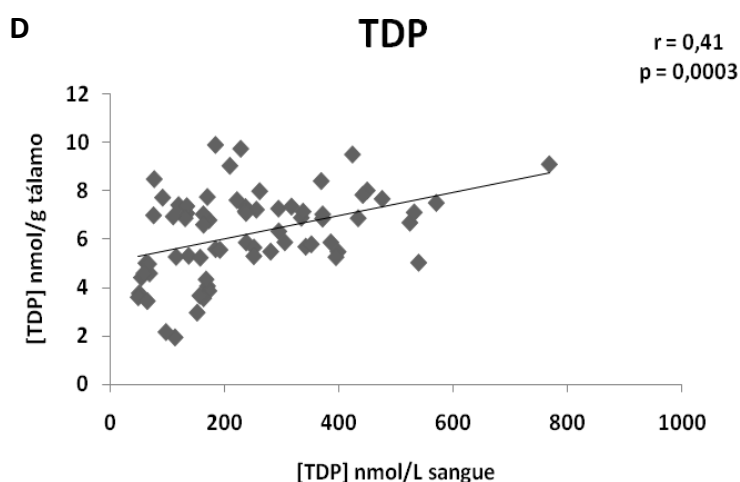


Figura 30: Gráficos de Dispersão, mostrando as correlações entre as concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de TÁLAMO e SANGUE. As análises foram realizadas usando os dados das concentrações de B1, TMP e TDP nas amostras de tálamo (nmol/g) e sangue (nmol/L). Nos painéis A, B, C e D estão representadas as concentrações de B1 ($n=28$), TMP ($n=56$), TMP (sem outlier) ($n=54$) e TDP ($n=70$) respectivamente. Os dados das análises de regressão linear encontram-se sumarizados na sessão Anexo, na Tabela 33.

Através das análises de regressão entre as concentrações desses compostos nas amostras do SNC (tálamo e hipocampo), foram verificadas as seguintes correlações significativas: concentrações de B1 [$r = 0,53$; $p = 0,001$], TMP [$r = 0,52$; $p = 1,85 \times 10^{-5}$] e TDP [$r = 0,40$; $p = 0,0004$]. Esses dados estão representados na Figura 31, painéis A, B e C, sendo Painel A: [B1]; painel B: [TMP]; painel C: [TDP].

Concentrações de tiamina e seus derivados – amostras:

Tálamo x Hipocampo

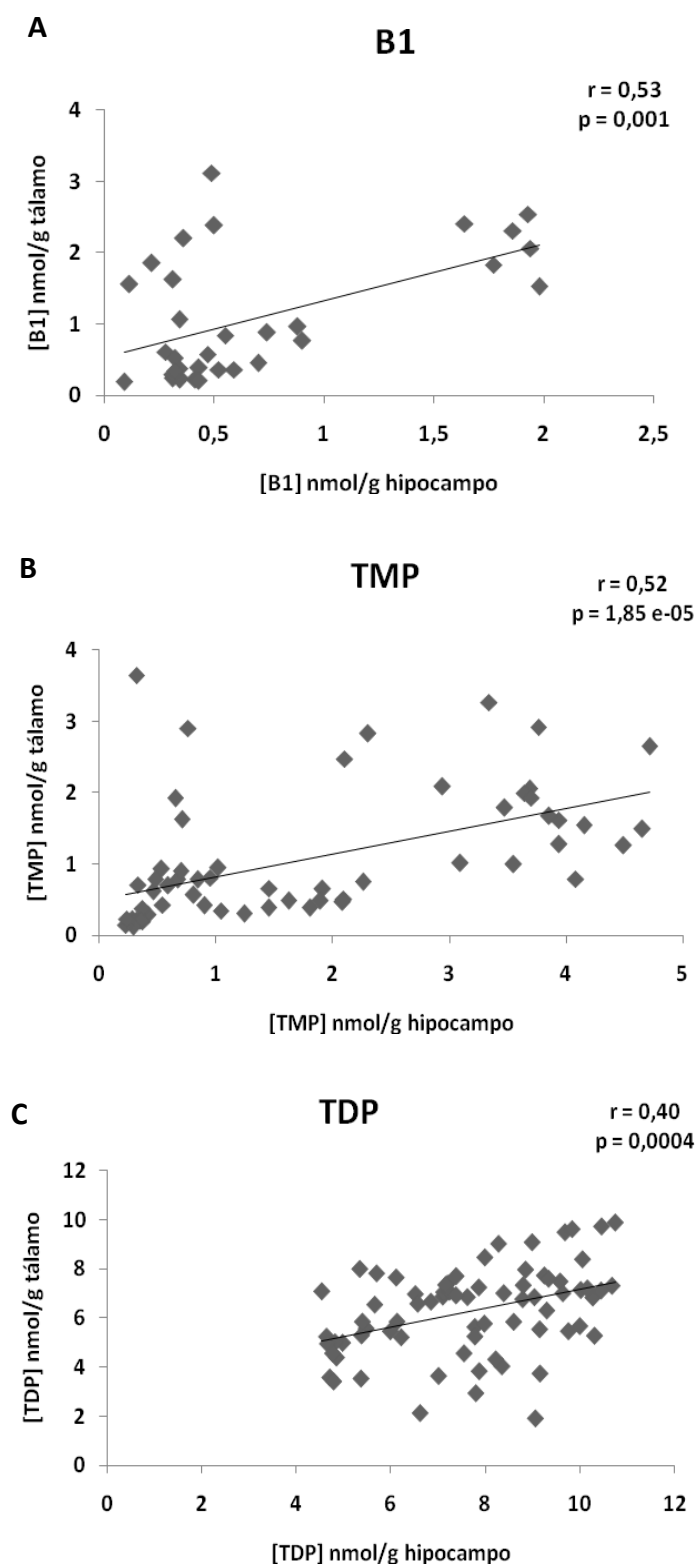


Figura 31: Gráficos de Dispersão, mostrando as correlações entre as concentrações de tiamina e seus derivados nas amostras de TÁLAMO e HIPOCAMPO. As análises foram realizadas usando os dados das concentrações de B1, TMP e TDP nas amostras de tálamo (nmol/g) e hipocampo (nmol/g). Nos painéis A, B e C estão representadas as concentrações de B1 ($n=33$), TMP ($n=60$) e TDP ($n=72$) respectivamente. Os dados das análises de regressão linear encontram-se sumarizados na sessão Anexo, na Tabela 33.

4.2. Concentrações de BDNF

A análise de regressão entre os níveis de BDNF no plasma e hipocampo indicou a existência de correlação significativa [$r = 0,54$; $p = 9,81 \times 10^{-7}$]. Esses dados estão representados na Figura 32.

Concentrações de BDNF – amostras: Plasma x Hipocampo

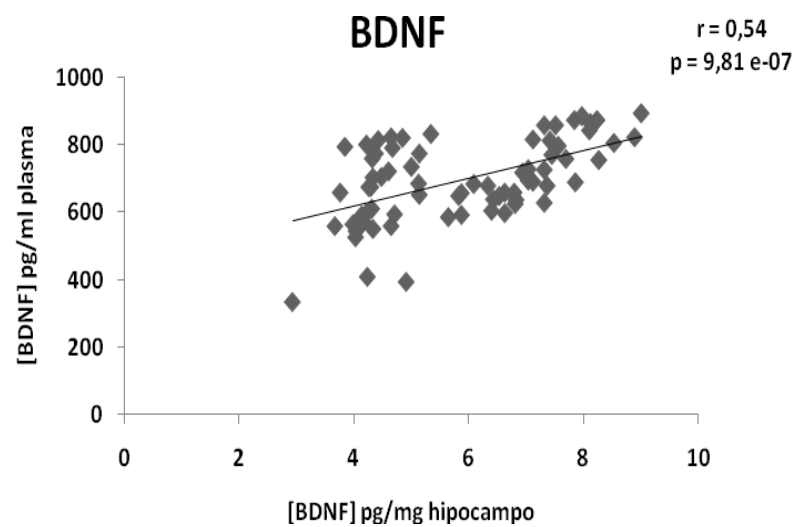


Figura 32: Gráfico de Dispersão, mostrando a correlação entre as concentrações de BDNF no PLASMA e no HIPOCAMPO. A análise foi realizada usando os dados das [BDNF] no plasma (pg/ml) e no hipocampo (pg/mg), $n=71$. Os dados das análises de regressão linear encontram-se sumarizados na sessão Anexo, na Tabela 33.

No presente estudo foram avaliados os efeitos **da gestação, da dieta restrita em tiamina e/ou tempo de tratamento (períodos)** sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos. Os dados obtidos indicam que **a gestação, a dieta restrita em tiamina e/ou o tempo de gestação e de restrição (períodos)** afetam os animais quanto: (a) à variação do peso corporal das mães e dos fetos, ao consumo de ração e água; (b) aos níveis de tiamina e seus derivados fosforilados, no sangue e em regiões específicas do sistema nervoso central; (c) aos níveis de BDNF no plasma. Os dados obtidos no presente estudo de caracterização do modelo de deficiência maternal de tiamina são mostrados pela primeira vez na literatura e representam um passo inicial no conhecimento de um modelo que pode ser usado como um importante instrumento para o estudo dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas relações entre carência dessa vitamina, gestação e desenvolvimento da prole em termos de aspectos comportamentais e cognitivos.

Modelo Experimental

Poucos grupos de pesquisa têm utilizado o modelo de deficiência maternal de tiamina e os que o fazem tem focado a atenção nos estudos sobre as consequências da deficiência na prole. Nessa direção, outros autores (Ramakrishnan et al, 1999; Bâ et al., 1999; Bâ et al., 2005) e o nosso grupo (Ferreira-Vieira, 2010; Freitas-Silva et al., 2010; Oliveira et al., 2007) mostraram que o modelo experimental de deficiência maternal de tiamina é um importante instrumento para se estudar as implicações em termos neurobiológicos e comportamentais para a prole de gestantes que passaram pela deficiência em diferentes fases do período gestacional e/ou de amamentação, como períodos pré-natal e/ou peri-natal e/ou pós-natal. No entanto, até o presente momento, existem poucos dados da literatura – encontramos apenas um estudo

publicado em 1965 (Brown & Snodgrass, 1965) – sobre os efeitos da associação entre gestação e deficiência de tiamina, com enfoque nas consequências para a própria gestante.

No presente estudo, as primeiras avaliações realizadas nas gestantes foram aferições do peso corporal e o consumo de ração e água. Observamos um progressivo ganho de peso das ratas gestantes (GP e GR) que, comparado com as ratas não gestantes, se torna significativo na 3ª semana de gestação, a partir do 13º-15º dias. Nessa fase uma maior demanda de energia é imprescindível para atender o desenvolvimento dos fetos, o que se confirma com um maior consumo de ração e de água a partir da 2ª semana de gestação. No entanto, no caso das ratas gestantes submetidas a uma dieta restrita em tiamina, o consumo de ração no final da 3ª semana diminuiu. Ou seja, no final do episódio de restrição os efeitos da falta da tiamina se refletem no peso das gestantes que, comparadas tanto com as gestantes do grupo GP quanto com as não gestantes, perdem peso de forma significativa nos últimos dias da gestação. As variações no consumo de ração e de água, ao longo do experimento, se refletem na variação do peso corporal. Estudos mostram que em várias espécies, os consumos de água e de sólidos estão positivamente correlacionados (Fitzsimons & Le Magnen, 1969; Kissileff, 1969; Rashotte et al., 1984; Bigelow & Houpt, 1988; Rossi & Scharrer, 1992; Langhans et al., 1995). No entanto, na condição de restrição essa relação direta e positiva entre consumo de ração e água é perdida. Na 3ª semana, as gestantes restritas, mesmo consumindo menos ração, ingeriram um volume médio de água relativamente maior. Provavelmente, as disfunções no metabolismo de carboidratos induzidas pela falta da tiamina levam a uma polidipsia. Existem evidências de que pacientes com Síndrome de Wernicke apresentam sintomas de polidipsia (Bosch et al., 1979).

A variação do peso e os consumos de ração e água oscilaram ao longo dos dias dos 3 períodos, ou seja, tanto na 1ª quanto na 2ª e 3ª semanas de gestação ocorreram variações significativas nesses parâmetros ao longo do tempo. Por outro lado, apenas uma tendência de interação entre restrição e tempo foi verificada na 3ª semana. Como foi observado efeito das semanas nos Períodos 2 e 3, conclui-se que o perfil de variação dessas oscilações não foi similar nessas três semanas. A variação de peso entre o 1º e último dia de cada período, teve efeito da gestação nos três períodos e efeito da restrição e interação significativa entre gestação e restrição no período 3, onde na 3ª semana as ratas GP tiveram uma variação de peso maior – ganho - em relação aos outros grupos. Em outras palavras, tanto a gestação quanto a restrição afetam o peso das ratas ao longo do tempo, sendo que, além desses efeitos dependerem do tempo, o efeito da gestação é diferente quando as ratas estão em dieta deficiente de tiamina. Esses dados estão de acordo com Brown & Snodgrass (1965), que utilizando um modelo experimental similar ao do presente estudo, verificaram que o ganho de peso e o consumo de ração, durante a gestação, são influenciados pela dieta deficiente de tiamina, sendo a variação semanal semelhante ao observado aqui. Brown & Snodgrass (1965) mostraram que a quantidade de tiamina consumida no período pré-gestacional interfere no ganho de peso das gestantes, principalmente na 3ª semana de gestação.

Dados obtidos em estudos realizados pelo nosso grupo (Carvalho et al., 2006; Pires et al., 2005, 2007; Vigil et al., 2010) e por outros autores (Mosseau et al., 1996; Ciccia & Langlais, 2000) utilizando modelos com dieta deficiente de tiamina associada ou não a pirritiamina, um inibidor da enzima que transforma a tiamina na sua forma fosforilada, mostraram uma diminuição no ganho de peso ao longo do episódio de deficiência. Esses dados podem parecer contraditórios, quando comparados aos obtidos no presente estudo, mas essa aparente contradição pode ser explicada pelas diferenças no modelo experimental de deficiência. No

presente estudo a deficiência foi parcial – 90% de deficiência com relação ao controle - e de curta duração e nos trabalhos mencionados a dieta foi 100% deficiente de tiamina associada a injeções de pirritiamina e, além disto, com uma duração de aproximadamente 2 semanas (Pires et al., 2005; Andrade et al., 2011) ou uma deficiência exclusivamente na dieta com duração de aproximadamente 4,5 semanas (Ciccia & Langlais, 2000) chegando a 7 semana de deficiência (Pereira-Caixeta, 2011) até o aparecimento de sinais neurológicos, como convulsões e/ou perda de reflexo de endireitamento.

O efeito da restrição maternal de tiamina sobre o desenvolvimento dos fetos foi observado através da diminuição significativa nos pesos dos fetos, detectada nos Períodos 2 e 3. No período 1, devido às limitações práticas, não foi possível pesar os fetos. Nos dois períodos analisados, observou-se uma diferença significativa entre os pesos dos fetos provenientes de gestantes padrão e gestantes restritas, sendo que o efeito do tempo de restrição, como esperado, é mais pronunciado na 3ª semana. Esse efeito está coerente com o efeito da restrição também mais pronunciado sobre o peso das gestantes na 3ª semana. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Brown & Snodgrass (1965). A restrição não afetou o número médio de fetos. No entanto, vale destacar que aproximadamente 40% das mães restritas geraram um número de fetos abaixo da média do grupo GP. Esses dados indicam que entre as gestantes existem diferenças - maior ou menor - na susceptibilidade aos efeitos da deficiência e isto pode refletir no desenvolvimento fetal.

Alterações Comportamentais

Nas tarefas de *Esquiva Inibitória* não foram observados efeitos significativos em relação aos tratamentos (grupos) e períodos ($p < 0,05$), quando utilizamos o Modelo de Cox para avaliar o

desempenho durante o aprendizado. Observamos que a latência na linha de base foi menor que a latência na esquiua 1 (taxa de falha de 0,71 vezes taxa de falha na linha de base) e na esquiua 2 (taxa de falha de 0,32 vezes a taxa de falha da linha de base), confirmando que os animais dos quatro grupos foram capazes de aprender a tarefa, ou seja, adquirir a resposta de esquiua. O perfil da aquisição da resposta de esquiua obtida no presente estudo, com base na aversão aos estímulos aversivos, está de acordo com os dados apresentados por Zangrossi e Graeff (1997). Resultados semelhantes em fêmeas provenientes de mães desnutridas e/ou controles foram mostrados por Almeida et al. (1996), os quais sugerem que altas latências nas esquivas 2 e 3 podem ocorrer devido a uma relativa segurança no braço fechado, após os ratos passarem pela experiência (linha de base e esquiua 1).

No teste de memória da esquiua inibitória, observamos que a latência na esquiua 3 foi menor que a latência na esquiua 2 (taxa de falha da esquiua 3 de 1,5 vezes a taxa de falha na esquiua 2), ou seja, a informação aprendida durante o treino foi apenas parcialmente recuperada após 72 horas. Uma análise descritiva do desempenho dos animais dos quatro grupos experimentais – apresentada na figura 19 – indica que com exceção do grupo NGR, os animais dos demais grupos apresentaram uma amnésia parcial. Como esse perfil é observado nos animais do grupo NGP, controles, pode-se considerar como sendo um desempenho dentro do padrão esperado. Como não foram observados efeitos significativos da restrição e da gestação no teste de memória, a recuperação parcial da informação adquirida durante o treino, pode ser considerada dentro do “padrão normal”, nas condições utilizadas (teste após 72 h da última tentativa do treino). O fato das ratas do grupo NGR terem apresentado uma maior latência na Esquiua 3, comparadas com as fêmeas dos demais grupos, poderia estar refletindo um efeito ansiogênico da restrição, no caso não significativo, conforme discutido abaixo.

Ainda com base na informação obtida de uma análise descritiva do comportamento dos animais dos diferentes grupos (Figura 19), confirma-se que os animais de todos os grupos (NGP, NGR, GP e GR) foram capazes de aprender a tarefa de esquivas inibitória, o que pode ser verificado através do aumento da porcentagem de latência ao longo das tentativas. Embora a análise com o Modelo de Cox não tenha indicado efeito dos tratamentos, a título de discussão decidimos delinear o comportamento dos animais dos diferentes grupos, baseando-se nos dados apresentados na figura 19. Observamos que as ratas restritas (NGR e GR) parecem apresentar uma tendência em ter um comportamento de esquivas mais pronunciado que as ratas padrões, apresentando uma maior latência de esquivas durante as tentativas, principalmente nas esquivas 2 e 3. De acordo com essas observações, levantamos a hipótese de que a restrição poderia afetar o estado emocional das ratas restritas, tanto gestantes e não gestantes, aumentando o estado ansioso em relação às ratas padrões (NGP e GP). Ikarashi et al. (2009) observaram que ratos DT testados no *open-field* tiveram um comportamento de ambulação com atividade locomotora restrita na periferia do aparato, o que indicou um estado de maior ansiedade nos ratos deficientes de tiamina. Interessante mencionar que aplicando-se o Modelo de Cox, para os dados da tarefa de esquivas inibitórias em cada grupo, ou seja realizando uma análise de sobrevivência para os 4 grupos separadamente, observa-se (dados não mostrados), que no teste de memória, ao comparar a latência na esquivas 3 com a esquivas 2, observamos que os animais do grupo NGR tiveram uma latência de permanência maior no braço fechado em relação ao grupo NGP (taxa de falha das ratas NGR foi de 0,5 vezes a taxa de falha das NGP, $p=0,005$), sugerindo que as ratas restritas tiveram uma aparente melhor recuperação do aprendizado que as ratas padrões. Aparente porque, conforme mencionado acima, consideramos que o mais provável seria um efeito ansiogênico da restrição de tiamina. Porém, destacamos que ao se aplicar o Modelo de Cox, incluindo todos os dados (treino, teste, tratamentos e períodos) não se observa efeito significativo da restrição. No entanto, as

ponderações apresentadas, considerando a análise descritiva desses resultados, indicam que estudos mais detalhados devem ser executados com a finalidade de esclarecer essa questão.

Com a finalidade de dissecar as análises dos fenômenos de aprendizagem e memória, decidimos aplicar o Modelo de Cox sem a inclusão dos dados da esQUIVA 3 (memória), avaliando separadamente os dados do desempenho dos animais durante o treino – apenas o aprendizado na esQUIVA inibitória. Os resultados dessas análises mostraram uma tendência de redução da média dos tempos de permanência (latência) no braço fechado do LTE, quando as ratas GP são comparadas às NGP (taxa de falha das GP de 1,5 vezes a taxa de NGP, $p=0,06$), indicando uma tendência de **efeito ansiolítico** da **gestação**. Esse efeito é observado, na análise descritiva, principalmente nas tentativas das tarefas de esQUIVA inibitória das ratas GP avaliadas no Período 3 (dados não mostrados). Neumann et al. (1998) verificaram um efeito ansiolítico nas ratas com três semanas de gestação, diferentemente dos outros períodos (uma ou duas semanas de gestação), nos quais as fêmeas apresentaram um estado de maior ansiedade, quando avaliadas no teste labirinto em cruz elevado (EPM=*elevated plus-maze*). Lonstein (2005) e Miller et al (2011) observaram que ratas com uma semana pós-parto também são menos ansiosas quando comparadas com ratas virgens, sugerindo assim que essas diferenças podem ser adaptações biológicas, como um mecanismo de sobrevivência que favorece a capacidade das gestantes de cuidar adequadamente dos filhotes e de defender o ninho.

Considerando ainda o perfil da análise descritiva – figura 19 - apresentada acima, decidimos tratar os dados, aplicando o Modelo de Cox, mas considerando o grupo GR como referência. Nessas condições, comparando as ratas dos grupos GR e GP, foi verificado um efeito significativo da restrição ($p=0,03$). Observamos que as ratas GP apresentaram uma latência menor no braço fechado em relação às ratas GR (taxa de falha das GP é 1,7 vezes a taxa das

GR). Portanto, a análise descritiva e a aplicação do Modelo de Cox para os dados do desempenho durante o treino, indicam que a **restrição** pode ter um **efeito ansiogênico**, o que está de acordo com a hipótese levantada anteriormente. Nessa mesma análise, verificamos que as ratas do experimento referente ao Período 3 (avaliadas na 3ª semana) possuem uma tendência a demorar mais tempo para sair do braço fechado que as ratas avaliadas na 1ª semana (Período 1) (taxa de falha das ratas do período 3 foi de 0,63 vezes a taxa de falha das ratas do período 1) sugerindo que os períodos (tempo) possuem efeitos no teste de esQUIVA inibitória. A partir desses resultados, levantamos as hipóteses que a idade dos animais e/ou o tempo de dieta (tanto padrão como restrita) poderia estar afetando a resposta dos animais, que passaram por 3 semanas de experimento antes do teste de esQUIVA inibitória. Corroborando a hipótese de que a idade do animal possa ter um efeito ansiogênico, estudos mostram que o aumento do estado de ansiedade se correlaciona com o aumento da idade (Imhof et al., 1993; Oliveira et al., 2010). Testes que avaliam o estado de ansiedade, como o modelo do labirinto em cruz elevado e o teste de interação social, mostraram que fêmeas adolescentes eram menos ansiosas do que as fêmeas adultas (Genn et al., 2003). Através desses dados podemos sugerir que tanto a gestação quanto a restrição podem afetar o estado emocional ao longo do tempo, porém, considerando que a aplicação do Modelo de Cox, incluindo os dados da EsQUIVA 3 não detecta efeito nem da restrição, nem da gestação, estudos futuros com uma amostra maior e com a utilização de outros testes comportamentais são necessários para esclarecer melhor essa questão. Apesar da complexidade das possíveis interações entre as variáveis estudadas nessas duas condições – gestação e deficiência de tiamina - os dados obtidos no presente estudo abrem perspectivas de novos experimentos e indicam a relevância da investigação detalhada desses fenômenos, para se entender as relações desses estados com aspectos específicos das funções cognitivas e/ou emocionais.

Nas tarefas de *Fuga* também não foram observados efeitos significativos em relação aos tratamentos (grupos) ($p < 0,05$) e foi observada uma tendência de efeito em relação aos períodos ($p = 0,08$), quando utilizamos o Modelo de Cox de análise de sobrevivência para avaliar aprendizado e memória. Porém, observamos efeitos significativos entre as latências no braço aberto durante o teste de fuga. O tempo de permanência dos animais no braço aberto aumentou ao longo das tentativas, sendo que a latência na fuga 1 (1ª tentativa) foi menor que a latência na fuga 2 (2ª tentativa) (taxa de falha na fuga 2 foi de 0,75 vezes taxa na fuga 1) e que a fuga 3 (3ª tentativa) (taxa de falha de 0,64 vezes a taxa de falha da fuga 1). Se compararmos com dados obtidos por outros autores, esses efeitos de aumentos significativos das tentativas ao longo do treino nas tarefas de fuga, observados no presente estudo, não eram esperados. Zangrossi e Graeff (1997) não observaram efeito das tentativas, quando submeteram animais por 5 tentativas consecutivas nas tarefas de fuga no aparato do LTE (equipamento igual ao utilizado no presente trabalho). Teixeira et al. (2000) mostraram que animais controles que passaram pela pré-exposição no braço aberto um dia antes do treino (como descrito na sessão métodos), permaneceram com latências de escape semelhantes durante as tentativas de fuga, enquanto os animais com tratamento agudo de imipramina em altas doses tiveram latências de escape aumentada significativamente durante as tentativas de fuga, sugerindo que esse aumento possa ter ocorrido devido a um efeito anti-pânico da imipramina. No presente estudo, uma das hipóteses que poderia explicar o aumento da latência ao longo das tentativas seria o fenômeno da habituação. No entanto, isto não explica a diferença com relação aos dados obtidos por Zangrossi e Graeff (1997) no qual os animais também tiveram oportunidade de se habituar ao longo das 5 tentativas.

Com base na informação descritiva do comportamento dos animais dos 4 grupos, apresentada na Figura 21, verificamos que os perfis de aprendizado parecem diferentes quando se compara

o grupo NGP e os demais. As ratas controle NGP tiveram uma porcentagem de latência aumentada ao longo das tentativas, enquanto as ratas NGR mantiveram o mesmo desempenho. Considerando a variabilidade apresentada pelas ratas do grupo GR, pondera-se que estas e também as ratas do grupo GP tiveram uma alteração – pequeno aumento - ao longo das tentativas. Conforme mencionado acima, o perfil esperado do desempenho dos animais nessa tarefa, durante o treino, é uma diminuição do tempo de permanência no braço aberto, à medida que os animais aprendem a escapar do estímulo aversivo. Teixeira et al (2000) não observou alteração na latência ao longo do treino, mas não encontramos na literatura nenhum resultado que descreva um aumento da latência ao longo das tentativas, conforme verificado no presente estudo para as ratas do grupo NGP e, embora em menor extensão, também para as ratas GP e GR. Acima levantamos a hipótese de que uma possível explicação para esse comportamento seria a ocorrência de habituação. Se esse for o caso, esse fenômeno da habituação não ocorreu com as ratas restritas (NGR), sugerindo um possível efeito ansiogênico da falta de tiamina, o que estaria de acordo com as sugestões decorrentes do comportamento desses animais no teste de esquivas. No caso das ratas GR esse possível efeito da restrição seria compensado pelo efeito ansiolítico da gestação.

No teste de memória da fuga, observamos que a latência na fuga 4 foi menor que a latência na fuga 3 (taxa de falha da fuga 4 de 1,47 vezes a taxa de falha na fuga 3), ou seja, a informação aprendida – fuga de um estímulo aversivo - foi totalmente recuperada após 72 horas. Este resultado está de acordo com o descrito por outros autores (Graeff et al. 1993; Viana et al., 1994).

As análises de sobrevivência apenas para o treino, sem a presença da fuga 4 (memória), também foram realizadas para verificar o aprendizado nas tarefas de fuga (dados não

mostrados). Os resultados dessas análises mostraram ausência de efeitos significativos dos tratamentos (grupos) e efeitos significativos dos períodos. Com relação ao efeito dos períodos (1, 2 e 3), as fêmeas do experimento referente ao Período 3 (avaliadas na 3ª semana) apresentaram taxa de falha 0.6 vezes a taxa dos animais do Período 1 ($p=0,008$) e do Período 2 ($p=0,04$). Ou seja, as ratas avaliadas na 3ª semana, demoraram mais tempo para sair do braço aberto, quando comparadas com as fêmeas avaliadas na 1ª semana e na 2ª semana. Duas hipóteses podem ser consideradas para explicar esse efeito de aumento da latência na terceira semana de tratamento: (i) uma redução na atividade locomotora dos animais, associada ou não ao aumento do peso das ratas gestantes na 3ª semana e/ou (ii) um efeito ansiolítico da gestação. A primeira hipótese parece pouco provável, pois, no teste da esQUIVA INIBITÓRIA as ratas gestantes padrão apresentaram uma tendência ($p=0,06$: resultado da análise de sobrevivência com os dados do desempenho no treino) de menor latência de esQUIVA (no caso de uma dificuldade motora o esperado seria uma latência de esQUIVA maior). Portanto, tanto os dados da esQUIVA INIBITÓRIA como os da tarefa de fuga estão de acordo com a segunda hipótese, ou seja, um possível efeito ansiolítico da gestação. As questões – hipóteses - levantadas a partir dos resultados do presente estudo devem ser abordadas em projetos futuros especificamente delineados para esse propósito.

Estudo bioquímico

No presente trabalho avaliamos a precisão e a exatidão do método cromatográfico (HPLC) para as determinações dos níveis de tiamina e suas formas fosforiladas, utilizando derivatização pré-coluna com ferricianeto de potássio e fase móvel isocrática. O método descrito por Lu & Frank (2008) e estabelecido com pequenas modificações no nosso laboratório, como descrito na sessão de métodos, permitiu a análise dos níveis de tiamina e

seus derivados em amostras de tecido cerebral (hipocampo) de ratos, de forma rápida e com alta reprodutibilidade e acurácia.

A reprodutibilidade da análise cromatográfica intradia é alta, pois tanto para tiamina quanto para seus derivados as variações são pequenas (2% a 7%). O contrário foi observado na reprodutibilidade interdía, onde a variação foi alta, de 25 a 38%, para os níveis de tiamina e seus derivados (TMP e TDP). Portanto, no presente estudo, os ensaios em amostras de hipocampo de animais representantes dos quatro grupos, foram realizados sempre no mesmo dia.

A baixa estabilidade das amostras derivatizadas com ferricianeto de potássio (inferior a 30 minutos) não influenciou nos resultados obtidos porque um minuto após a derivatização as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico. Além disso, a utilização de ferricianeto de potássio como agente derivatizante apresenta diversas vantagens, dentre elas uma adequada sensibilidade, quando comparado a outros agentes derivatizantes (Losa et al., 2005).

Além disso, a alta acurácia obtida nos ensaios de recuperação ($97,3 \pm 1,43\%$, $96,04 \pm 2,7\%$ e $101,7 \pm 0,8\%$ para B1, TM e TDP, respectivamente) indica que o método pode ser usado para análises quantitativas desses compostos em tecidos cerebrais de ratos. Os valores médios de reprodutibilidade e acurácia do método estão de acordo com estudos cromatográficos prévios, para determinação de tiamina e seus derivados em amostras de tecidos cerebrais de ratos (Batifoulier et al., 2005) e de sangue humano e de ratos (Lu & Frank, 2008; Kimura et al., 1982).

De acordo com Baker et al. (1964), a tiamina é uma das vitaminas que pode ser determinada através de técnicas microbiológicas, técnicas bioquímicas como cromatografia, espectrofotometria com fluorescência e através de exposição a ultravioleta (Rindi & De Giuseppel, 1961; Pincus & Grove, 1970). Outra técnica utilizada é a determinação da tiamina pelo ensaio da atividade da enzima transcetolase (método de dosagem indireto) (Basoglu et al., 2006; Adamolekun, 2010). Através da técnica de cromatografia líquida (HPLC), a tiamina e suas formas fosforiladas podem ser determinadas separadamente, após a conversão de derivado de tiocromo fluorescente pela oxidação alcalina (Ishii et al., 1979a), o que não é possível através das outras técnicas citadas acima. Em estudos utilizando técnicas de HPLC, alguns autores determinaram o conteúdo de tiamina em amostras humanas ou de ratos: urina (Losa et al., 2005; Roser et al, 1978; Baker et al., 1964), cérebro (Gangolf et al., 2010; Batifoulier et al., 2005; Ishii et al., 1979b; Sanemori et al., 1980), fígado, rins, coração (Batifoulier et al., 2005; Ishii et al., 1979b) e sangue (Gangolf et al., 2010; Lu & Frank, 2008; Kimura et al., 1982; Baker et al., 1964). Um método sensível e rápido é necessário para a determinação dos níveis de tiamina, sendo o HPLC considerado um teste de diagnóstico laboratorial importante na avaliação clínica da deficiência de tiamina (Bettendorff et al., 1986, 1991).

No presente estudo foram determinadas, por HPLC, as concentrações de tiamina e seus derivados fosforilados (TMP e TDP) em amostras de sangue, hipocampo e tálamo. Poucos estudos têm determinado as concentrações de tiamina no sangue de ratos e, nos estudos existentes, os autores utilizam técnicas que convertem a tiamina livre e seus derivados em tiamina total (Rindi et al., 1968; Kimura et al., 1982), o que difere da técnica utilizada no presente estudo, onde cada composto foi quantificado separadamente. De acordo com os dados obtidos nos estudos realizados pelos autores mencionados acima, a concentração média

de tiamina total no sangue de ratos condiz com a concentração média de tiamina total (B1+TMP+TDP) no sangue das ratas padrões (NGP) do presente estudo: Rindi et al. (1968): $283,1 \pm 0,75 \mu\text{g/L}$ (n=7); Kimura et al. (1982): $243,4 \pm 12,1 \mu\text{g/L}$ (n=7); Ratas NGP do presente estudo: $273,8 \pm 25,1 \mu\text{g/L}$ (n=18).

Observamos que os níveis de B1 são afetados pela gestação, pela restrição de tiamina e pelo tempo (períodos) de tratamento. As ratas gestantes (GP e GR = $292,1 \pm 47,5 \text{ nmol/L}$) possuem uma maior concentração de B1 ($p=0,02$) em relação as não gestantes (NGP e NGR = $203,6 \pm 33,1 \text{ nmol/L}$), o que nos sugere que a demanda durante a gestação poderia induzir um aumento da atividade metabólica das formas fosforiladas nos tecidos (p.ex. degradação de tiamina trifosfato=TTP), com conseqüente aumento transitório dos níveis de B1 (tiamina), TMP e TDP no sangue. A restrição de tiamina resulta em uma diminuição ($p=0,006$) da concentração de B1 (NGR e GR = $198,3 \pm 36,1 \text{ nmol/L}$; NGP e GP = $294,5 \pm 45,1 \text{ nmol/L}$) e durante os períodos, podemos observar que à medida que a gestação e o episódio de restrição evoluem, a concentração de B1, TMP e TDP diminuem. Se a hipótese da demanda, p.ex. de TDP, suprida por TTP, estiver correta o aumento progressivo dessa demanda pode resultar em uma escassez da reserva e diminuição de todas as formas, B1, TMP e TDP. Uma das bases dessa hipótese, aumento progressivo da demanda ao longo da gestação, está de acordo com Drewett et al. (2000) que observaram um aumento na demanda energética e de micronutrientes durante a gestação, principalmente, ao final dela. Outro fator que poderia contribuir para um aumento desses compostos no sangue, nas fases iniciais do processo, seria um aumento do consumo de ração. Devido a uma demanda aumentada, as ratas gestantes consumiram mais ração, principalmente nas últimas semanas, tendo assim uma concentração de B1 (média em todos os períodos) maior em relação as não gestantes. Porém, ao analisar cada período separadamente, percebemos que essa concentração diminui ao longo da

gestação, o que pode ser explicado pela alta demanda nutricional exigida pela gestação, interferindo assim na intensidade metabólica (Baker et al., 1975).

A baixa concentração de B1 nas ratas restritas mostra que a deficiência de tiamina na dieta se reflete nos níveis sanguíneos. O baixo nível circulante de tiamina é considerado a primeira indicação de deficiência de tiamina (Baker et al., 1964), o que pode ser um forte indicativo do estado nutricional, em relação à essa vitamina (Bettendorff et al., 1986). Esse resultado reforça a hipótese que não somente a prole sofre as consequências da deficiência, como verificado por Freitas-Silva et al. (2010), mas também a própria gestante, que em uma condição de restrição, mesmo ingerindo mais ração e, provavelmente, lançando mão de reservas (TPP), não consegue manter um nível plasmático adequado dessa vitamina.

Observando as concentrações de B1 (figura 24, painel A), verificamos que as concentrações se diferem entre os períodos, sendo que a concentração maior está presente no período 1 em todos os grupos experimentais, ou seja, mesmo nas ratas não gestantes. Esse dado poderia derrubar as hipóteses mencionadas acima – efeito da demanda/gestação. O esperado seria que as concentrações de B1 no sangue se mantivessem relativamente estáveis, durante os 3 períodos, nas ratas NGP. A primeira explicação que nos ocorreu foi um consumo maior de ração logo após a troca da ração comercial pela ração produzida no laboratório – que ocorreu na 1ª semana. Analisando os dados de consumo de ração – figura 12 – observa-se um maior consumo pelas ratas NGP e também pelas ratas NGR, na 1ª semana de tratamento. Além disto, não podemos destacar a possibilidade de erro na manipulação da ração com a adição de uma concentração mais alta de tiamina (B1), durante a produção das rações para o tratamento dos animais na 1ª semana. Independente da causa, ou seja, se o aumento da B1 no sangue no Período 1 foi devido a um maior consumo de ração ou a um erro na manipulação da ração,

esse aumento detectado nas ratas NGP poderia derrubar a hipótese da demanda gestacional, levantada para explicar a flutuação nas concentrações da vitamina B1 e suas formas fosforiladas no sangue. Com a finalidade de descartar ou confirmar essa interferência – alta B1 no Período 1 nas ratas controles NGP - realizamos uma análise dos dados desconsiderando a variação (delta) da concentração de tiamina no período 1. Ou seja, calculamos a diferença existente entre a média do período 1 e a média do período 2 no grupo NGP, e o valor desse delta foi subtraído dos valores médios obtidos no período 1, para as ratas NGR, GP e GR. Utilizando as médias corrigidas através dessa simulação, refizemos as análises e obtivemos os seguintes resultados: efeitos significativos da gestação ($F_{(1,56)} = 30,4$; $p = 0,000$), restrição ($F_{(1,56)} = 53,4$; $p = 0,000$) e períodos ($F_{(2,56)} = 13,2$; $p = 0,000$) e interação entre esses 3 fatores ($F_{(2,56)} = 3,9$; $p = 0,02$) sobre a concentração de B1. Portanto, mesmo desconsiderando o aumento da concentração de tiamina, no período 1, observado nas ratas NGP, os resultados obtidos da análise estatística não se alteram e a interpretação dos dados discutida acima, continua sendo coerente.

Observamos também que o fator tempo (período) tem efeito sobre as concentrações de TMP e TDP, além de sobre as concentrações de B1, como descrito anteriormente. As ratas padrões (NGP) mantiveram os níveis de TMP e TDP relativamente estáveis durante os 3 períodos, porém, as ratas dos demais grupos apresentaram as concentrações diminuídas ao longo do tempo, o que indica que o tempo influencia tanto nos efeitos do episódio de restrição, quanto da gestação. Esse dado de diminuição das concentrações de B1 e TMP ao longo do episódio de restrição foi observado também no trabalho realizado por Rindi et al. (1968), os quais verificaram que a DT na dieta afeta tanto os níveis de B1 quanto os de TMP em amostras plasmáticas. Esses autores observaram que os níveis foram reduzidos a valores extremamente baixos, mostrando que a duração do episódio de deficiência (10 dias de DT) afeta mais os

níveis de TMP. Molina et al. (1994), usando roedores como modelo experimental, também mostraram que os níveis de B1, TMP e TDP caem em vários tecidos, ao longo da DT. Destacamos que nesse estudo (Molina et al,1994) a concentração de TDP no sangue diminuiu 54% em uma semana e 86% com três semanas de deficiência, enquanto no presente trabalho a concentração de TDP nas ratas restritas (NGR) diminuiu 67% na 2ª semana (período 2) e 68% na 3ª semana de tratamento (período 3). A diferença entre essas taxas pode ser explicada pelo fato que no presente estudo a deficiência de tiamina em relação à dieta padrão foi parcial e não total como no estudo de Molina et al. (1994). Isto indica que a restrição, mesmo não sendo total, pode causar alterações significativas nas concentrações de tiamina e suas formas fosforiladas no organismo.

De acordo com os resultados do presente estudo, a concentração de TDP no sangue também foi afetada pela restrição, sendo também observado uma tendência de interação dos 3 fatores: gestação, restrição e períodos. Diferentemente do observado com os níveis de B1, que parecem aumentar devido aos efeitos da gestação, as médias das concentrações de TDP nas gestantes (GP e GR = $260,9 \pm 37,7$ nmol/L) e nas não gestantes (NGP e NGR = $257,7 \pm 26,8$ nmol/L) não se diferem significativamente ($p > 0,05$). No entanto, os níveis de TDP tendem a diminuir ao longo da gestação (interação significativa entre gestação, restrição e período). A dieta restrita de tiamina causa uma diminuição ($p < 0,0001$) na concentração de TDP nas ratas restritas (NGR e GR = $160,5 \pm 21$ nmol/L) em relação às ratas com dieta padrão (NGP e GP = $355,5 \pm 34,2$ nmol/L), de forma mais pronunciada a partir da 2ª semana de gestação. De acordo com Bettendorff & Wins (2009) as doenças relacionadas com a DT são conseqüências da diminuição dos níveis de TDP tecidual, o que resulta na redução da atividade de enzimas importantes no metabolismo oxidativo.

Não encontramos na literatura nenhum estudo apresentando dados das concentrações de tiamina e seus derivados fosforilados, separadamente, em amostras de hipocampo e tálamo. Os valores, em nmol/g tecido, encontrados no presente estudo para a condição controle, ratas NGP, foram: (i) **hipocampo**: B1= 0,20±0,05; TMP= 2,16±0,71 e TDP= 8,96±0,31 e (ii) **tálamo**: B1= 0,20±0,01; TMP= 1,25±0,24 e TDP= 7,19±0,42. Esses valores estão de acordo com Batifoulier et al. (2005), que utilizando amostras de tecido cerebral total, encontrou valores, em nmol/g tecido, similares (B1=0,3; TMP=1,5 e TDP= 11,4) aos registrados no presente estudo.

As determinações das concentrações de tiamina e seus derivados em diferentes tipos de amostras de tecidos cerebrais de ratos foram, em estudos prévios, realizadas por outros autores. Nesses estudos são apresentados dados das determinações desses compostos por HPLC em homogenato de tecido cerebral (Batifoulier et al., 2005), em hemisférios direito e esquerdo (Gangolf et al., 2010), e em algumas estruturas encefálicas como ponte, cerebelo, mesencéfalo, córtex, mesencéfalo mais parte do tálamo, hipotálamo e corpo estriado (Pincus & Grove, 1970; Rindi et al., 1980). Esses autores encontraram, nas diferentes amostras estudadas, concentrações médias de B1 de aproximadamente 0,3 nmol/g tecido; de TMP que variaram entre 0,5 e 1,5 nmol/g tecido e de TDP entre 5,7 e 11,4 nmol/g tecido. Embora as determinações desses compostos no hipocampo e no tálamo não se encontram descritas na literatura, os valores verificados no presente estudo, para os níveis desses compostos nessas regiões (hipotálamo e tálamo) estão dentro da faixa descrita por outros autores, para outros tipos de amostras de tecidos cerebrais.

A restrição de tiamina teve efeito sobre os níveis de TMP e TDP no hipocampo e sobre os níveis de B1, considerando a interação entre restrição e tempo. As ratas restritas apresentaram

níveis menores de B1, TMP e TDP em relação às ratas padrões. Ou seja, esses resultados indicam que a restrição afeta as concentrações desses compostos tanto a nível periférico quanto a nível central. A interação significativa entre restrição e gestação mostra que a gestação também tem efeito sobre os níveis de TDP. O efeito da restrição nas gestantes - diminuição dos níveis de TDP - é diferente do efeito da restrição nas não gestantes - onde a restrição nas condições empregadas (episódio de curta duração e deficiência parcial) não afeta os níveis hipocâmpais de TDP. Provavelmente, por se tratar de coenzima importante no metabolismo, as reservas de TTP, TMP e B1 são acionadas com o objetivo de manter os níveis de TDP estáveis. No caso da restrição estar associada à gestação a alta demanda metabólica e gasto de TDP, não consegue ser suprida pelas reservas das outras formas (B1, TMP e TTP). As concentrações de B1 e de suas formas fosforiladas (TMP e TDP) nas amostras de hipocampo foram afetadas pelo tempo (períodos), ocorrendo ao longo do tratamento um aumento dos níveis de B1 e diminuição dos níveis de TMP e TDP. Observando as concentrações de B1 e TMP nas fêmeas NGP (Figura 25) pode-se verificar que a média da concentração de B1 nos períodos 1 ($0,20 \pm 0,05$ nmol/g) e 2 ($0,03 \pm 0,11$ nmol/g) é aproximadamente 8 vezes menor que a média no período 3 ($1,8 \pm 0,08$ nmol/g), enquanto que a concentração de TMP nos períodos 1 ($2,1 \pm 0,71$ nmol/g) e 2 ($2,8 \pm 0,65$ nmol/g) é aproximadamente 6 vezes maior que a média no período 3 ($0,45 \pm 0,11$ nmol/g). Não temos nenhuma hipótese baseada em fenômenos metabólicos que pudesse explicar esses resultados. Se essas formas são interconvertíveis (Hass 1998; Gangolf et al., 2010) e a única diferença entre os subgrupos é a idade das ratas, poderia se pensar que o equilíbrio de produção das formas derivadas se altera com a idade, sugerindo uma diminuição na utilização de TMP e TDP com consequente aumento da forma não-fosforilada (B1). Outra explicação que se origina dessa hipótese seria o fato de que ao longo do tempo a demanda da atividade hipocâmpal para reconhecimento do ambiente diminui, pois, as ratas são mantidas no mesmo

ambiente que deixa, depois de certo tempo, de significar novidade. Interessante notar que esse fenômeno de tendência à diminuição da TMP e TDP parece acontecer com as ratas, independente do tipo de tratamento, enquanto que a tendência ao aumento da B1 ocorre apenas em ratas padrão.

No tálamo, os níveis de B1 e TMP foram afetados por todos os tratamentos (restrição, gestação e períodos), ocorrendo interação entre todos esses fatores. O nível de TDP parece menos susceptível aos efeitos desses tratamentos, embora tenha sido observado uma tendência de interação entre gestação e restrição, sugerindo uma possibilidade de efeito desses fatores sobre a concentração de TDP. Dados obtidos por Gangolf et al. (2010) mostram que os níveis de TDP foram menos variáveis no cérebro humano do que nos tecidos periféricos, o que pode ser explicado por uma regulação da homeostase da tiamina no cérebro. Através desses resultados, é plausível concluir que uma dieta restrita de tiamina, mesmo que por um tempo relativamente curto e uma deficiência apenas parcial é suficiente para afetar os níveis dessa vitamina e seus derivados no tálamo. Essa possibilidade de um maior efeito da restrição de tiamina no tálamo comparado com o hipocampo pode ser considerada uma das causas do tálamo ser uma das áreas cerebrais mais afetadas em ratos e em seres humanos deficientes em tiamina (Matsushima et al., 1997). Uma questão relevante que pode ser levantada a partir desse resultado é: qual seria a causa da restrição de tiamina na dieta refletir mais no tálamo do que no hipocampo? Uma possibilidade seria a existência de diferenças na barreira hematoencefálica. De acordo com Vetreno et al. (2012), vários núcleos do tálamo são afetados pelos danos da DT. Os núcleos mediais são afetados pela perda neuronal e estão localizados na porção medial do tálamo, a qual é uma região que está diretamente em contato com o líquido cérebro espinhal, já que faz limite com a parede do III ventrículo.

O efeito da restrição de tiamina na dieta sobre os níveis de B1 e seus derivados no tálamo é diferente se a rata está ou não grávida, indicando um efeito da gestação na concentração desses compostos. Vale destacar que esse efeito da gestação parece mais pronunciado no tálamo do que no sangue e no hipocampo. Por exemplo, é interessante observar que a gestação afeta os níveis de B1 e TMP no tálamo de forma mais pronunciada do que no sangue e no hipocampo. Isto sugere um papel diferenciado da tiamina e seus derivados fosforilados no tálamo.

Os efeitos do tempo (períodos) sobre os níveis de B1, TMP e TDP no tálamo causam os mesmos perfis de alterações no hipocampo. No tálamo, a média da concentração de B1 aumenta com o tempo: períodos 1 ($0,20 \pm 0,007$ nmol/g), período 2 ($2,0 \pm 0,37$ nmol/g) e período 3 ($2,42 \pm 0,06$ nmol/g), enquanto que a concentração de TMP diminuiu com o tempo: períodos 1 ($1,25 \pm 0,24$ nmol/g), período 2 ($1,47 \pm 0,32$ nmol/g) e período 3 ($0,29 \pm 0,04$ nmol/g). As hipóteses levantadas acima para explicar essas variações no hipocampo, podem ser aplicadas também para o tálamo. Principalmente, quando se considera a existência de uma correlação significativa entre os níveis desses compostos no hipocampo e no tálamo.

Destacamos que foram observadas as seguintes correlações significativas, para os parâmetros, B1, TMP e TDP nas amostras biológicas obtidas das ratas gestantes e não gestante controles e restritas em tiamina durante uma, duas ou três semanas de tratamento: (i) entre as concentrações de TMP no sangue e no hipocampo (ii) entre concentrações de B1, TMP ou TDP no sangue e no tálamo (iii) entre as concentrações de B1, TMP ou TDP no hipocampo e no tálamo. A ocorrência de correlação significativa e inversa entre a concentração de B1 no sangue e no tálamo poderia ser explicada devido à ocorrência de um mecanismo compensatório para manter um equilíbrio no tálamo (região mais afetada) o que pode ser

facilitado pela existência de um contato direto entre tálamo e o líquido. As correlações diretas das concentrações de TMP e TDP no sangue e tálamo e TMP no sangue e hipocampo sugerem que as demandas de TMP no hipocampo e TMP e TDP no tálamo podem ser suprida pelo sangue. Enquanto que ausência das correlações entre B1 e TDP no sangue e no hipocampo, sugere diferenças nas funções e na demanda desses componentes nessas duas regiões, tálamo e hipocampo, e também indicam que B1 e TDP podem ser providas de outras regiões cerebrais, além do sangue. Correlações diretas das concentrações de B1, TMP e TDP entre hipocampo e tálamo indicam uma associação entre eventos neurobiológicos envolvendo esses compostos. As correlações significativas observadas entre os níveis periféricos e centrais desses compostos indicam que as determinações de tiamina e seus derivados no sangue podem ser consideradas como um potencial “biomarcador” das flutuações desses compostos em regiões específicas do SNC.

Considerando as similaridades, entre roedores e humanos, quanto às diferenças na susceptibilidade de regiões do SNC (p.ex. tálamo, em ambos, é a região mais susceptível) aos efeitos deletérios da deficiência de tiamina, o emprego do modelo experimental para se entender as relações entre disfunções centrais e periféricas, representa um importante instrumento nesse campo de pesquisa. Assim, os dados obtidos em modelo experimental de deficiência materna de tiamina são relevantes para se estudar as consequências do déficit dessa vitamina sobre o funcionamento de processos neurobiológicos, na gestante e na prole, e suas relações com aspectos específicos do comportamento.

As concentrações de BDNF foram determinadas em amostras de plasma e de hipocampo. Os resultados obtidos nas amostras de plasma mostraram que os níveis de BDNF foram afetados pela gestação, com interação significativa desse fator com o tempo (período). A restrição

apresentou uma tendência de efeito, sem ocorrência de interação significativa entre esse fator e a gestação ou período de tratamento. As ratas gestantes (GP e GR) tiveram níveis de BDNF menores que as ratas não gestantes (NGP e NGR). Esses resultados, da diminuição dos níveis plasmáticos de BDNF ao longo da gestação estão de acordo com os obtidos por Lommatzsch et al. (2006), os quais encontraram uma diminuição desse componente durante e após a gestação, em amostras de soro humano. Por outro lado, a restrição de tiamina tende a causar um aumento nos níveis de BDNF. Não há estudos na literatura sobre a relação entre deficiência de tiamina e fator neurotrófico, porém existem estudos que mostram que a desnutrição perinatal modifica os níveis de BDNF hipocampal em fases diferentes do desenvolvimento pós-natal (Coupé et al., 2009). Ao longo do desenvolvimento e maturação pós-natal, Karege et al. (2002) observaram um aumento dos níveis de BDNF no soro e em regiões cerebrais, como hipocampo.

No presente estudo verificamos que, apesar dos níveis plasmáticos de BDNF serem afetados pela gestação e períodos de gestação, os níveis de BDNF hipocampal não foram afetados pela gestação, restrição e nem pelos períodos. De acordo com esses resultados levantamos as seguintes hipóteses: (i) as alterações nos níveis de BDNF no plasma refletem alterações desse fator apenas nos tecidos periféricos, como p.ex. músculo e glândulas, cujo metabolismo é alterado pelo estado gestacional; (ii) como o BDNF hipocampal parece exercer uma função importante para a sobrevivência da espécie, com papel em processos de aprendizagem e memória, este poderia estar mais protegido (p.ex. barreira hematoencefálica) de flutuações que ocorrem no plasma e, como consequência dessa especulação propomos também que: (iii) a produção e manutenção de BDNF no hipocampo, não depende da tiamina e/ou seus metabolitos e não sofre, como os demais tecidos periféricos, os efeitos da gestação. Outra possível explicação (hipótese iv) seria que um maior coeficiente de variação nas amostras de tecido hipocampal,

comparado com as amostras de plasma, estivesse interferindo com a detecção de um possível efeito dos tratamentos.

Com relação à primeira hipótese colocada acima, sabe-se que as neurotrofinas desempenham um papel mais amplo em diferentes tecidos (Sakuma & Yamuguchi, 2011). Estudos revelam que os músculos atuam como fonte abundante de BDNF, principalmente durante o desenvolvimento e na vida adulta (Griesbeck et al., 1995, Chevrel et al., 2006). As neurotrofinas também desempenham um papel crítico nos mecanismos de sinalização entre células do sistema imunológico e os níveis de BDNF podem ser regulados durante a inflamação (Scuri et al., 2010; Lin et al., 2011). Resultados obtidos por Saruta et al. (2010) sugerem que as glândulas salivares pode ser uma fonte primária de BDNF plasmática. No entanto, parece que as 1^a, 2^a e 3^a hipóteses são menos prováveis, pois, as análises de regressão entre os níveis de BDNF no plasma e no hipocampo mostraram uma correlação significativa entre todos os grupos estudados. Além disto, foi verificado uma correlação significativa ($r=0,31$; $p=0,009$) entre BDNF e TDP (dados não apresentados), o que desfavorece a 3^a hipótese. Isto indica que a 4^a hipótese pode ser a mais provável. Comparado com os dados obtidos em amostras do plasma, o coeficiente de variação das análises no hipocampo foi aproximadamente 35% maior. Outros autores (Klein et al., 2011) apresentaram evidências de que as concentrações sanguíneas de BDNF pode ser um biomarcador para variações desta neurotrofina no cérebro. Estudos mais detalhados, com um tamanho de amostra maior e avaliações em outras regiões do SNC são importantes para esclarecer essa questão.

1. Um episódio de três semanas de deficiência parcial de tiamina em gestantes ou não gestantes, não causa perda de peso, mas interfere com o ganho de peso na fase final dos processos de gestação e/ou do episódio de deficiência.
2. Os efeitos da restrição de tiamina sobre o consumo de alimentos são mais pronunciados em ratas gestantes do que em ratas não gestantes.
3. Uma restrição de tiamina durante a gestação interfere no desenvolvimento fetal.
4. A deficiência parcial de tiamina e a gestação parecem induzir alterações emocionais em direções opostas, sendo provavelmente ansiogênica e ansiolítica, respectivamente. Esses achados necessitam ser confirmados.
5. O método estabelecido para as dosagens das concentrações de B1 e seus derivados fosforilados é eficaz para essas determinações em diferentes amostras biológicas.
6. Efeito da restrição de tiamina, sobre os níveis B1, TDP e BDNF, nas gestantes é mais pronunciado do que nas não gestantes.
7. A gestação *per si* interfere no metabolismo da tiamina e derivados fosforilados.
8. Quantificações dos níveis de B1 e seus derivados fosforilados no sangue podem servir de indicadores de flutuações inversa ou direta, respectivamente, desses compostos no tálamo. Quantificação dos níveis de TMP no sangue pode servir de indicador de flutuações nas concentrações desse composto no hipocampo.
9. Comparado ao hipocampo, o tálamo é uma região mais afetada em relação aos níveis de B1 e seus derivados fosforilados durante um episódio subclínico de deficiência de tiamina em fêmeas gestantes ou não gestantes.
10. O metabolismo do BDNF é alterado pela gestação e provavelmente pela restrição de tiamina de forma inversa e essa alteração se reflete nos níveis plasmáticos dessa neurotrofina.

11. Confirmando dados obtidos por outros autores, oscilações nos níveis plasmáticos de BDNF podem ser indicativos de variações nas concentrações dessa neurotrofina no hipocampo.
12. Uma deficiência subclínica de tiamina em gestantes é capaz de interferir, principalmente no período final da gestação, com o comportamento alimentar, parâmetros bioquímicos sistêmicos e cerebrais da mãe e com o desenvolvimento dos fetos.
13. O início da caracterização do modelo de restrição maternal de tiamina é uma contribuição importante desse estudo, que abre perspectiva do estabelecimento de diferentes desenhos experimentais para esclarecer: (i) os mecanismos da associação entre gestação e deficiência de tiamina e (ii) as consequências dos efeitos dessas duas condições, em termos neurobiológicos e comportamentais, para a gestante e para a prole.

O presente estudo foi delineado com o propósito de se conhecer melhor os efeitos da deficiência maternal de tiamina sobre a gestante, em duas diferentes condições nutricionais (i) padrão: nutrição adequada e (ii) deficiente: restrita em tiamina (vitamina B1). Uma importante contribuição proveniente dos resultados obtidos foi o entendimento de que uma dieta deficiente em tiamina, mesmo que parcial e, sem evidentes manifestações de sinais clínicos – mesmo antes da detecção da perda de peso na fase final da gestação - é capaz de provocar alterações (a partir da 2^a semana de gestação) em parâmetros bioquímicos e afetar de forma significativa o desenvolvimento do feto. Exemplo disto é o achado de que os níveis plasmáticos da neurotrofina BDNF – que possui importante papel na plasticidade neuronal e estado emocional - são afetados pela gestação e pela restrição de tiamina de forma inversa, dado este que abre perspectivas de estudos futuros que possam esclarecer as relações entre essas variáveis e mecanismos de regulação do humor – p.ex. depressão e ansiedade e/ou aspectos específicos de funções cerebrais, como aprendizado e memória. Qual seriam as consequências em termos biológicos e comportamentais, para um feto desenvolvido em um ambiente com baixos níveis de BDNF e com flutuações nas concentrações de tiamina e suas formas fosforiladas? Qual o mecanismo responsável pela relação entre restrição de tiamina ou gestação e os níveis plasmáticos de BDNF? A tiamina trifosfato (TTP) teria alguma função na manutenção da homeostase das demais formas fosforiladas da tiamina durante as condições de gestação e ou restrição de tiamina? Essas são exemplos de importantes questões levantadas a partir dos resultados do presente estudo. Nesse sentido, os dados aqui obtidos abrem perspectivas para se entender as relações entre a vitamina B1 e o funcionamento de processos neuroquímicos e neuroimunológicos em regiões específicas do SNC durante o período gestacional. Os resultados inéditos deste trabalho indicam que o fato do tálamo ser uma das regiões mais susceptíveis à neurodegeneração induzida pela deficiência de tiamina, pode ser devido a uma queda relativamente acentuada, comparada com a que acontece no

hipocampo, dessa vitamina e seus derivados fosforilados no tálamo de indivíduos sob uma dieta restrita em tiamina. Desse achado origina-se outra questão: Qual seria a causa da restrição de tiamina na dieta refletir mais no tálamo do que no hipocampo? Outro dado relevante é a evidencia de que os níveis de tiamina e seus derivados no sangue são potenciais marcadores dos níveis desses compostos no tálamo. Além disto, os dados apontam para um possível comprometimento de aspectos emocionais devido à interação entre essas duas condições, gestação e restrição de tiamina. Sabe-se que ao longo da gestação ocorrem mudanças no metabolismo, que gradativamente se ajustam à condição de uma alta demanda energética. O presente estudo mostra, pela primeira vez, que se essa condição for associada à falta da vitamina B1, significativas alterações acontecem em outros parâmetros bioquímicos em regiões do sistema nervoso central – tálamo e hipocampo - e na corrente sanguínea da gestante. O início da caracterização do modelo de restrição maternal de tiamina é uma contribuição importante desse estudo, como também o estabelecimento do método de dosagem de tiamina que possibilitou, pela primeira vez, as determinações separadas dessa vitamina e de suas formas fosforiladas em amostras do tálamo e hipocampo. Através dessas determinações mostramos que a gestação, a restrição e o tempo (de gestação ou do episódio de restrição) interferem nos níveis de B1, TMP e TDP em cada uma dessas duas regiões e no sangue de uma forma particular.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 107/2010**, relativo ao projeto intitulado "***Efeitos da restrição de tiamina e do processo de gestação, de fêmeas wistar, sobre os níveis plasmáticos e centrais de tiamina e BDNF e suas relações com aspectos comportamentais***", que tem como responsável(is) **Ângela Maria Ribeiro**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 06/2010**.

Este certificado expira-se em **9/ 06/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 107/2010**, related to the project entitled "***Effects of the thiamine's restriction and pregnancy on plasma and center levels of the thiamine and BDNF in female wistar and its relationship with behavioral***", under the supervisors of **Ângela Maria Ribeiro**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 9, 2010**.

This certificate expires in **June 9, 2015**.

Belo Horizonte, 14 de Junho de 2010.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Cópia do Certificado CETEA

		Dias	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	
Não Gestante Padrão (NGP)	Período 1 (1ª semana)		282	284	319								
			300	298	289								
			283	292	293								
			296	302	288								
			297	303	303								
		261	272	269									
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)		277	277	283	286	288	292	299				
			280	280	280	280	282	284	289				
			320	330	332	338	334	335	335				
			293	298	304	306	311	313	313				
			289	308	310	316	323	324	330				
	Período 3 (1ª , 2ª e 3ª semanas)		278	286	293	300	294	304	304				
			288	291	300	300	300	300	301	301	301	301	301
			290	299	299	301	302	303	302	305	307	306	306
			277	277	286	286	287	287	287	283	285	285	285
		284	290	301	297	300	304	304	309	311	316	316	
	299	301	316	313	322	323	317	325	325	323	323		
	263	271	272	269	272	280	273	275	285	286	286	286	

Tabela 13: Dados referentes aos **PESOS CORPORAIS (g)** das ratas do grupo **Não Gestante Padrão (NGP)** (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: **Período 1 (1ª semana)**, **Período 2 (1ª e 2ª semanas)** e **Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)**.

Dias		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
Não Gestante Restrita (NGR)	Período 1 (1 ^a semana)	308	308	325							
		343	344	343							
		309	314	323							
		271	281	287							
		272	278	284							
		267	270	272							
	Período 2 (1 ^a e 2 ^a semanas)	290	290	292	295	292	299	297			
		210	212	220	219	222	222	223			
		303	309	316	325	325	325	325			
		301	309	314	312	323	327	328			
		294	307	307	311	312	321	321			
		259	274	275	275	276	284	282			
	Período 3 (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a semanas)	265	265	275	278	277	279	281	286	288	291
		300	300	302	306	308	308	310	309	311	315
		260	270	273	284	283	285	285	284	287	286
266		265	279	275	286	291	293	298	299	299	
313		322	322	328	336	345	340	344	350	347	
	250	255	263	270	270	270	275	270	274	274	

Tabela 14: Dados referentes aos **PESOS CORPORAIS (g)** das ratas do grupo **Não Gestante Restrita (NGR)** (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: **Período 1** (1^a semana), **Período 2** (1^a e 2^a semanas) e **Período 3** (1^a, 2^a e 3^a semanas).

	Dias	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	
Gestante Padrão (GP)	Período 1 (1ª semana)	266	285	283								
		252	269	274								
		255	275	285								
		272	276	281								
		270	275	277								
	287	293	303									
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)	308	324	327	334	335	344	349				
		279	300	306	316	311	323	338				
		244	266	277	285	292	294	294				
		283	298	303	313	324	330	330				
269		285	296	304	309	324	327					
Peso Corporal (g)	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	220	235	244	254	258	272	278				
		275	268	282	290	291	300	314	330	357	369	
		269	270	281	285	285	290	298	305	318	330	
		262	270	277	292	294	302	309	328	348	356	
		257	278	295	306	317	346	343	354	371	389	
	291	305	317	321	330	346	346	361	381	409		
	269	292	299	315	317	329	339	348	370	400		

Tabela 15: Dados referentes aos **PESOS CORPORAIS (g)** das ratas do grupo **Gestante Padrão (GP)** (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: **Período 1 (1ª semana)**, **Período 2 (1ª e 2ª semanas)** e **Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)**.

Dias		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	
Gestante Restrita (GR)	Período 1 (1ª semana)	284	288	296								
		259	272	285								
		298	319	319								
		260	268	281								
		293	296	311								
	297	307	320									
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)	271	292	301	311	311	316	333				
		291	306	317	327	330	336	343				
		284	301	305	319	324	325	325				
		232	242	254	255	263	270	282				
279		296	309	307	319	326	342					
Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	250	260	274	273	285	293	301					
	274	296	299	307	305	313	320	335	330	328		
	284	301	310	329	330	337	351	364	375	378		
	270	292	286	295	300	311	320	336	352	359		
	263	286	291	294	303	320	320	327	338	344		
	257	277	288	295	309	327	329	335	347	347		
	313	323	324	332	340	359	360	360	373	368		

Tabela 16: Dados referentes aos **PESOS CORPORAIS (g)** das ratas do grupo **Gestante Restrita (GR)** (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: **Período 1 (1ª semana)**, **Período 2 (1ª e 2ª semanas)** e **Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)**.

Dias		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Consumo de ração (g)	Período 1 (1ª semana)	17,0	19,0	19,0	19,7	16,3																
		17,0	19,0	19,0	19,7	16,3																
		19,0	19,0	19,7	16,3	20,0																
		20,0	19,9	19,9	19,9	22,3																
		20,0	19,9	19,9	19,9	22,3																
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)	16,0	15,0	15,5	18,5	18,5	18,5	17,8	17,8	20,3	18,7	13,0	14,3									
		16,0	15,0	15,5	18,5	18,5	18,5	17,8	17,8	20,3	18,7	13,0	14,3									
		17,8	17,8	20,3	18,7	13,0	14,3	20,0	20,0	20,0	21,5	14,0	15,0									
		14,0	18,7	22,0	23,9	23,9	23,9	20,7	15,8	15,8	16,5	16,5	14,7									
		18,7	22,0	23,9	23,9	23,9	20,7	15,8	15,8	16,5	16,5	14,7	17,0									
	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	18,7	22,0	23,9	23,9	23,9	20,7	15,8	15,8	16,5	16,5	14,7	17,0									
		16,3	16,3	21,0	13,3	20,7	14,8	14,8	15,7	15,7	14,0	10,7	13,3	10,3	12,4	12,4	12,4	13,7	15,0	8,7		
		16,3	16,3	21,0	13,3	20,7	14,8	14,8	15,7	15,7	14,0	10,7	13,3	10,3	12,4	12,4	12,4	13,7	15,0	8,7		
		16,3	16,3	21,0	13,3	20,7	14,8	14,8	15,7	15,7	14,0	10,7	13,3	10,3	12,4	12,4	12,4	13,7	15,0	8,7		
		17,0	17,0	20,5	22,0	19,7	19,7	16,0	18,7	15,8	15,8	15,8	16,7	14,2	14,2	12,5	12,5	16,7	16,0	16,0		
	17,0	17,0	20,5	22,0	19,7	19,7	16,0	18,7	15,8	15,8	15,8	16,7	14,2	14,2	12,5	12,5	16,7	16,0	16,0			
	19,7	19,7	16,0	18,7	15,8	15,8	15,8	16,7	14,2	14,2	12,5	12,5	16,7	16,0	16,0	14,5	11,5	11,5	15,5			

Tabela 17: Dados referentes ao CONSUMO DE RAÇÃO (g) das ratas do grupo Não Gestante Padrão (NGP) (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas).

		Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Consumo de ração (g)	Período 1 (1ª semana)		12,5	21,0	21,0	23,7	20,0																
			12,5	21,0	21,0	23,7	20,0																
			21,0	21,0	23,7	20,0	11,0																
			19,0	20,3	20,3	20,3	19,3																
			19,0	20,3	20,3	20,3	19,3																
			19,0	20,3	20,3	20,3	19,3																
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)		18,5	12,5	15,0	16,0	15,3	15,3	16,5	16,5	18,7	13,7	14,0	10,0									
			18,5	12,5	15,0	16,0	15,3	15,3	16,5	16,5	18,7	13,7	14,0	10,0									
			16,5	16,5	18,7	32,3	47,3	43,3	20,5	20,5	20,5	24,0	28,0	11,5									
			16,5	19,7	18,3	18,3	18,3	18,7	16,3	16,3	16,7	16,7	15,7	7,7									
			18,7	19,7	18,3	18,3	18,3	18,7	16,3	16,3	16,7	16,7	15,7	7,7									
			13,7	19,7	18,3	18,3	18,3	18,7	16,3	16,3	16,7	16,7	15,7	7,7									
	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)		17,5	17,5	17,0	16,7	19,0	16,0	16,0	16,7	16,7	13,0	13,3	6,3	10,3	13,2	13,2	13,2	8,7	11,0	11,0		
			17,5	17,5	17,0	16,7	19,0	16,0	16,0	16,7	16,7	13,0	13,3	6,3	10,3	13,2	13,2	13,2	8,7	11,0	11,0		
			17,5	17,5	17,0	16,7	19,0	16,0	16,0	16,7	16,7	13,0	13,3	6,3	10,3	13,2	13,2	13,2	8,7	11,0	11,0		
			16,3	16,3	21,0	21,5	14,7	16,7	20,3	18,7	16,0	16,0	16,0	16,3	13,0	13,0	16,0	16,0	14,0	14,2	14,2		
			16,3	16,3	21,0	21,5	14,7	16,7	20,3	18,7	16,0	16,0	16,0	16,3	13,0	13,0	16,0	16,0	14,0	14,2	14,2		
			14,7	16,7	20,3	18,7	16,0	16,0	16,0	16,3	13,0	13,0	16,0	16,0	14,0	14,2	14,2	14,0	15,3	15,3	15,0		

Tabela 18: Dados referentes ao CONSUMO DE RAÇÃO (g) das ratas do grupo Não Gestante Restrita (NGR) (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas).

Dias		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Gestante Padrão (GP)	Período 1 (1ª semana)	15,5	28,3	28,3	32,5	27,0																
		15,5	28,3	28,3	32,5	27,0																
		18,8	18,8	21,7	18,0	19,0																
		16,0	11,0	11,0	11,0	21,7																
		16,0	11,0	11,0	11,0	21,7																
	16,0	11,0	11,0	11,0	21,7																	
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)	20,5	22,0	22,5	21,5	19,3	19,3	19,2	19,2	22,3	17,7	12,7	16,7									
		20,5	22,0	22,5	21,5	19,3	19,3	19,2	19,2	22,3	17,7	12,7	16,7									
		19,2	19,2	22,3	17,7	12,7	16,7	22,5	22,5	22,5	14,5	20,0	20,0									
		17,0	16,8	21,6	21,6	21,6	22,3	17,3	17,3	17,3	17,3	19,5	13,8									
		17,0	16,8	21,6	21,6	21,6	22,3	17,3	17,3	17,3	17,3	19,5	13,8									
	17,0	16,8	21,6	21,6	21,6	22,3	17,3	17,3	17,3	17,3	19,5	13,8										
	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	7,8	7,8	18,7	21,3	25,7	8,7	8,7	16,7	16,7	18,7	16,7	17,7	15,7	13,3	13,3	13,3	22,0	18,7	15,3		
7,8		7,8	18,7	21,3	25,7	8,7	8,7	16,7	16,7	18,7	16,7	17,7	15,7	13,3	13,3	13,3	22,0	18,7	15,3			
7,8		7,8	18,7	21,3	25,7	8,7	8,7	16,7	16,7	18,7	16,7	17,7	15,7	13,3	13,3	13,3	22,0	18,7	15,3			
19,3		19,3	24,0	26,5	21,5	26,8	27,3	21,8	25,3	25,3	25,3	24,3	17,3	17,3	20,6	20,6	23,0	26,5	22,8			
19,3		19,3	24,0	26,5	21,5	26,8	27,3	21,8	25,3	25,3	25,3	24,3	17,3	17,3	20,6	20,6	23,0	26,5	22,8			
21,5	26,8	27,3	21,8	25,3	25,3	25,3	24,3	17,3	17,3	20,6	20,6	23,0	26,5	22,8	14,5	13,8	13,8	16,0				

Tabela 19: Dados referentes ao CONSUMO DE RAÇÃO (g) das ratas do grupo Gestante Padrão (GP) (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas).

		Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Gestante Restrita (GR) Consumo de ração (g)	Período 1 (1ª semana)		22,3	19,2	19,2	19,2																	
			22,3	19,2	19,2	19,2																	
			19,2	19,2	19,2	22,3																	
			19,3	19,3	21,5	17,5																	
			19,3	19,3	21,5	17,5																	
			19,3	19,3	21,5	17,5																	
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)		21,0	20,7	22,0	25,0	10,0	10,0	19,5	19,5	19,3	18,5	17,3	15,3									
			21,0	20,7	22,0	25,0	10,0	10,0	19,5	19,5	19,3	18,5	17,3	15,3									
			19,5	19,5	19,3	18,5	17,3	15,3	19,8	19,8	19,8	10,0	18,0	16,5									
			17,0	16,3	20,8	23,8	23,8	23,8	22,0	11,3	11,3	19,1	19,1	22,3									
			16,3	20,8	23,8	23,8	23,8	22,0	11,3	11,3	19,1	19,1	22,3	18,7									
			16,3	20,8	23,8	23,8	23,8	22,0	11,3	11,3	19,1	19,1	22,3	18,7									
	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)		18,5	18,5	20,0	19,3	20,7	8,0	8,0	18,3	18,3	18,7	18,0	16,3	13,3	13,9	13,9	13,9	17,0	6,7	3,0		
			18,5	18,5	20,0	19,3	20,7	8,0	8,0	18,3	18,3	18,7	18,0	16,3	13,3	13,9	13,9	13,9	17,0	6,7	3,0		
			18,5	18,5	20,0	19,3	20,7	8,0	8,0	18,3	18,3	18,7	18,0	16,3	13,3	13,9	13,9	13,9	17,0	6,7	3,0		
			15,2	15,2	18,7	20,7	22,7	23,7	22,7	22,3	20,8	20,8	20,8	21,7	20,3	20,3	19,0	19,0	15,7	7,2	7,2		
			15,2	15,2	18,7	20,7	22,7	23,7	22,7	22,3	20,8	20,8	20,8	21,7	20,3	20,3	19,0	19,0	15,7	7,2	7,2		
			15,2	15,2	18,7	20,7	22,7	23,7	22,7	22,3	20,8	20,8	20,8	21,7	20,3	20,3	19,0	19,0	15,7	7,2	7,2		

Tabela 20: Dados referentes ao CONSUMO DE RAÇÃO (g) das ratas do grupo Gestante Restrita (GR) (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas).

Dias		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Não Gestante Padrão (NGP) Consumo de água (ml)	Período 1 (1ª semana)	32,5	31,0	31,0	21,7	23,3																
		32,5	31,0	31,0	21,7	23,3																
		31,0	31,0	21,7	23,3	50,0																
		21,7	11,1	11,1	11,1	35,0																
		21,7	11,1	11,1	11,1	35,0																
		21,7	11,1	11,1	11,1	35,0																
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)	20,0	15,0	15,0	27,5	25,0	25,0	29,2	29,2	28,3	36,7	33,3	26,7									
		20,0	15,0	15,0	27,5	25,0	25,0	29,2	29,2	28,3	36,7	33,3	26,7									
		29,2	29,2	28,3	36,7	33,3	26,7	37,5	37,5	37,5	32,5	37,5	32,5									
		25,0	28,3	31,7	30,6	30,6	30,6	40,0	42,5	42,5	40,8	40,8	31,7	30,0								
		28,3	31,7	30,6	30,6	30,6	40,0	42,5	42,5	40,8	40,8	31,7	30,0									
		28,3	31,7	30,6	30,6	30,6	40,0	42,5	42,5	40,8	40,8	31,7	30,0									
	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	18,3	18,3	16,7	21,7	28,3	30,0	30,0	31,7	31,7	60,0	30,0	26,7	25,0	30,0	30,0	26,7	26,7	30,0	25,0		
		18,3	18,3	16,7	21,7	28,3	30,0	30,0	31,7	31,7	60,0	30,0	26,7	25,0	30,0	30,0	26,7	26,7	30,0	25,0		
		18,3	18,3	16,7	21,7	28,3	30,0	30,0	31,7	31,7	60,0	30,0	26,7	25,0	30,0	30,0	26,7	26,7	30,0	25,0		
		25,0	25,0	25,0	22,5	23,3	20,0	16,7	13,3	16,7	16,7	16,7	25,0	29,2	29,2	24,2	24,2	28,3	35,0	35,0		
		25,0	25,0	25,0	22,5	23,3	20,0	16,7	13,3	16,7	16,7	16,7	25,0	29,2	29,2	24,2	24,2	28,3	35,0	35,0		
		23,3	20,0	16,7	13,3	16,7	16,7	16,7	25,0	29,2	29,2	24,2	24,2	28,3	35,0	35,0	22,5	7,5	7,5	32,5		

Tabela 21: Dados referentes ao CONSUMO DE ÁGUA (ml) das ratas do grupo Não Gestante Padrão (NGP) (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas).

		Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Não Gestante Restrita (NGR)	Período 1 (1ª semana)		25,0	23,3	23,3	28,3	25,0																
			25,0	23,3	23,3	28,3	25,0																
			23,3	23,3	28,3	25,0	45,0																
			23,3	19,4	19,4	19,4	21,7																
			23,3	19,4	19,4	19,4	21,7																
			23,3	19,4	19,4	19,4	21,7																
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)		15,0	12,5	20,0	22,5	21,3	21,3	25,8	25,8	23,3	20,0	25,0	16,7									
			15,0	12,5	20,0	22,5	21,3	21,3	25,8	25,8	23,3	20,0	25,0	16,7									
			25,8	25,8	23,3	20,0	25,0	16,7	23,3	23,3	23,3	30,0	35,0	35,0									
			21,7	20,0	21,1	21,1	21,1	26,7	14,2	14,2	28,3	28,3	25,0	23,3									
			21,7	20,0	21,1	21,1	21,1	26,7	14,2	14,2	28,3	28,3	25,0	23,3									
			21,7	20,0	21,1	21,1	21,1	26,7	14,2	14,2	28,3	28,3	25,0	23,3									
	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)		23,2	23,2	18,3	20,0	25,0	24,2	24,2	33,3	33,3	21,7	25,0	28,3	18,3	26,7	26,7	28,3	25,0	23,3	25,0		
			23,2	23,2	18,3	20,0	25,0	24,2	24,2	33,3	33,3	21,7	25,0	28,3	18,3	26,7	26,7	28,3	25,0	23,3	25,0		
			23,2	23,2	18,3	20,0	25,0	24,2	24,2	33,3	33,3	21,7	25,0	28,3	18,3	26,7	26,7	28,3	25,0	23,3	25,0		
			22,5	22,5	20,0	20,0	21,7	23,3	16,7	6,7	20,6	20,6	20,6	25,0	26,7	26,7	22,5	22,5	56,7	29,2	29,2		
			22,5	22,5	20,0	20,0	21,7	23,3	16,7	6,7	20,6	20,6	20,6	25,0	26,7	26,7	22,5	22,5	56,7	29,2	29,2		
			21,7	23,3	16,7	6,7	20,6	20,6	20,6	25,0	26,7	26,7	22,5	22,5	56,7	29,2	29,2	15,0	17,5	17,5	20,0		

Tabela 22: Dados referentes ao CONSUMO DE ÁGUA (ml) das ratas do grupo Não Gestante Restrita (NGR) (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas).

Dias		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Gestante Padrão (GP)	Período 1 (1ª semana)	37,5	20,8	20,8	30,0	31,7																
		37,5	20,8	20,8	30,0	31,7																
		20,8	20,8	30,0	31,7	28,3																
		20,0	22,2	22,2	22,2	25,0																
		20,0	22,2	22,2	22,2	25,0																
		20,0	22,2	22,2	22,2	25,0																
	Consumo de água (ml)	Período 2 (1ª e 2ª semanas)	25,0	17,5	27,5	35,0	40,0	40,0	31,7	31,7	36,7	23,3	40,0	33,3								
			25,0	17,5	27,5	35,0	40,0	40,0	31,7	31,7	36,7	23,3	40,0	33,3								
			31,7	31,7	36,7	23,3	40,0	33,3	36,7	36,7	36,7	30,0	35,0	32,5								
			18,8	18,8	22,9	22,9	22,9	33,8	31,3	31,3	25,0	25,0	30,0	20,0								
			18,8	18,8	22,9	22,9	22,9	33,8	31,3	31,3	25,0	25,0	30,0	20,0								
			18,8	18,8	22,9	22,9	22,9	33,8	31,3	31,3	25,0	25,0	30,0	20,0								
Consumo de água (ml)	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	15,0	15,0	16,7	18,3	25,0	28,3	28,3	33,3	33,3	36,7	51,7	48,3	49,0	50,0	50,0	51,7	53,3	60,0	53,3		
		15,0	15,0	16,7	18,3	25,0	28,3	28,3	33,3	33,3	36,7	51,7	48,3	49,0	50,0	50,0	51,7	53,3	60,0	53,3		
		15,0	15,0	16,7	18,3	25,0	28,3	28,3	33,3	33,3	36,7	51,7	48,3	49,0	50,0	50,0	51,7	53,3	60,0	53,3		
		32,5	32,5	37,5	35,0	35,0	31,3	32,5	30,0	34,6	34,6	34,6	38,8	46,9	46,9	40,0	40,0	45,0	49,4	49,4		
		32,5	32,5	37,5	35,0	35,0	31,3	32,5	30,0	34,6	34,6	34,6	38,8	46,9	46,9	40,0	40,0	45,0	49,4	49,4		
		35,0	31,3	32,5	30,0	34,6	34,6	34,6	38,8	46,9	46,9	40,0	40,0	45,0	49,4	49,4	35,0	17,5	17,5	35,0		

Tabela 23: Dados referentes ao CONSUMO DE ÁGUA (ml) das ratas do grupo Gestante Padrão (GP) (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas).

Dias		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Gestante Restrita (GR) Consumo de água (ml)	Período 1 (1ª semana)	25,0	26,3	26,3	25,0	25,0																
		25,0	26,3	26,3	25,0	25,0																
		25,0	26,3	26,3	25,0	25,0																
		22,5	25,0	25,8	25,8	25,8																
		22,5	25,0	25,8	25,8	25,8																
		25,0	25,8	25,8	25,8	26,3																
	Período 2 (1ª e 2ª semanas)	30,0	25,0	30,0	35,0	37,5	37,5	35,0	35,0	31,3	40,0	40,0	31,3									
		30,0	25,0	30,0	35,0	37,5	37,5	35,0	35,0	31,3	40,0	40,0	31,3									
		35,0	35,0	31,3	40,0	40,0	31,3	33,3	33,3	33,3	27,5	25,0	27,5									
		30,0	25,0	31,3	37,5	37,5	37,5	56,3	20,6	20,6	49,4	49,4	53,8									
		25,0	31,3	37,5	37,5	37,5	56,3	20,6	20,6	49,4	49,4	53,8	45,0									
		25,0	31,3	37,5	37,5	37,5	56,3	20,6	20,6	49,4	49,4	53,8	45,0									
	Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	20,8	20,8	21,7	18,3	31,7	34,2	34,2	42,5	42,5	40,0	46,7	60,0	38,3	48,3	48,3	61,7	50,0	63,3	46,7		
		20,8	20,8	21,7	18,3	31,7	34,2	34,2	42,5	42,5	40,0	46,7	60,0	38,3	48,3	48,3	61,7	50,0	63,3	46,7		
		20,8	20,8	21,7	18,3	31,7	34,2	34,2	42,5	42,5	40,0	46,7	60,0	38,3	48,3	48,3	61,7	50,0	63,3	46,7		
20,8		20,8	21,7	18,3	26,7	16,7	26,7	31,7	28,9	28,9	28,9	33,3	44,2	44,2	31,7	31,7	40,0	45,8	45,8			
20,8		20,8	21,7	18,3	26,7	16,7	26,7	31,7	28,9	28,9	28,9	33,3	44,2	44,2	31,7	31,7	40,0	45,8	45,8			
20,8		20,8	21,7	18,3	26,7	16,7	26,7	31,7	28,9	28,9	28,9	33,3	44,2	44,2	31,7	31,7	40,0	45,8	45,8			

Tabela 24: Dados referentes ao CONSUMO DE ÁGUA (ml) das ratas do grupo Gestante Restrita (GR) (n=18), aferidos ao longo de 3 períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas).

Grupos	Pesos Encefálicos (g)			
	NGP	NGR	GP	GR
Período 1 (1ª semana)	1,99	1,97	1,86	1,95
	1,89	1,85	1,94	1,90
	1,93	1,90	1,96	1,91
	1,86	1,93	1,99	2,00
	2,16	1,94	2,04	1,56
	1,92	1,93	1,99	1,94
Período 2 (1ª e 2ª semanas)	1,97	1,93	1,92	1,89
	1,90	1,94	1,92	1,91
	2,01	1,94	1,89	1,89
	1,95	1,84	1,95	1,88
	1,91	1,88	1,99	1,96
	2,02	1,98	1,93	1,95
Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	1,90	1,86	1,89	1,91
	1,99	1,99	1,89	1,89
	1,87	1,88	1,96	1,95
	1,87	2,08	2,02	1,94
	1,90	1,97	1,90	1,90
	1,96	1,94	2,03	1,96

Tabela 25: Dados referentes aos PESOS ENCEFÁLICOS (g) das ratas dos 4 grupos nos 3 Períodos (1, 2 e 3 n=24 cada). Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita.

	FP (fetos de mães GP)			FR (fetos de mães GR)		
	Ratas GP	Número de fetos	Média do peso (g)	Ratas GR	Número de fetos	Média do peso (g)
Período 1 (1ª semana)	1	13		1	14	
	2	12		2	9	
	3	13		3	12	
	4	13		4	11	
	5	12		5	6	
	6	12		6	10	
Período 2 (1ª e 2ª semanas)	7	13	0,34	7	12	0,31
	8	12	0,39	8	13	0,30
	9	11	0,31	9	14	0,26
	10	15	0,29	10	12	0,31
	11	16	0,30	11	13	0,31
	12	13	0,34	12	14	0,31
Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	13	12	2,41	13	12	2,21
	14	10	2,74	14	10	2,20
	15	12	2,54	15	12	2,30
	16	7	2,49	16	11	2,11
	17	13	2,23	17	3	2,62
	18	10	2,50	18	12	2,18

Tabela 26: Dados referentes à **QUANTIDADE DE FETOS (FP e FR)** e à **média do PESO DOS FETOS (g)** obtidos por cada uma das ratas gestantes (GP e GR) nos 3 Períodos (1, 2 e 3). Grupos: FP = fetos provenientes de gestantes padrões (GP); FR = fetos provenientes de gestantes restritas (GR).

		<i>LTE (segundos)</i>							
Animais	NGP	Esquiva Inibitória			Fuga				
		Linha de Base	Esquiva 1	Esquiva 2	Esquiva 3	Fuga 1	Fuga 2	Fuga 3	Fuga 4
Período 1 (1ª semana)	1	8	4	5	4	5	2	2	2
	2	4	300	48	95	4	6	28	39
	3	5	5	45	6	4	4	7	3
	4	7	3	225	8	4	2	4	2
	5	5	31	4	5	4	8	7	22
	6	14	56	158	55	14	12	8	25
Período 2 (1ª e 2ª semanas)	7	17	10	184	245	3	2	3	1
	8	5	16	46	8	2	3	17	3
	9	4	9	34	3	3	10	6	5
	10	6	5	300	17	2	2	35	2
	11	13	21	8	3	11	24	6	2
	12	6	8	46	6	4	17	10	5
Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	13	14	13	21	10	4	7	40	14
	14	6	7	27	5	16	11	10	4
	15	10	13	182	25	10	18	13	9
	16	242	300	300	300	8	28	61	21
	17	4	8	26	7	11	7	11	4
	18	4	5	6	5	4	3	18	2
Média ± SEM		20,8 ± 13	45,2 ± 22,1	92,5 ± 24,3	44,8 ± 20,4	6,7 ± 1	9,2 ± 1,8	15,8 ± 3,7	9,1 ± 2,5

Tabela 27: Dados referentes ao **DESEMPENHO DOS ANIMAIS** do grupo **Não Gestante Padrão (NGP)** no teste labirinto em T-elevado (**LTE**). Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das tentativas dos testes Esquiva Inibitória (Linha de Base, Esquiva 1, 2 e 3) e Fuga (Fugas 1, 2, 3 e 4). As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	LTE (segundos)								
	NGR	Esquiva Inibitória			Fuga				
		Linha de Base	Esquiva 1	Esquiva 2	Esquiva 3	Fuga 1	Fuga 2	Fuga 3	Fuga 4
Período 1 (1ª semana)	1	19	300	300	300	5	6	11	2
	2	5	7	10	140	7	37	15	12
	3	4	3	4	5	6	7	6	4
	4	11	11	160	9	1	2	2	6
	5	17	16	12	8	12	5	8	10
	6	3	4	12	4	7	3	2	9
Período 2 (1ª e 2ª semanas)	7	300	198	300	290	7	14	33	5
	8	6	4	155	300	9	4	4	7
	9	5	10	20	4	2	2	3	4
	10	12	47	217	193	3	5	8	2
	11	6	3	14	7	3	3	5	3
	12	8	6	11	9	3	3	6	4
Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	13	12	5	300	300	4	4	2	2
	14	4	7	27	4	3	3	3	3
	15	5	300	300	300	11	4	9	3
	16	99	19	176	12	4	2	2	4
	17	42	300	145	300	13	13	9	10
	18	4	9	31	11	8	5	6	6
Média ± SEM	31,2 ± 16,7	69,3 ± 27,1	121,8 ± 28,2	122 ± 32,5	6 ± 0,8	6,7 ± 1,9	7,4 ± 1,7	5,3 ± 0,7	

Tabela 28: Dados referentes ao **DESEMPENHO DOS ANIMAIS** do grupo **Não Gestante Restrita (NGR)** no teste labirinto em T-elevado (LTE). Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das tentativas dos testes Esquiva Inibitória (Linha de Base, Esquiva 1, 2 e 3) e Fuga (Fugas 1, 2, 3 e 4). As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	LTE (segundos)								
	GP	Esquiva Inibitória			Fuga				
		Linha de Base	Esquiva 1	Esquiva 2	Esquiva 3	Fuga 1	Fuga 2	Fuga 3	Fuga 4
Período 1 (1ª semana)	1	5	3	8	19	3	13	11	9
	2	6	5	6	6	10	3	2	5
	3	4	4	6	6	12	10	4	3
	4	5	207	300	300	6	4	18	4
	5	6	7	34	57	5	2	10	2
	6	9	3	5	3	3	8	2	3
Período 2 (1ª e 2ª semanas)	7	4	5	10	6	9	5	4	5
	8	4	8	53	4	6	4	4	3
	9	6	4	300	300	3	5	9	6
	10	6	8	67	7	7	11	25	3
	11	8	5	9	6	4	5	7	3
	12	5	6	300	6	8	3	4	4
Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	13	7	5	6	5	3	4	2	1
	14	6	19	10	21	6	8	15	13
	15	4	9	29	17	6	19	31	3
	16	5	3	10	5	12	4	3	9
	17	5	15	166	7	7	14	17	9
	18	13	69	13	14	3	19	5	6
Média ± SEM	6 ± 0,5	21,3 ± 11,4	74 ± 26,1	43,8 ± 22,1	6,2 ± 0,7	7,8 ± 1,2	9,6 ± 2	5 ± 0,7	

Tabela 29: Dados referentes ao **DESEMPENHO DOS ANIMAIS** do grupo **Gestante Padrão (GP)** no teste labirinto em **T-elevado (LTE)**. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das tentativas dos testes **Esquiva Inibitória (Linha de Base, Esquiva 1, 2 e 3)** e **Fuga (Fugas 1, 2, 3 e 4)**. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	LTE (segundos)								
	GP	Esquiva Inibitória			Fuga				
		Linha de Base	Esquiva 1	Esquiva 2	Esquiva 3	Fuga 1	Fuga 2	Fuga 3	Fuga 4
Período 1 (1ª semana)	1	4	3	300	300	5	4	5	8
	2	4	4	300	300	4	8	8	300
	3	4	3	13	4	4	11	7	4
	4	6	3	10	10	11	4	3	2
	5	16	11	278	6	24	7	4	2
	6	7	15	300	160	3	2	2	3
Período 2 (1ª e 2ª semanas)	7	4	13	300	133	3	21	13	4
	8	6	6	24	11	9	4	3	2
	9	3	4	23	3	3	5	6	4
	10	51	6	22	6	5	19	6	4
	11	10	13	8	268	3	4	3	6
	12	5	29	238	55	2	2	2	2
Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas)	13	300	300	300	300	6	19	19	16
	14	300	300	7	14	5	27	12	5
	15	7	11	300	5	31	17	300	120
	16	4	3	268	280	10	69	12	24
	17	3	3	7	8	5	3	2	4
	18	43	6	153	16	6	19	23	15
Média ± SEM	43,1 ± 22,2	40,7 ± 22,2	158,3 ± 32,3	104,3 ± 29,7	7,2 ± 1,8	13,6 ± 3,7	23,8 ± 16,3	29,1 ± 17,1	

Tabela 30: Dados referentes ao **DESEMPENHO DOS ANIMAIS** do grupo **Gestante Restrita (NGR)** no teste labirinto em T-elevado (LTE). Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das tentativas dos testes Esquiva Inibitória (Linha de Base, Esquiva 1, 2 e 3) e Fuga (Fugas 1, 2, 3 e 4). As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais		Sangue			Hipocampo			Tálamo		
		B1 (n=67)	TMP (n=66)	TDP (n=71)	B1 (n=49)	TMP (n=67)	TDP (n=72)	B1 (n=33)	TMP (n=60)	TDP (n=72)
NGP	Período 1	372,4 ± 80,9	133 ± 28,2	319,9 ± 34,5	0,2 ± 0,05	2,16 ± 0,71	8,96 ± 0,31	0,2 ± 0,007	1,25 ± 0,24	7,19 ± 0,42
	Período 2	169,3 ± 51	133,5 ± 32,6	338,8 ± 28,6	0,3 ± 0,11	2,85 ± 0,65	7,52 ± 1	2 ± 0,37	1,47 ± 0,32	6,26 ± 0,38
	Período 3	171,2 ± 21,1	52,1 ± 5,6	331,5 ± 78,5	1,8 ± 0,08	0,45 ± 0,11	6,34 ± 0,63	2,42 ± 0,06	0,29 ± 0,04	5,14 ± 0,78
NGR	Período 1	300,7 ± 130,4	186 ± 79,2	332 ± 89,6	0,26 ± 0,06	2,22 ± 0,61	9,38 ± 0,49	0,33 ± 0,02	1,44 ± 0,38	7,32 ± 0,73
	Período 2	134,8 ± 45,4	70,4 ± 15	106 ± 11,1	0,29 ± 0,06	1,34 ± 0,3	7,58 ± 0,11	1,63 ± 0,56	0,76 ± 0,23	6,57 ± 0,58
	Período 3	95,5 ± 20,7	20,6 ± 6,4	102,2 ± 21,6	0,83 ± 0,04	0,25 ± 0,01	5,44 ± 0,33	0,86 ± 0,05	0,16 ± 0,03	5,22 ± 0,49
GP	Período 1	587,4 ± 203,5	331,8 ± 107,7	545,7 ± 157,7	0,29 ± 0,05	2,55 ± 0,7	10 ± 0,16	0,23 ± 0,006	1,23 ± 0,23	8,19 ± 0,47
	Período 2	299,1 ± 61,7	127,7 ± 43,1	290,1 ± 23,2	0,27 ± 0,11	2,44 ± 0,74	8,6 ± 0,74	2,17 ± 0,47	1,29 ± 0,32	6,83 ± 0,67
	Período 3	180,5 ± 15,9	39,9 ± 7,4	331,5 ± 78,5	1,89 ± 0,06	0,35 ± 0,01	7,2 ± 0,58	1,80 ± 0,15	0,22 ± 0,02	5,66 ± 0,81
GR	Período 1	395,8 ± 88,6	123,9 ± 19,9	209,3 ± 18,5	0,38 ± 0,06	1,76 ± 0,49	8,61 ± 0,18	0,37 ± 0,008	2,2 ± 0,56	6,83 ± 0,38
	Período 2	126,6 ± 12,6	55,4 ± 10,4	105,2 ± 8,5	0,27 ± 0,05	1,26 ± 0,22	7,31 ± 0,37	0,56 ± 0,04	0,46 ± 0,04	5,53 ± 1,11
	Período 3	99,1 ± 10,6	36,7 ± 11,6	108,4 ± 24,5	0,57 ± 0,06	0,23 ± 0,04	5,12 ± 0,13	0,62 ± 0,11	0,17 ± 0,01	4,57 ± 0,35

Tabela 31: Valores que representam a média (nmol/L sangue e nmol/g tecido) ± erro padrão das **CONCENTRAÇÕES DE TIAMINA E SEUS DERIVADOS NAS AMOSTRAS DE SANGUE, HIPOCAMPO E TÁLAMO** dos 4 grupos nos 3 Períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas). . Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita.

Animais		BDNF	
		Plasma	Hipocampo
NGP	Período 1	692,3 ± 48,4	5,75 ± 0,8
	Período 2	656,5 ± 41,7	5,65 ± 0,6
	Período 3	762,2 ± 19,6	6,25 ± 0,6
NGR	Período 1	717,7 ± 37,4	5,98 ± 0,5
	Período 2	681,8 ± 55,5	6 ± 0,6
	Período 3	798,5 ± 33,4	6,76 ± 0,8
GP	Período 1	682,6 ± 35,7	5,46 ± 0,4
	Período 2	699,9 ± 33,1	5,67 ± 0,5
	Período 3	537,4 ± 57,8	5,24 ± 0,7
GR	Período 1	686,5 ± 40,7	5,72 ± 0,7
	Período 2	811,1 ± 29,1	6,21 ± 0,7
	Período 3	609,9 ± 48,9	5,72 ± 0,6

Tabela 32: Valores que representam a média (pg/ml plasma e pg/g tecido) ± erro padrão das **CONCENTRAÇÕES DE BDNF NAS AMOSTRAS DE PLASMA E HIPOCAMPO** dos 4 grupos nos 3 Períodos: Período 1 (1ª semana), Período 2 (1ª e 2ª semanas) e Período 3 (1ª, 2ª e 3ª semanas). . Grupos: NGP= Não Gestante Padrão; NGR= Não Gestante Restrita; GP= Gestante Padrão; GR= Gestante Restrita.

Parâmetros analisados		Análise de Regressão		
		F	p	R Múltiplo
B 1	sangue x hipocampo	F (1,43) = 1,09	0,30	0,15
	sangue x tálamo	F (1,27) = 5,38	0,02	0,41
	hipocampo x tálamo	F (1,32) = 12,4	0,001	0,53
TMP	sangue x hipocampo	F (1,61) = 8,13	0,005	0,34
	sangue x tálamo	F (1,55) = 3,59	0,06	0,24
	hipocampo x tálamo	F (1,59) = 21,76	1,85E -05	0,52
TDP	sangue x hipocampo	F (1,69) = 1,28	0,260	0,13
	sangue x tálamo	F (1,69) = 14,5	0,0003	0,41
	hipocampo x tálamo	F (1,71) = 13,7	0,0004	0,4
BDNF	plasma x hipocampo	F (1,70) = 28,8	9,81 E-07	0,54

Tabela 33: ANÁLISES DE REGRESSÃO LINEAR DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (tiamina e seus derivados / BDNF) entre as amostras periféricas e centrais (sangue x hipocampo; sangue x tálamo; plasma e hipocampo) e entre as amostras centrais (hipocampo x tálamo).

- Aberle NSII, Burd L, Zhao BH, Ren J. Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not vitamins B6 or B12. *Alcohol Alcohol*. 2004; 39: 450-454.
- Adamolekun B. Etiology of Konzo, epidemic spastic paraparesis associated with cyanogenic glycosides in cassava: Role of thiamine deficiency? *Journal of the Neurological Sciences*. 2010; 296(1-2):30-3.
- Alcaide ML, Jayaweera D, Espinoza L, Kolber M. Wernicke's encephalopathy in AIDS: a preventable cause of fatal neurological deficit. *Int J STD AIDS*. 2003; 14(10): 712-713.
- Alder J, Fink N, Bitzer J, Hösli I, Holzgreve W. Depression and anxiety during pregnancy: a risk factor for obstetric, fetal and neonatal outcome? A critical review of the literature. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2007; 20(3):289-209.
- Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein malnutrition affects avoidance but not escape behavior in the elevated T-maze test. *Physiol Behav*. 1996; 60(1):191-5.
- Andrade PR. *Níveis de GABA e Glutamato Centrais e Aspectos Cognitivos em Modelo Experimental de Deficiência Grave de Tiamina*. 2011. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – UFMG, Belo Horizonte, 2011.
- Bâ A, Ser BV, Aka KJ, Glin L, Tako A. Comparative effects of developmental thiamine deficiencies and ethanol exposure on the morphometry of the CA3 pyramidal cells. *Neurotoxicol. Teratol*. 1999; 21: 579-586.
- Bâ A, Seri BV, Han SH. Thiamine administration during chronic alcohol intake in pregnant and lactating rats: effects on the offspring neurobehavioral development. *Alcohol Alcohol*. 1996; 31: 27-40.
- Bâ A, N'Douba V, D'Almeida MA, Seri BV. Effects of maternal thiamine deficiencies on the pyramidal and granule cells of the hippocampus of rats pups. *Acta Neurobiol Exp*. 2005; 65(4):387-98.
- Bâ A. Alcohol and B1 vitamin deficiency-related stillbirths. *J Matern. Fetal Neonatal Med*. 2009; 22(5):452-7.
- Bâ A. Functional vulnerability of developing central nervous system to maternal thiamine deficiencies in the rat. *Dev Psychobiol*. 2005; 47(4):408-14.
- Bâ A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2008; 28(7):923-31.

- Baker H, DeAngelis B, Holland B, Gittens-Williams L, Barrett T. Vitamin Profile of 563 Gravidas during Trimesters of Pregnancy. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002; 21(1):33–37.
- Baker H, Frank O, Thomsom AD, Langer A, Munves ED, DeAngelis B, Kaminetzky HA. Vitamin profile of 174 mothers and newborns at parturition. *Am J Clin Nutr*. 1975; 28:59–65.
- Baker H, Frank O, Fennelly JJ, Leevy CM. A Method for Assaying Thiamine Status in Man and Animals. *Am J Clin Nutr*. 1964; 14:197-201.
- Bakker SJL, ter Maaten JC, Gans R OB. Thiamine supplementation to prevent induction of low birth weight by conventional therapy for gestational diabetes mellitus. *Medical Hypotheses*. 2000; 55(1): 88–90.
- Bamji MS, V S Murthy PV, Willians L, Vardhana Rao MV. Maternal nutrition status & practices & perinatal, neonatal mortality in rural Andhra Pradesh, India. *Indian J Med Res*. 2008; 127(1):44-51.
- Bamji MS. Enzyme evaluation of thiamin, riboflavin and pyridoxine status of parturient women and their new born infants. *Br J Nutr*. 1976; 35:259-265.
- Basoglu M, Yetimalar Y, Gurgor N, et al. Neurological complications of prolonged hunger strike. *Eur J Neurol*. 2006;13:1089–1097.
- Batifoulier F, Verny MA, Besson C, Demigné C, Rémésy C. Determination of thiamine and its phosphate esters in rat tissues analyzed as thiochromes on a RP-amide C16 column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005; 816(1-2):67-72.
- Bell JM, Stewart CN. Effects of fetal and early postnatal thiamin deficiency on avoidance learning in rats. *Journal of Nutrition*. 1979; 109:1577–1583.
- Bennett HA, Einarson A, Taddio A, Koren G, Einarson TR. Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. *Obstet Gynecol*. 2004; 103 (4): 698-709.
- Berg, J M, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry 5 rd edition. *Editora Guanabara Koogan*. 2004.
- Bettendorff L, Wins P, Lesourd M. Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1222(1):1-6.
- Bettendorff L, Wins P. Thiamine diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamine metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. *FEBS J*. 2009; 276(11):2917-2925.

- Bettendorff L, Peeters M, Jouan C, Wins P, Schoffeniels E. Determination of thiamin and its phosphate esters in cultured neurons and astrocytes using an ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatographic method. *Analytical Biochemistry*. 1991; 198(1):52-9.
- Bettendorff L, Grandfils C, De Rycker C, Schoffeniels E. Determination of thiamine and its phosphate esters in human blood serum at femtomole levels. *J Chromatogr*. 1986; 382:297-302.
- Bigelow JA, Houpt TR. Feeding and drinking patterns in young pigs. *Physiology and Behavior*. 1988; 43, 99–109
- Blackburn ST. Maternal, fetal and neonatal physiology: a clinical perspective. *New York: Elsevier*. 2003.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*. 1988;39(1):43-68.
- Bosch EP, Pelham RW, Rasool CG, Chatterjee A, Lash RW, Brown L, Munsat TL, Bradley WG. Animal models of alcoholic neuropathy: morphologic, electrophysiologic, and biochemical findings. *Muscle Nerve*. 1979; 2(2):133-44.
- Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Progress in Neurobiology*. 2005; 76:99–125
- Brown ML, Snodgrass CH. Effect of dietary level of thiamine on reproduction in the rat. *J Nutr*. 1965; 85:102-6.
- Brummelte S, Galea LA. Depression during pregnancy and postpartum: contribution of stress and ovarian hormones. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(5):766-76.
- Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008;11:1169–80.
- Buist AE, Barnett BE, Milgrom J, Pope S, Condon JT, Ellwood DA, Boyce PM, Austin MP, Hayes BA. To screen or not to screen – that is the question in perinatal depression. *Med J Aust*. 2002 Oct 7;177
- Butterworth RF, Kril J J, Harpe CG. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993; 17(5):1084-8.

- Butterworth RF. Maternal thiamine deficiency: still a problem in some world. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:712–3.
- Butterworth RF. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. *Metab Brain Dis.* 2009; 24(1): 189-196.
- Cahir M, Ardis TC, Elliott JJ, Kelly CB, Reynolds GP, Cooper SJ. Acute tryptophan depletion does not alter central or plasma brain-derived neurotrophic factor in the rat. *European Neuropsychopharmacology.* 2008; 18: 317–322
- Camacho R, Cantinelli F, Ribeiro C, Cantinilo A, Gosnsales BK, Braguittoni E, Rennó Jr J. Transtornos psiquiátricos na gestação e no puerpério: classificação, diagnóstico e tratamento. *Rev Psiq Clin.* 2006; 33(2):92-102.
- Carvalho FM, Pereira SR, Pires RG, Ferraz VP, Romano-Silva MA, Oliveira-Silva IF, Ribeiro AM. Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006; 83: 481-489.
- Casarotto PC, de Bortoli VC, Zangrossi H Jr. Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. *Behav Pharmacol.* 2012;23(1):80-8.
- Cassiman D, Deneef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology.* 2001; 33:148–158.
- Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, Lee FS. Variant Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Met66) Alters the Intracellular Trafficking and Activity-Dependent Secretion of Wild-Type BDNF in Neurosecretory Cells and Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience.* 2004; 24(18):4401– 4411
- Chevrel G, Hohlfeld R, Sendtner M. The role of neurotrophins in muscle under physiological and pathological conditions. *Muscle Nerve.* 2006; 33(4):462-76.
- Christodoulou DK, Katsanos KH, Makrydimas G, Tsanadis G, Tsianos EV. Peripheral parenteral nutrition in protracted hyperemesis gravidarum--report of two cases and a literature review. *Acta Gastroenterol Belg.* 2008; 71(2):259-62.
- Ciccia RM, Langlais PJ. An examination of the synergistic interaction of ethanol and thiamine deficiency in the development of neurological signs and long term cognitive and memory impairments. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000; 24(5):622-34.
- Colosimo EA, Giolo SR. Análise de Sobrevivência Aplicada. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci.* 1997; 17:2295–2313.
- Cooper RL, Goldman JM, Vanderbergh JG. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. *Female Reprod Toxicol*, 1993; 3: 45-56.
- Coupé B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Lefèvre F, Mairesse J, Dickes-Coopman A, Silhol M, Tapia-Arancibia L, Lesage J, Vieau D. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol.* 2009; 21: 40-8.
- Cowley JJ. Time, place and nutrition: some observations from animal studies. *Malnutrition, Learning and Behavior.* 1968; 218.
- Croen LA, Goines P, Braunschweig D, Yolken R, Yoshida CK, Grether JK, Fireman B, Kharrazi M, Hansen RL, Van de Water J. Brain-derived neurotrophic factor and autism: maternal and infant peripheral blood levels in the Early Markers for Autism (EMA) Study. *Autism Res.* 2008;1(2):130-7.
- Czerniecki J, Chanas G, Verlaet M, Bettendorff L, Makarchikov AF, Leprince P, Wins P, Grisar T, Lakaye B. Neuronal localization of the 25-kDa specific thiamine triphosphatase in rodent brain. *Neuroscienc.* 2004; 125(4): 833-840.
- Dayan J, Creveuil C, Dreyfus M, Herlicoviez M, Baleyte JM, O'Keane V. Developmental Model of Depression Applied to Prenatal Depression: Role of Present and Past Life Events, Past Emotional Disorders and Pregnancy Stress. *PLoS One.* 2010; 5(9):e12942.
- de Paula Soares V, Vicente MA, Biojone C, Zangrossi H Jr, Guimarães FS, Joca SR. Distinct behavioral consequences of stress models of depression in the elevated T-maze. *Behav Brain Res.* 2011; 225(2):590-5.
- Drewett R, Wolke D, Asefa M, Kaba M, Tessera F. Malnutrition and Mental Development: Is there a sensitive period? A Nested Case-Control Study. *J Child Psychol. Psychiat.* 2000; 42; 181-187.
- Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2006; 59(12):1116–1127.
- Dunkel Schetter C, Tanner L. Anxiety, depression and stress in pregnancy: implications for mothers, children, research, and practice. *Curr Opin Psychiatry.* 2012; 25(2):141-8.

- Durany N, Michel T, Kurt J, Cruz-Sanchez FF, Cervos-Navarro J, Riederer P. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *Int J Dev Neurosci.* 2000; 18:807–13.
- Elfving B, Plougmann PH, Wegener G. Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: Pitfalls and solutions. *Journal of Neuroscience Methods.* 2010; 187:73–77.
- Eros E, Hajós A. Prevention of perinatal depression and anxiety with periconceptual care. *Orv Hetil.* 2011;152(23):903-8.
- Fayard B, Loeffler S, Weis J, Vogelin E, Kruttgen A. The Secreted Brain-Derived Neurotrophic Factor Precursor Pro-BDNF Binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. *Journal of Neuroscience Research.* 2005; 80:18-28.
- Ferreira-Vieira T. Restrição de tiamina no período perinatal induz, em animais na idade adulta, déficits motores e alterações em parâmetros centrais GABérgicos e glutamatérgicos. 2010. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – UFMG, Belo Horizonte, 2010.
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature.* 1996; 381:706–9.
- Fisher J, Tran H, Tran T. Relative socioeconomic advantage and mood during advanced pregnancy in Vietnam. *Int J Ment Health Syst.* 2007;1(1):3.
- Fitzsimons TJ, Le Magnen J. Eating as a regulatory control of drinking in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1969. 67(3):273-83.
- Fournier H, Butterworth RF. Effects of thiamine deficiency on thiamine-dependent enzymes in regions of the brain of pregnant rats and their offspring. *Metab Brain Dis.* 1990; 5:77-84.
- Freitas-Silva DM, Resende L de S, Pereira SR, Franco GC, Ribeiro AM. Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in rat offspring. *Behav Brain Res.* 2010; 211(1):33-40.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thrombosis and Haemostasis.* 2002; 87:728–734.

- Gangolf M, Czerniecki J, Radermecker M, Detry O, Nisolle M, et al. Thiamine Status in Humans and Content of Phosphorylated Thiamine Derivatives in Biopsies and Cultured Cells. *PLoS ONE*. 2010; 5(10): e13616.
- Genn RF, Tucci AS, Thomas A, Edwards JE, File SE. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003; 27(1-2):155-61.
- Gittelsohn J, Thapa M, Landman LT. Cultural factors, caloric intake and micronutrient sufficiency in rural Nepali household. *Soc Sci Med*. 1997; 44:1739–49.
- Goldberg DJ, Begenisich TB, Cooper JR. Effects of thiamine antagonists on nerve conduction. II. Voltage clamp experiments with antimetabolites. *J Neurobiol*. 2004; 6: 453-462.
- Gomez-Pinilla F, Vaynman S. A “deficient environment” in prenatal life may compromise systems important for cognitive function by affecting BDNF in the hippocampus. *Exp Neurol*. 2005; 192: 235–243.
- Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res*. 1993; 26(1):67-70.
- Graeff FG. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007;29 Suppl 1:S3-6.
- Granados-Rojas L, Larriva-Sahd J, Cintra L, Gutiérrez-Ospina G, Rondán A, Díaz-Cintra S. Prenatal protein malnutrition decreases mossy fibers-CA3 thorny excrescence asymmetrical synapses in adult rats. *Brain Res*. 2002; 933: 164-171.
- Greenwood C, Craig R. Dietary influences on brain function: Implications during periods of neuronal maturation. *Basic and Clinical Aspect of Nutrition and Brain Development*. 1987;16: 159-216.
- Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Wörtwein G. Increased Adult Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor and Normal Levels of Neurogenesis in Maternal Separation Rats. *J Neurosci Res*. 2005; 79(6):772-8.
- Griesbeck O, Parsadonian AS, Sendtner M, Thoenen H. Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res*. 1995;42(1):21-33.
- Haas RH. Thiamin and the brain. *Ann Ver Nutr*. 1988; 8: 483-515.

- Hakim, A.M. & Pappius, H.M. Sequence of metabolic, clinical and histological events in experimental thiamine deficiency. *Ann. Neurol.* 1983; 13: 365-375.
- Harper C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol.* 2009; 44(2): 136-40.
- Henningan A, O'Callaghan RM, Kelly AM. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35:424–427
- Héroux M, Butterworth RF. Regional alterations of thiamine phosphate esters and of thiamine diphosphate-dependent enzymes in relation to function in experimental Wernicke's encephalopathy. *Neurochem Res.* 1995; 20(1):87-93.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001; 24:677–736.
- Ikarashi Y, Iizuka S, Imamura S, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Kanno H, Kawakami Z, Yuzurihara M, Kase Y, Takeda S. Effects of yokukansan. The effect of *Coriandrum sativum* seed extract on the learning of newborn mice by electric shock: interaction with caffeine and diazepam. *Biol Pharm Bull.* 2009 Oct;32(10):1701-9.
- Imhof JT, Coelho ZM, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behav Brain Res.* 1993;56(2):177-80.
- Ishii K, Sarai K, Sanemori H, Kawasaki T. Analysis of thiamine and its phosphate esters by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry.* 1979a; 97: 191.
- Ishii K, Sarai K, Sanemori H, Kawasaki T. Concentrations of thiamine and its phosphate esters in rat tissues determined by high-performance liquid chromatography. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology.* 1979b; 25: 517.
- Ismail SK, Kenny L. Review on hyperemesis gravidarum. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2007; 21(5): 755–769.
- Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett.* 2002; 328(3): 261-4.
- Kawamura K, Kawamura N, Sato W, Fukuda J, Kumagai J, Tanaka T. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology.* 2009; 150(8):3774-82.

- Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. Liquid-Chromatographic Determination of the Total Thiamin Content of Blood. *Clin Chem.* 1982; 28(1):29-31.
- Kissileff HR. Food-associated drinking in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1969; 67(3):284-300.
- Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Etrup A, Rios M, Knudsen GM, Aznar S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011;14(3):347-53.
- Kopelman MD, Thomson AD, Guerrini I, Marshall EJ. The Korsakoff syndrome: clinical aspects, psychology and treatment. *Alcohol Alcohol.* 2009; 44(2): 148-154.
- Ladipo OA. Nutrition in pregnancy: mineral and vitamin supplements. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:280S-90S.
- Langhans W, Rossi R, Scharrer E. Relationship between feed and water intake in ruminants. In W. von Engelhardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves, & D. Giesecke (Eds.), *Ruminant physiology, digestion, metabolism, growth and reproduction*, 1995 (pp. 199-216). Stuttgart: Ferdinand and Enke.
- Langlais PJ, Mandel RJ, Mair RG. Diencephalic lesions, learning impairments and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. *Behav Brain Res.* 1992; 48: 177-185.
- Langlais PJ, Zhang SX, Savage LM. Neuropathology of thiamine deficiency: an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metab Brain Dis.* 1996; 11: 19-37.
- Langlais PJ, Zhang SX. Cortical and subcortical white matter damage without Wernicke's encephalopathy after recovery from thiamine deficiency in the rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21: 434-443.
- Langlais PJ, Savage LM. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. *Behav Brain Res.* 1995; 68(1):75-89.
- Laske C, Banschbach S, Stransky E, Bosch S, Straten G, Machann J, Fritsche A, Hipp A, Niess A, Eschweiler GW. Exercise-induced normalization of decreased BDNF serum concentration in elderly women with remitted major depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010;13(5):595-602
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 2003; 69:341-374.

- Levine MG, Esser D. Total parenteral nutrition for the treatment of severe hyperemesis gravidarum: maternal nutritional effects and fetal outcome. *Obstet Gynecol.* 1988; 72(1):102-7.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Rev. Neuromsci.* 1996; 19:289-317.
- Lin YT, Ro LS, Wang HL, Chen JC. Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study. *J Neuroinflammation.* 2011; 8:126.
- Lindsay, RM, Altar CA, Cedarbaum JM, Hyman C, Wiegand SJ. The therapeutic potential of neurotrophic factors in the treatment of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 1993; 124:103–118.
- Lommatzsch M, Hornych K, Zingle C, Schuff-Werner P, Höppne J, Virchow J. Maternal serum concentrations of BDNF and depression in the perinatal period. *Psychoneuroendocrinology.* 2006; 31(3):388-394.
- Lonstein JS. Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. *Horm Behav.* 2005; 47:241–55.
- Losa R, Sierra MI, Fernández A, Blanco D, Buesa JM. Determination of thiamine and its phosphorylated forms in human plasma, erythrocytes and urine by HPLC and fluorescence detection: a preliminary study on cancer patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 37(5):1025-9.
- Louvel E, Hugon J, Doble A. Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Pharm. Sci.* 1997; 18:196–203.
- Lu J, Frank EL. Rapid HPLC Measurement of Thiamine and Its Phosphate Esters in Whole Blood. *Clin Chem.* 2008; 54(5):901-6.
- Makarchikov A, Lakaye B, Gulyai IE, Czerniecki J, Coumans B, et al. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2003 60; 1477–1488.
- Marcus SM. Depression during pregnancy, rates, risks and consequences., *Can J Clin Pharmacology.* 2009; 16 (1); 15-22.
- Martin, PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhöfel S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res. Health.* 2003; 27(2):134-42.

- Martin, HP. Nutrition: its relationship to children's physical, mental, and emotional development . *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1973; 26: 766-775. Harold P. Martin, M.D.
- Matsushima K, MacManus JP, Hakim AM. Matsuhima, K.; Macmanus, P.; Hakim, A. M. Apoptosis is restricted to the thalamus in thiamine-deficient rats. *Neuroreport*. 1997; 8(4):867-70.
- Matthews VB, Aström MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerström T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*. 2009; 52(7):1409–1418.
- McFarland J, Salisbury AL, Battle CL, Hawes K, Halloran K, Lester BM. Major depressive disorder during pregnancy and emotional attachment to the fetus. *Arch Womens Ment Health*. 2011;14(5):425-34.
- McGready R, Simpson JA, Cho T, Dubowitz L, Changbumrung S, Böhm V, Munger RG, Sauberlich HE, White NJ, Nosten F. Postpartum thiamine deficiency in a Karen displaced population. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:808–13.
- Miller S.M., Piasecki C.C., Lonstein J.S. Use of the light-dark box to compare the anxiety-related behavior of virgin and postpartum female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2011; 100(1): 130-137.
- Molina PE, Myers N, Smith RM, Lang CH, Yousef KA, Tepper PG, Abumrad NN. Nutritional and metabolic characterization of a thiamine-deficient rat model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1994 Mar-Apr;18(2):104-11.
- Mousseau DD, Rao VL, Butterworth RF. Alterations in serotonin parameters in brain on thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. *J Neurochem*. 1996; 67(3): 1113-1123
- Mulholland P. Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. *Cerebellum*. 2006; 5:55-63.
- Naeye RL, Diener MW, Dellinger WS. Urban poverty: effects of prenatal nutrition. *Science*. 1969; 166: 1026.
- Nakagawasai O, Tadano T, Hozumi S, Taniguchi R, Tan-No K, Esashi A, Niijima F, Kisara K. Characteristics of depressive behavior induced by feeding thiamine-deficiency diet in mice. *Life Sci*. 2001 Jul 27;69(10):1181-91

- National Research Council, guide for the care and use of laboratory animals: a report of the institute of laboratory animal resources committee on care and use of laboratory animals. 1985.
- Navarro D, Zwingmann C, Hazell AS, Butterworth RF. Brain lactate synthesis in thiamine deficiency: a re-evaluation using ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci Res.* 2005; 79(1-2):33-41.
- Neumann ID, Johnstone HA, Hatzinger M, Liebsch G, Shipston M, Russell JA, Landgraf R, Douglas AJ. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *J. Physiol.* 1998; 508: 289– 300.
- Oliveira FA, Galan DT, Ribeiro AM, Santos Cruz J. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: role of voltage-dependent K⁺ channels. *Brain Res.* 2007; 1134(1):79-86
- Oliveira L, Graeff FG, Pereira SR, Oliveira-Silva IF, Franco GC, Ribeiro AM. Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. *Age.* 2010; 32 (2):187-196.
- Onodera K, Ogura Y, Kisara K. Characteristics of muricide induced by thiamine deficiency and its suppression by antidepressants or intraventricular serotonin. *Physiol. Behav.* 1981, 27(5):847-53.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood–brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998; 37: 1553–1561
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5 rd edition. London: Academy Press; 2004.
- Pereira-Caixeta AR. *Deficiência de tiamina e isolamento social afetam aspectos do comportamento motor e níveis centrais de GABA e glutamate.* 2011. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – UFMG, Belo Horizonte, 2011.
- Pincus JH, Grove I. Distribution Of Thiamine Phosphate Esters In Normal and Thiamine-Deficient Brain. *Exp Neurol.* 1970; 28(3):477-83.
- Pires RG, Pereira SR, Carvalho FM, Oliveira-Silva IF, Ferraz VP, Ribeiro AM. Correlation between phosphorylation level of a hippocampal 86kDa protein and

- extinction of a behaviour in a model of Wernicke-Korsakoff syndrome. *Behav Brain Res.* 2007;180(1):102-6.
- Pires RG, Pereira SR, Oliveira-Silva IF, Franco GC, Ribeiro AM. Cholinergic parametrs and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a modelo of Wernicke-Korsakoff syndrome. *Behav. Brain. Res.* 2005; 162 (1): 11-21.
 - Pitkin S, Savage LM. Age-related vulnerability to diencephalic amnesia produced by thiamine deficiency: the role of time of insult. *Behav Brain Res.* 2004; 148: 93-105.
 - Ramakrishna T. Vitamins and brain development. *Physiol Res.* 1999; 48: 175-187.
 - Ramakrishnan U, Manjrekar R, Rivera J, Gonzales-Cossio T, Martorell R. Micronutrients and pregnancy outcome: a review of the literature. *Nutrition Research.* 1999; 19: 103-159.
 - Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(10):493-8.
 - Ranade SC, Rose A, Rao M, Gallego J, Gressens P, Mani S. Different types of nutritional deficiencies affect different domains of spatial memory function checked in a radial arm maze. *Neuroscience.* 2008; 152(4):859-66.
 - Rashotte ME, Smith JC, Austin T, Pollitz C, Castonguay TW, Jonsson L. Twenty-four-hour free-feeding patterns of dogs eating dry food. *Neurosci Biobehav Rev.* 1984; 8(2):205-10.
 - Rindi G, De Giuseppe L, Sciorelli G. Thiamine Monophosphate, a Normal Constituent of Rat Plasma. *J Nutr.* 1968; 94(4):447-54.
 - Rindi G, De Giuseppel. A New Chromatographic Method for the Determination of Thiamine and its Mono-, Di- and Tri-Phosphates in Animal Tissues. *Biochem J.* 1961; 78:602-6.
 - Rindi G, Patrini C, Comincioli V, Reggiani C. Thiamine content and turnover rates of some rat nervous regions, using labeled thiamine as a tracer. *Brain Res.* 1980; 181(2):369-80.
 - Roland JJ, Savage LM. The role of cholinergic and GABAergic medial septal/diagonal band cell populations in the emergence of diencephalic amnesia. *Neuroscience.* 2009. 160(1):32-41.
 - Roland, JJ, Mark K, Vetreno RP, Savage LM. Increasing hippocampal acetylcholine levels enhance behavioral performance in an animal model of diencephalic amnesia. *Brain Res.* 2008. 1234:116-27.

- Romano E, Zoccolillo M, Paquette D. Histories of child maltreatment and psychiatric disorder in pregnant adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2006; 45(3): 329-36.
- Roser RL, Andrist AH, Harrington WH, Naito HK, Lonsdale D. Determination of urinary thiamine by high-pressure liquid chromatography utilizing the thiochrome fluorescent method. *J Chromatogr*. 1978; 146(1):43-53.
- Rossi R & Scharrer E. Circadian patterns of drinking and eating in pygmy goats. *Physiology and Behavior*. 1992; 51, 895–897.
- Sakuma K, Yamaguchi A. The Recent Understanding of the Neurotrophin's Role in Skeletal Muscle Adaptation. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:201696
- Sanemori H, Ueki H, Kawasaki T. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Thiamine Phosphate Esters at Subpicomole Levels. *Anal Biochem*. 1980; 107(2):451-5.
- Saruta J, Sato S, Tsukinoki K. The role of neurotrophins related to stress in saliva and salivary glands. *Histol Histopathol*. 2010; 25(10):1317-30.
- Scholl TO. Maternal nutrition before and during pregnancy. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2008; 61:79-89.
- Scrimshaw NS. Early malnutrition and central nervous function. *Annual Progress in Child Psychiatry and Child Development*. 1970; 246.
- Scuri M, Samsell L, Piedimonte G. The role of neurotrophins in inflammation and allergy. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010; 9(3):173-80.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. 2002; 22:3251–3261
- Shoval G, Weizman A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005;15:319–29.
- Singleton CK, Martin PR. Molecular Mechanisms of thiamine utilization. *Curr. Mol. Med*. 2001; 1(2):197-207.
- Suda S, Segi-Nishida E, Newton SS, Duman RS. A postpartum model in rat: behavioral and gene expression changes induced by ovarian steroid deprivation. *Biol Psychiatry*. 2008;64(4):311–9.
- Szapacs ME, Mathews TA, Tessarolloc L, Lyons WE, Mamounase LA, Andrews AM. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic

- factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *Journal of Neuroscience Methods*. 2004; 140:81–92.
- Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol*. 2004; 5: 77–107.
 - Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG. Behavioral Effects of Acute and Chronic Imipramine in the Elevated T-Maze Model of Anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000; 65(4):571-6.
 - Vetreno RP, Ramos RL, Anzalone S, Savage LM. Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Brain Res*. 2012; 1436:178-92.
 - Viana MB, Tomaz C, Graeff FG. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994 Nov;49(3):549-54.
 - Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH. IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinology*. 2001; 142: 3964–3973.
 - Vigil FA, Oliveira-Silva Ide F, Ferreira LF, Pereira SR, Ribeiro AM. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behav Brain Res*. 2010 ;210(1):140-2.
 - Vir SC, Love AHG, Thompson W: Thiamin status during pregnancy. *Internat J Vit Nutr Res*. 1980; 50:131–140.
 - Vortmeyer AO, Colmant HJ. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1988;414(1):61-7.
 - WHO, World Health Organization. Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies; 1999.
 - Winer, B.J. Statistical principles in experimental design. New York: McGraw-Hill; 1962, 672 p.
 - Zangrossi H Jr, Graeff FG. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull*. 1997;44(1):1-5.
 - Zangrossi H Jr, Viana MB, Zanoveli J, Bueno C, Nogueira RL, Graeff FG. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001; 25(7-8):637-45.

- Zhang X, Sliwowska JH, Weinberg J. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Exp Biol Med.* 2005; 230(6): 376-388.
- Zhao N, Zhong C, Wang Y, Zhao Y, Gong N, Zhou G, Xu T, Hong Z. Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. *Neurobiol Dis.* 2008;29(2):176-85.
- Zubaran C, Fernandes JG, Rodnight R. Wernicke-Korsakoff syndrome. *Postgrad Med J.* 1997; 73: 27-31.