

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

Léticia de Souza Resende

**PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA GRAVE DE TIAMINA**

Belo Horizonte

2012

Letícia de Souza Resende

**PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA GRAVE DE TIAMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Neurociências

Orientadora: Profa. Angela Maria Ribeiro

BELO HORIZONTE

2012

Aos meus pais, pelo amor e incentivo

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Angela Maria Ribeiro, agradeço pela oportunidade, por ter confiado em mim, por não ter medido esforços durante a condução desse trabalho e por ter me ensinado que ética, persistência e perfeccionismo fazem um bom pesquisador.

Agradeço aos meus pais, Paixão e Ely, pelo apoio e amor incondicional.

À minha irmã Lili, por ser um exemplo de determinação e sucesso.

Ao Raphael, agradeço por todos os momentos de paciência e carinho.

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.

A professora Silvia R. Castanheira Pereira (*sempre presente*) pelos ensinamentos e alegria.

Aos professores Adriano Pimenta (UFMG), Héliida Andrade (UFMG), Lisa Savage (SUNY), Evonnildo Costa Gonçalves (UFPA), David Werner (SUNY), Christopher Bishop (SUNY), pela oportunidade, por contribuírem imensamente nesse trabalho e por todos os ensinamentos.

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

RESUMO

A deficiência de tiamina (DT) leva a perdas celulares e/ou disfunções em várias regiões do encéfalo, sendo o tálamo e os corpos mamilares as regiões mais frequentemente afetadas. Tanto em modelos experimentais como em seres humanos, episódios de DT podem causar, entre outros sinais/sintomas, hipoatividade motora e prejuízos cognitivos. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelas disfunções bioquímicas e lesões cerebrais associadas aos déficits cognitivos e motores continuam obscuros. Visando contribuir com o entendimento desses fatores, foram realizados quatro experimentos independentes cujos objetivos foram avaliar os efeitos da deficiência grave de tiamina sobre: perfil proteômico do tálamo e a relação entre o desempenho em tarefa cognitiva espacial e níveis de proteínas talâmicas (**Experimento 1**); níveis hipocâmpais de sinapsina I e fosfo-sinapsina I, e o desempenho de ratos durante tarefa cognitiva espacial (**Experimento 2**); níveis de GABA e Glutamato em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) e desempenho de ratos durante tarefas de coordenação e equilíbrio motor (**Experimento 3**); liberação “*in vivo*” de glutamato, GABA e acetilcolina no hipocampo e desempenho de ratos durante tarefa de alternância espontânea (**Experimento 4**). A indução do modelo de deficiência grave de tiamina foi similar em todos os experimentos e consistiu no tratamento dos animais com ração deficiente de tiamina e injeções diárias de piritiamina (inibidor da enzima responsável pela síntese da forma ativa da tiamina: tiamina difosfato-TPP). Animais dos grupos controles receberam ração DT e injeções diárias de tiamina (Experimentos 2 e 4) ou ração padrão e injeções diárias de salina (Experimento 1 e 3). No **Experimento 1** o desempenho cognitivo dos animais foi avaliado através do Labirinto Aquático de Morris (LAM) e o perfil de proteínas do tálamo por eletroforese bidimensional. Os dados mostraram que, das proteínas detectadas nas condições utilizadas (1ª e 2ª dimensões: faixa de pH 3,0-11,0 e gel de poliacrilamida 12,5%, respectivamente), sete apresentaram níveis alterados ($p < 0,05$) em animais DT. Dessas proteínas alteradas, três mostraram-se quantitativamente aumentadas e as outras quatro reduzidas em relação ao controle. Análises de regressão linear entre as concentrações de cada uma dessas sete proteínas e a latência para encontrar a plataforma no Labirinto Aquático de Morris mostrou correlações significativas ($p < 0,05$) direta com uma ou inversa com três delas. Os dados sugerem que o processo de neurodegeneração induzido por DT envolve *up and down regulation* em proteínas talâmicas específicas e que os níveis dessas

proteínas parecem ter um papel no processo de aprendizagem e memória espacial. No **Experimento 2**, a memória de trabalho foi avaliada através do teste de alternância espontânea. Níveis hipocámpais de sinapsina I e fosfo-sinapsina I foram analisados através da técnica de *Western Blot*. Os resultados mostraram efeitos significativos da deficiência de tiamina sobre as correlações positivas entre porcentagem de alternância e os níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I. Ou seja, as correlações observadas em ratos controles não foram observadas nos animais DT. O desempenho no teste de memória espacial foi pior em ratos DT ($p=0,01$) comparado aos controles, sendo este acompanhado por uma redução significativa (30%) nos níveis de fosfo-sinapsina I ($p=0,02$). Esses resultados indicam que a DT rompe as associações normais entre sinapsina I e fosfo-sinapsina I e desempenho cognitivo dependente do hipocampo. No **Experimento 3**, aspectos motores foram avaliados através do teste do *rotarod* e *beam balance* e os níveis de GABA e glutamato foram avaliados *post-mortem* no cerebelo, estriado, hipocampo e córtex pré-frontal. O desempenho dos animais nos testes motores não foi afetado pela DT. A restrição de tiamina afetou significativamente a concentração de glutamato no cerebelo ($p=0,02$) e a concentrações de GABA no hipocampo ($p=0,01$) e no cerebelo ($p=0,01$). Por outro lado, os níveis de glutamato e GABA no córtex pré-frontal e corpo estriado não foram afetados pela TD. Dessa forma, a tiamina e/ou seus derivados parecem desempenhar um papel específico na manutenção dos níveis de GABA e glutamato em algumas regiões do SNC. Como esse efeito é região-específica, parece ser diferente da ação relacionada ao papel dessa vitamina como co-enzima no metabolismo energético. No **Experimento 4**, a liberação “*in vivo*” de glutamato, GABA e acetilcolina no hipocampo foi avaliada antes, durante e após tarefa de alternância espontânea, utilizando microdialise e cromatografia líquida de alta eficiência. A DT afetou de forma significativa a liberação de glutamato ($p=0,03$) e acetilcolina ($p=0,01$). Além disso, análises de regressão mostraram uma correlação entre acetilcolina e alternância espontânea ($p=0,02$) e uma tendência de correlação entre a liberação de acetilcolina e glutamato ($p=0,07$). Esses dados mostram o envolvimento dos sistemas colinérgico e glutamatérgico do hipocampo em tarefa cognitiva. Concluindo, os dados aqui apresentados além de contribuir para o esclarecimento sobre os componentes dos mecanismos neuroquímicos subjacentes à alterações cognitivas em condições de deficiência de tiamina, também abrem um novo caminho para se entender, em futuros estudos, as bases moleculares do aprendizado espacial.

ABSTRACT

Although, the thiamine deficiency (TD) causes lesions and/or dysfunctions in several brain regions, the thalamus and the mammillary bodies are the regions more frequently affected. Thiamine deficiency can lead to behavioral impairments, including memory, learning and motor deficits in both humans and animals models. However, the precise mechanisms underlying these pathological changes are still unknown. To approach this question, we performed four independent experiments whose objectives were to evaluate the effects of TD on: protein expression profiles in the thalamus and the correlation between spatial cognitive performance and the levels of thalamic proteins (*Experiment 1*); hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I levels and the rat's performance during spatial task (*Experiment 2*); gama-amminobutiric acid (GABA) and glutamate levels in various brain regions and motor aspects (*Experiment 3*); *in vivo* GABA, glutamate and acetylcholine release and the rat's performace during spontaneous alternation task (*Experiment 4*). The TD treatment was similar in all experiments and consisted of treating the animals with thiamine deficient diet associated with daily pyrithiamine (inhibitor of the enzyme that produces the active phosphorylated form of thiamine-TTP) injections. Controls animals received thiamine-deficient chow associated to daily injections of thiamine (Experiments 2 and 4) or standard chow combined with saline injections (Experiments 1 and 3). In the **Experiment 1** behavioral aspects were assessed using Morris Water Maze (MWM) test and protein expression of thalamus was analyzed using two-dimensional electrophoresis gel. Seven protein spots were found to be differentially regulated as a function of TD: three increased and four decreased ($p < 0.05$). Regression analysis between the concentrations of each one of these seven proteins and latencies to find the platform in the MWM revealed a significant correlation with four sppecific proteins ($p < 0.05$). The data suggest that the process of neurodegeneration induced by severe TD involves alterations (both up and down regulation) in specific proteins within the thalamus. In the **Experiment 2** we used the spontaneous alternation task to evaluate working memory. Western blot was performed to analyze hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I levels. Positive correlations between spontaneous alternation behavior and hippocampal levels of synapsin I or phosphorylated synapsin I were found only in control rats. However, spontaneous alternation performance was impaired in PTD rats ($p=0.01$) and was accompanied by a significant

reduction (30%) in phosphorylated synapsin I ($p=0.02$). These data suggest thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. In the **Experiment 3** motor coordination and balance in rodents were evaluated using rotarod and beam balance tasks and excitatory and inhibitory neurotransmitter's concentrations in the hippocampus were assessed using HPLC. There was no effect of thiamine deficiency on the assessed motor aspects. The DT reduced the levels of glutamate in the cerebellum ($p=0.02$) and the levels of GABA in the hippocampus ($p=0.01$) and cerebellum ($p=0.01$). On the other hand, the glutamate and GABA levels in prefrontal cortex and striatum were not affected by TD. Thus, thiamine and/or its derivatives seem to play a specific role in the maintenance of levels of GABA and glutamate in some regions of the CNS. Because this effect is region-specific, it might not be related to the role of this vitamin as a coenzyme in energy metabolism. That is, it seems to involve a different mechanism of action. In the **Experiment 4**, Using HPLC, the GABA, glutamate and acetylcholine hippocampal levels were measured *in vivo* before, during and after spontaneous alternation task. There were significant effects of thiamine deficiency on the glutamate ($p=0.03$) and acetylcholine ($p=0.01$) release over the phases. In addition, positive correlation between spontaneous alternation behavior and the amount of acetylcholine released during the performance of the maze task was found. There was a tendency ($p=0.07$) to correlation between the amounts of acetylcholine and glutamate released. These data show that the hippocampus cholinergic and glutamatergic system are involved in the spatial learning and memory events. In conclusion, the present data show thalamic protein changes and hippocampal neurochemical dysfunction associated with behavioral changes in animal model of severe thiamine deficiency, contributing to clarify part of the mechanisms underlying this disorder.

Figura 1	Estrutura da tiamina pirofosfato.....	20
Figura 2	Esquema de vias metabólicas indicando a participação de duas enzimas dependentes de tiamina.....	21
Figura 3	Desenho esquemático indicando componentes da sala do teste comportamental e do Labirinto Aquático de Morris	28
Figura 4	Esquema do Delineamento Experimental (Experimento 1).....	42
Figura 5	Foto da sala onde são realizados os testes no Labirinto Aquático de Morris.....	43
Figura 6	Gráfico da curva de aquisição da tarefa no Labirinto Aquático de Morris (Experimento 1)	47
Figura 7	Perfil de proteínas expressas no tálamo de ratos controles (painel A) e ratos deficientes de tiamina (painel B) (Experimento 1).....	48
Figura 8	Perfil proteômico do tálamo de ratos <i>Wistar</i> , indicando as proteínas diferencialmente expressas em animais deficientes de tiamina (Experimento 1).....	49
Figura 9	Imagem tridimensional dos níveis das sete proteínas do tálamo diferencialmente expressas em amostras controle e deficiente de tiamina (Experimento 1).....	50
Figura 10	Gráficos de dispersão mostrando a relação entre o volume relativo de cada proteína e a latência para encontrar a plataforma na terceira sessão do treino no Labirinto Aquático de Morris (Experimento 1).....	51
Figura 11	Esquema do Delineamento Experimental (Experimento 2).....	56
Figura 12	Foto do Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos testes de alternância espontânea (Experimentos 2 e 4).....	57
Figura 13	Gráficos dos resultados do teste comportamental realizado no Labirinto em Cruz elevado (Experimento 2)	60
Figura 14	Gráficos dos níveis relativos de fosfo-sinapsina I (painel A), sinapsina I (painel B) e razão sinapsina I/fosfo-sinapsina (painel C) no hipocampo de animais controles e animais deficientes de tiamina (Experimento 2).....	61
Figura 15	Gráficos de dispersão dos dados comportamentais e os níveis de sinapsina I (painel A) e fosfo-sinapsina (painel B) (Experimento 2).....	62
Figura 16	Esquema do Delineamento Experimental (Experimento 3).....	68

Figura 17	Foto do equipamento- <i>rotarod</i> - utilizado para a avaliação do equilíbrio e coordenação motora dos animais (Experimento 3).....	69
Figura 18	Foto do equipamento - trave de equilíbrio - utilizado para a avaliação do equilíbrio e coordenação motora dos animais (Experimento 3).....	71
Figura 19	Cromatograma ilustrativo da análise da concentração de Glutamato e GABA no hipocampo dos animais do grupo controle (Experimento 3).....	73
Figura 20	Gráfico mostrando o desempenho dos animais no treino (painel A) e teste (painel B) do <i>rotarod</i> (Experimento 3).....	75
Figura 21	Gráfico mostrando o desempenho dos animais no teste a trave de equilíbrio rpm (Experimento 3).....	76
Figura 22	Gráfico das concentrações de glutamato e GABA no córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e cerebelo dos animais deficientes de tiamina e controle (Experimento 3).	77
Figura 23	Esquema do Delineamento Experimental (Experimento 4).....	83
Figura 24	Gráfico dos resultados do teste comportamental realizado no Labirinto em Cruz Elevado (Experimento 4).....	88
Figura 25	Gráfico do perfil de liberação de glutamato no hipocampo de ratos controles e deficientes de tiamina (Experimento 4).....	89
Figura 26	Gráfico do perfil de liberação de GABA no hipocampo de ratos controles e deficientes de tiamina (Experimento 4).....	90
Figura 27	Gráfico do perfil da liberação de acetilcolina no hipocampo de ratos controles e deficientes de tiamina (Experimento 4).....	91
Figura 28	Gráfico de dispersão mostrando a correlação entre porcentagem de alternância e a quantidade de acetilcolina liberada durante teste comportamental (Experimento 4).....	93

Tabela 1 Resultados das análises de regressão entre as variáveis bioquímicas e comportamentais (Experimento 4)	93
---	----

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*)

AMP-c - Adenosina mono-fosfato - cíclico (*Cyclic Adenosine Monophosphate*)

AMPA - Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

ANOVA - Análise de Variância (*Analysis of Variance*)

ATP - Adenosina trifosfato

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

CaMKII - Proteína quinase cálcio calmodulina dependente (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases II*)

CHAPS - Colamidopropil dimetilamonio propanosulfonato

C₇BzO - Heptil fenil hidroxipropil dimetilamonio propanosulfonato

CPF - Córtex Pré-Frontal

DT - Deficiência de tiamina

DTT - Ditiotreitól

EW - Encefalopatia de Wernicke

GABA - Ácido γ -aminobutírico

HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho (*High-performance liquid chromatography*)

IPG - Gradiente de pH imobilizado (*Immobilized pH gradient*)

k - kilo

MVH - Milvolts/hora

L - Litro

LAM - Labirinto Aquático de Morris (=MWM: *Morris Water Maze*)

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

mM - miliMolar

mmol - milimol

MPA - ácido 3-mercaptopropiônico

NL - Não linear

NMDA - *N*-metil-D-aspartato

OPA - orto-oftaldeído

SDS - PAGE - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (*Sodium Dodecyl Sulfate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SK - Síndrome de Korsakoff

PKA - proteína quinase dependente de AMP-c (*Protein kinase A*)

PKC - proteína quinase cálcio-dependente (*Protein kinase C*)

SDS - dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)

SNC- Sistema Nervoso Central

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

SWK - Síndrome de Wernicke Korsakoff

TDP ou TPP- tiamina pirofosfato

TTP - tiamina trifosfato

TrkB- tirosina quinase B

V - volts

v/v - volume por volume

μ - micro

μg –microgramas

Considerações gerais..... 18

Introdução Geral..... 20

Experimento 1

Objetivos..... 41

Material e Métodos..... 42

Resultados..... 47

Discussão..... 52

Experimento 2.

Objetivos..... 55

Material e Métodos..... 56

Resultados..... 60

Discussão..... 63

Experimento 3

Objetivos..... 67

Material e Métodos..... 68

Resultados.....	75
Discussão.....	78
 <i>Experimento 4</i>	
Objetivos.....	82
Material e Métodos.....	83
Resultados.....	88
Discussão.....	94
<i>Conclusões</i>	98
<i>Considerações Finais</i>	100
<i>Referências</i>	103
<i>Anexos</i>	116

Dados parciais obtidos no presente estudo publicados em anais de congressos

1. RESENDE, L.S.; Gonçalves, E.C.; Vigil, F.A.B.; Oliveira-Silva, I.F.; Pimenta, A.M.C.; Pereira, S.R.C.; Ribeiro, A.M. Effects of thiamine deficiency in proteomic profile of thalamus and behavioral performance in spatial task. *In: Neuroscience 2011, Washington.*

2. RESENDE, L.S.; Gonçalves, E.C.; Vigil, F.A.B.; Oliveira-Silva, I.F.; Pimenta, A.M.C.; Pereira, S.R.C.; Ribeiro, A.M. Aspectos Cognitivos e Perfil Proteômico do Tálamo em Modelo Experimental de Deficiência Grave de Tiamina.

Encontro Científico Local- *In: Revista Médica de Minas Gerais, v.20. p.53. IV Simpósio de Neurociências. Belo Horizonte, 2010.*

Encontro Científico Nacional- *In: Anais do XXXIV Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências. XXXIV Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências, Caxambu 2010.*

Co-autoria em estudos publicados em anais de congressos

1. Pereira Caixeta, A.R.; RESENDE, L. S.; Pereira, S.R.C., Ribeiro, A.M. Deficiência Grave de Tiamina afeta níveis de GABA no estriado e prejudica o desempenho motor de animais adultos em testes de coordenação e equilíbrio. *In: Anais do XXXIV Congresso anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. XXXIV Congresso anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento – SBNeC. Caxambu, 2010.*

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

1ª autora ou co-autora em artigos completos publicados em periódicos (cópias anexas)

1. Freitas-Silva, D.M.; RESENDE, L.S.; Pereira, S.R.C.; Franco, G.C.; Ribeiro, A.M. Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring. 2010. Behavioural Brain Research. 2010; 22: 33-40p (**anexo 1**).
2. Savage, L.M.; Hall, J.M.; RESENDE, L.S. Translational Rodent Models of Korsakoff Syndrome Reveal the Critical Neuroanatomical Substrates of Memory Dysfunction and Recovery. Neuropsychology Review. 2012. DOI 10.1007/s11065-012-9194-1 (**anexo 2**).
2. RESENDE, L.S. ; Ribeiro, A.M.; Werner, D. ; Hall, J.M. ; Savage, L. M. Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. Behavioural Brain Research. 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01382.x (**anexo 3**).

Manuscrito submetido à publicação (cópia anexa):

RESENDE, L.S.; Gonçalves, E.C.; Vigil, F.A.B.; Oliveira-Silva, I.F.; Pimenta, A.M.C.; Ferreria, L.F.; Ribeiro, A.M. Spatial cognitive deficits in animal model of Wernicke Korsakoff Syndrome are related to changes in thalamic protein concentrations. Submitted to Neuroscience Letters (**anexo 4**).

A tiamina, também conhecida como vitamina B1, é um nutriente essencial encontrado em arroz integral, cereais, carne e vegetais verdes. Em animais, está presente em altas concentrações em músculos, órgãos e tecido cerebral (Hass, 1988). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999), apesar do número de pessoas mal nutridas no mundo ter diminuído nas últimas décadas, a deficiência de tiamina (DT) ainda é um fator preocupante principalmente em países em desenvolvimento, países atingidos por guerras e catástrofes naturais que necessitam de ajuda humanitária e países asiáticos cuja base da alimentação é o arroz polido. Além disso, a carência de B1 adquire caráter mais significativo devido ao crescente número de indivíduos com dependência alcoólica, uma vez que o consumo crônico de etanol pode levar à DT (Thompson et al., 1988; Langlais & Savage, 1995).

A redução nos níveis de B1 no tecido nervoso pode interferir em mecanismos celulares, neuroquímicos, desencadear processos neurodegenerativos e disfunções cerebrais como a Síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK) que é caracterizada como um transtorno comportamental, patológico e heterogêneo comumente observado em pessoas desnutridas e alcoolistas crônicos. Os pacientes apresentam uma variedade de danos neuropsicológicos que vão desde pequenos comprometimentos na memória, passando por moderados déficits cognitivos, até a completa demência (Bowden, 1990).

Lesões cerebrais semelhantes as apresentadas por indivíduos com a SWK podem ser induzidas experimentalmente de forma direta em ratos por meio da utilização de dieta deficiente em tiamina (Langlais & Savage, 1995; Pires et al., 2001) por administração parental de piritiamina - um inibidor da pirofosfoquinase, enzima que transforma a tiamina na sua forma ativa - ou por uma combinação desses dois procedimentos (Langlais et al., 1996; Pires et al., 2005, Carvalho et al., 2006; Vigil et al., 2010) estabelecendo dessa forma, um modelo experimental da SWK.

Vários pesquisadores, incluindo o grupo de pesquisa do Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNec) da Universidade Federal de Minas Gerais utilizando esse modelo, têm investigado os efeitos deletérios da DT no sistema nervoso de ratos adultos. Os dados obtidos indicam que a deficiência dessa vitamina resulta em alterações neuroquímicas e comportamentais, incluindo déficits no aprendizado, memória e coordenação motora. Portanto, esse modelo é um instrumento interessante para se estudar as relações entre componentes/processos neurobiológicos e aspectos comportamentais.

Visando compreender melhor as disfunções moleculares de processos neurobiológicos associados à DT e conseqüentemente à SWK e suas relações com aspectos comportamentais, o presente estudo aborda dois fenômenos: (i) função cognitiva espacial (aprendizado e memória operacional e de referência) e (ii) atividade motora. Esse estudo é constituído de quatro experimentos independentes divididos da seguinte forma:

Parte I - Alterações Protéicas e Função Cognitiva em Modelo de Deficiência Grave de Tiamina

- *Experimento 1* - Déficit cognitivo espacial em modelo de deficiência grave de tiamina está relacionado com alterações em proteínas talâmicas. Cópia manuscrito no **anexo 4** (submetido à *Neuroscience Letter*).
- *Experimento 2* - Deficiência de tiamina altera a correlação entre alternância espontânea e níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I no hipocampo. Cópia artigo (*Behavioural Brain Research*) no **anexo 3**.

Parte II- O Papel do GABA, Glutamato e Acetilcolina em Aspectos Comportamentais no Modelo de Deficiência Grave de Tiamina

- *Experimento 3* - Comportamento motor e níveis de GABA e glutamato em modelo de deficiência grave de tiamina
- *Experimento 4* - Deficiência de tiamina altera a liberação de glutamato e acetilcolina durante tarefa cognitiva espacial.

Os experimentos 1 e 3 foram realizados no Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNeC – UFMG). Com o apoio da CAPES, através de uma bolsa de doutorado sanduíche, os experimentos 2 e 4 foram realizados na *State University of New York at Binghamton* através de um projeto em colaboração com a Dr. Lisa Maria Savage.

A tiamina e sua Deficiência

A Tiamina, também conhecida como vitamina B1, foi isolada em 1926 (Jansen & Donath, 1926) e sintetizada pela primeira vez na década de trinta (Williams & Cline, 1936). Reconhecida originalmente como fator preventivo do Beribéri, é formada por um grupamento tiazólico unido por uma ponte metilênica a um grupo pirimidínico (**Fig. 1**). A síntese dessa vitamina ocorre naturalmente em plantas, fungos e muitos outros microorganismos. Entretanto, humanos e outros mamíferos não biossintetizam essa vitamina, sendo dependentes de uma suplementação exógena.

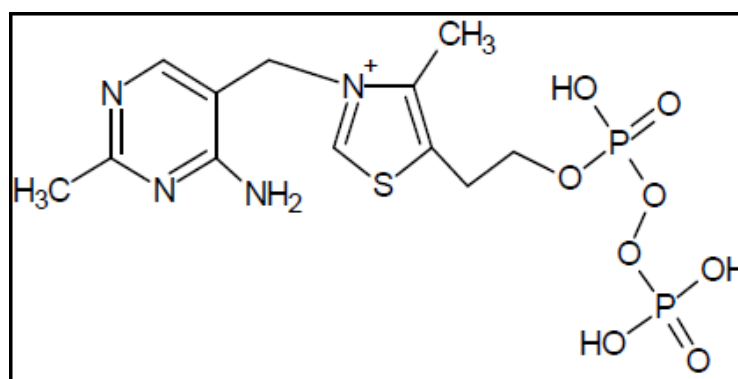


Fig. 1. Estrutura da tiamina pirofosfato. Formada por um grupamento tiazólico unido por uma ponte metilênica a um grupo pirimidínico.

Nos organismos superiores, os ésteres fosfatos da tiamina sofrem ação de fosfatases no lúmen intestinal, sendo absorvida como tiamina livre por transporte passivo. Após ser captada pelos tecidos, a tiamina pode ser fosforilada dando origem às formas mono, di e trifosfatadas. Destas, a tiamina pirofosfato (TPP ou TDP) representa sua forma ativa como coenzima das enzimas transcetolase, complexo piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, enzimas chaves no metabolismo energético celular (Haas, 1988). As enzimas dependentes de tiamina participam no metabolismo da glicose na via glicolítica, ciclo do ácido cítrico e ciclo das pentoses.

Uma das principais funções dessas vias é gerar adenosina trifosfato (ATP), fornecendo dessa forma, energia para as células. A atividade reduzida dessas enzimas, devido à DT, pode levar a uma redução na síntese de ATP, que por sua vez, pode causar danos e/ou morte celular. Se o mecanismo responsável pelas disfunções e lesões observadas no processo neurodegenerativo causado pela DT estivesse relacionado apenas com uma redução na síntese de ATP, seria de se esperar que todos os neurônios, por serem aeróbicos, seriam afetados e todas as regiões cerebrais seriam igualmente comprometidas. No entanto, a DT induz à morte

neuronal em regiões específicas do Sistema Nervoso Central (SNC) que incluem principalmente o tálamo e os corpos mamilares (Langlais et al, 1992). Portanto, parece que a tiamina e/ou seus derivados desempenham outras funções específicas em algumas regiões do SNC e, a restrição mesmo que parcial dessa vitamina desencadeia mecanismos envolvidos com a morte neuronal, o quais antecederiam a morte celular causada por uma baixa de ATP.

Evidências obtidas em estudos com cultura primária de neurônios têm indicado uma possível função da tiamina na modulação de canais iônicos (Oliveira et al., 2007). O papel da tiamina trifosfato (TTP) ainda permanece incerto, embora existam indícios que esta forma da vitamina tem um papel na condutância de sódio nas membranas do axônio (Hass, 1988).

Além disso, outros aspectos devem ser considerados, como o fato do complexo piruvato desidrogenase ser necessário para produzir acetil-CoA que é um dos precursores do neurotransmissor acetilcolina (Ach) (**Fig 2**) e também de ácidos graxos que são importantes na produção de mielina, garantindo assim um funcionamento neuronal apropriado. No ciclo do ácido cítrico a α -cetoglutarato desidrogenase, que depende de TDP, também desempenha um papel na manutenção dos níveis dos neurotransmissores glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e aspartato, assim como na síntese protéica (Martin *et al*, 2003).

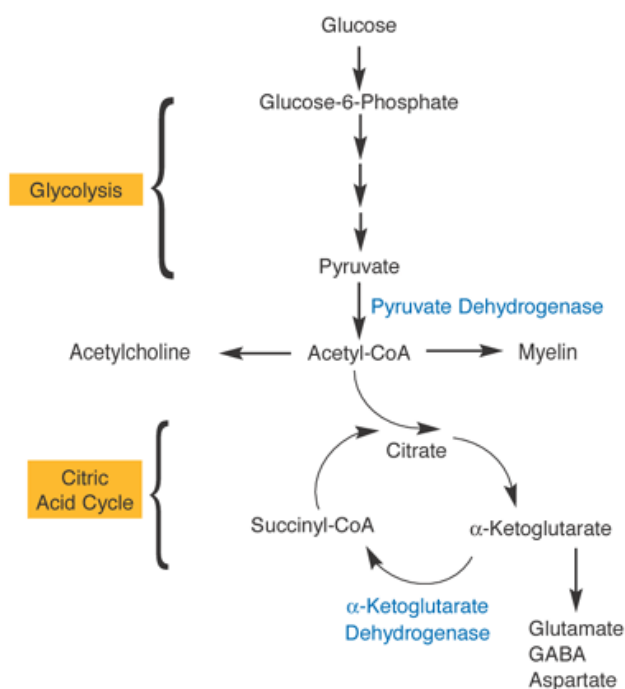


Fig. 2. Esquema de vias metabólicas indicando a participação de duas enzimas dependentes de tiamina- piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase no metabolismo energético celular. Figura retirada de Martins *et al*, 2003.

Até meados de 1930, o beribéri era a única doença relacionada à DT, sendo conhecida como uma doença do sistema nervoso periférico, do coração e dos músculos estriado. Posteriormente se percebeu que a Encefalopatia de Wernicke (EW) era a manifestação cerebral aguda da deficiência grave de tiamina. Beribéri ainda permanece como um grande problema em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos, e a SWK é uma consequência comum da DT associada ao alcoolismo crônico (Haas, 1988).

1. Síndrome de Wernicke-Korsakoff

A EW foi descrita em 1881 por Carl Wernicke como uma poliencefalite hemorrágica aguda em dois homens alcoolistas e uma paciente com vômitos persistentes após ingestão de ácido sulfúrico. As alterações patológicas descritas por Wernicke foram hemorragias na substância cinzenta ao redor do terceiro e quarto ventrículos e do aqueduto de Sylvius (Thomson et al., 2008). A EW é considerada uma síndrome neuropsiquiátrica aguda causada por DT, comum em alcoolistas, mas também é reportada em indivíduos com bulimia, AIDS e problemas gastrointestinais (Vetreno et al., 2012). O alcoolismo crônico pode resultar em DT através de mecanismos que incluem inadequado consumo de alimentos, redução da absorção e/ou diminuição da taxa de fosforilação de B1 para um de seus metabólitos ativos, a tiamina difosfato (Langlais & Savage, 1995). Os sintomas da EW incluem ataxia (perda do movimento muscular coordenado), nistagmo (movimento involuntário dos olhos) ou oftalmoplegia (paralisia do movimento do olho) e confusão mental (Thomson et al., 2008). Cerca de 20% dos pacientes não apresentam a tríade clássica da EW (ataxia, disfunção ocular e confusão mental), sendo comum que um ou mais sintomas apareçam mais tarde no decorrer da doença (Harper, 2006).

A Síndrome de Korsakoff (SK) é caracterizada por profunda amnésia, desorientação e confabulação resultante da DT (Harper, 2006). Em geral, os pacientes apresentam um prejuízo desproporcional da memória em relação a outras disfunções cognitivas, ocorrendo uma perda crônica marcante da *memória de trabalho*¹ com relativamente pouca perda da *memória de referência*². Além disso, alterações emocionais podem se desenvolver, incluindo apatia ou leve euforia, com pouca ou nenhuma reação aos eventos (Kopelman, 1985).

¹ *memória de trabalho: informações mantidas por curtos períodos de tempo durante os quais são relevantes para a execução de uma determinada tarefa. Dependente do contexto que foi adquirida.*

² *memória de referência: informações arquivadas por intervalos de tempo mais longos, utilizada em diferentes tarefas. Independente do contexto que foi adquirida.*

O diagnóstico é confirmado por neuroimagens ou resultados de autópsias que mostram degeneração talâmica e de corpos mamilares e atrofia do lobo frontal (Reed et al., 2003).

A compreensão da relação entre EW e SK tem sido fortemente influenciada por estudos em alcoolistas crônicos. Victor et al. (1989) mostraram que 84% dos alcoolistas com um diagnóstico de EW, com o passar do tempo desenvolviam a SK o que levou os autores a concluir que as duas doenças são as fases aguda e crônica de uma mesma síndrome relacionada à DT, sugerindo o emprego do termo síndrome de Wernicke-Korsakoff. Essa síndrome é atualmente considerada como constituída de dois componentes separados que resultam da DT: a EW que é uma condição aguda que se apresenta como uma tríade de sintomas, os quais são confusão, ataxia, e anormalidades oculares. Em contraste, a síndrome ou psicose de Korsakoff é uma doença mental com psicose irreversível em virtude da DT por um longo período (Martin et al, 2003). O estado amnésico característico da psicose de Korsakoff é marcado por uma lacuna permanente na memória do paciente. O principal aspecto da amnésia é o déficit de aprendizagem (Zubaran, 1997).

Algumas regiões do cérebro são lesadas na SWK, mas os dados sobre os substratos neurais subjacentes aos déficits cognitivos permanecem controversos. A redução do neocórtex, em particular das áreas frontal e parietal e a perda de substância branca são consequências do consumo excessivo de álcool (Mishkin, 1982). As consequências anatômicas da exposição prolongada a DT são lesões bilaterais em diferentes núcleos do tálamo (núcleo anterior, núcleos da linha média e posterior), nos corpos mamilares e também na fimbria/fornix e no trato mamilotalâmico que interconecta estruturas do sistema límbico (Vetreno et al., 2011). Essa neurodegeneração pode culminar em *amnésia retrógrada*³ temporária e *amnésia anterógrada*⁴ grave, caracterizada por déficits na *memória explícita*⁵ indicando disfunção hipocampal. No entanto, em análises *post-mortem* dos cérebros de indivíduos com diagnóstico da SWK, observou-se que não ocorrem lesões no hipocampo (Langlais et al., 1992). Apesar dos estudos extensivos, o papel do hipocampo e das estruturas do lobo temporal na amnésia resultante da DT é ainda controverso. O uso de modelos animais da SWK tem auxiliado a elucidar esta questão.

³ *amnésia retrógrada*: incapacidade de lembrar experiências que ocorreram antes do início da amnésia.

⁴ *amnésia anterógrada*: capacidade de armazenar, reter e relembrar conhecimentos recém-adquiridos. (pós-traumática)

⁵ *memória explícita*: refere-se à retenção de experiências sobre fatos e eventos do passado, o indivíduo tem acesso consciente ao conteúdo da informação. Detalhes na sessão 3 da Introdução Geral.

2. Modelos Animais da Deficiência de Tiamina

O uso de modelos animais fornece a oportunidade de uma investigação experimental profunda de várias características, entre elas, aspectos anatômicos, fisiológicos e moleculares de transtornos psiquiátricos. Além disso, resultados obtidos em modelos experimentais podem contribuir para o entendimento das relações entre fenômenos fisiológicos e comportamentais e esclarecer a hipótese de que cada aspecto do comportamento seria mediado por um mecanismo molecular neural específico. Sistemas como o cérebro do rato, por exemplo, são modelos úteis para o entendimento dos princípios e fundamentos básicos dessa interação (Ribeiro e Pereira, 1998).

Modelos animais da SWK têm fornecido significativo conhecimento da alteração estrutural, neuroquímica e cognitiva associada à DT, assim como têm se mostrado uma ferramenta útil para o entendimento dos processos de memória no cérebro intacto (Vetreno et al., 2012). Vários protocolos têm sido utilizados para induzir a DT em animais (Savage et al., 2012):

I. *Dieta deficiente em tiamina*: Os animais são alimentados com ração deficiente de tiamina que pode ser manipulada no próprio laboratório, ou adquirida em empresas especializadas. O tratamento demora semanas ou até meses para induzir os sinais neurológicos associados à DT os quais são: redução no comportamento de auto limpeza (*grooming*), seguido por ataxia, perda do reflexo de endireitamento e convulsão (Troncoso et al., 1981; Witt, 1985). Entretanto, somente nove dias em dieta DT são necessários para reduzir neurogênese hipocampal em roedores (Zhao et al., 2008). Além disso, depois de 14 dias há evidência de redução no número de neurônios colinérgicos no prosencéfalo (Zhao et al., 2008) e depois de 30 dias, os níveis de acetilcolinesterase (AChE) e fibras colinérgicas estão reduzidos no córtex e hipocampo (Pires et al., 2001, 2005; Nakagawasai et al., 2000; 2001). Nesse período, déficits na memória espacial são observados (Pires et al., 2005).

II. *Dieta deficiente em tiamina e tratamento com etanol*: A exposição de ratos ao etanol em combinação com uma dieta DT com a utilização ou não de pirritiamina tem sido empregada para verificar os efeitos separados e combinados desses fatores na disfunção e/ou lesão cerebral. Em alguns modelos, os animais são cronicamente tratados com etanol 20%, sendo essa a única fonte de fluido e também recebem uma dieta DT. O episódio de DT é interrompido antes dos animais apresentarem sinais neurológicos (Pires et al., 2001).

Em modelos da SWK, os animais são primeiramente expostos ao etanol e então submetidos a injeções diárias de pirritiamina associada a uma dieta DT (Homewood et al., 1997; Pires et al., 2005). Kril & Homewood (1993) utilizaram um modelo de consumo prolongado de etanol no qual os animais foram expostos há um breve período de DT no início (4 semanas), no meio (depois de 15 semanas) e no final (26 semanas) do período de tratamento com etanol. Outros estudos têm utilizado animais com preferência por etanol 10% (Pfefferbaum et al., 2007; He et al., 2007). Os resultados indicam que os sinais clínicos associados com a DT desenvolvem mais rapidamente quando ratos são submetidos à deficiência associada ao consumo de etanol (Zimitat et al., 1990). Pires et al. (2001) mostraram que o sistema colinérgico parece responder diferentemente a DT e ao consumo crônico de etanol, e a associação dos dois tratamentos induz a um aumento do efeito de inibição da liberação de acetilcolina. Em outro estudo, Pires et al. (2005) encontraram que a DT pode causar amnésia anterógrada, sendo este déficit aumentado pelo uso de etanol. A interação entre DT e etanol não é sempre sinérgica. Aprendizagem e memória de referência parecem ser sensíveis a interação sinérgica do etanol e DT, no entanto, memória de trabalho é mais afetada pelo etanol (Ciccia & Langlais, 2000).

III. *Dieta deficiente em tiamina associada ao uso de pirritiamina.* A associação de uma dieta DT com injeções de pirritiamina acelera o aparecimento dos sinais neurológicos, que surgem entre o 13^o e 15^o dias de tratamento (Witt, 1985; Vetreno et al., 2011; Vetreno et al., 2012). Neurodegeneração ocorre principalmente no tálamo e corpos mamilares, progredindo em uma linha de tempo bem estabelecida (Langlais et al., 1992, Savage et al., 2012). Alterações neuroquímicas estão presentes no hipocampo, substância cinzenta periaquitual, vermis cerebelar e regiões periventriculares do tronco cerebral (Victor et al., 1989), havendo evidências de disfunções no sistema límbico e regiões corticais (Anzalone et al., 2010). Esse modelo reproduz as lesões cerebrais e os déficits comportamentais encontrados nos indivíduos com a SWK (Witt, 1985; Vetreno et al., 2011). Após o episódio de DT, ratos apresentam déficits motores e cognitivos quando comparados com controles, incluindo déficits na aprendizagem e memória espacial.

3. Alterações comportamentais induzidas pela deficiência de tiamina

3.1. Aprendizagem, Memória e Amnésias

Aprendizagem e memória são funções básicas do SNC e fundamentais para a adaptação de um organismo ao meio ambiente. O termo memória se refere ao processo mediante o qual adquirimos, codificamos, conservamos e evocamos informação. A fase de aquisição da informação é coloquialmente chamada de “aprendizagem”, enquanto a evocação recebe também as denominações de expressão, recuperação e lembrança da informação armazenada (Cohen, 1984).

De acordo com seu conteúdo, a memória pode ser classificada em dois diferentes tipos: (i) a memória declarativa ou explícita e (ii) memória não declarativa, implícita ou procedural. A memória declarativa refere-se à retenção de experiências sobre fatos e eventos do passado, por exemplo, o indivíduo tem acesso consciente ao conteúdo da informação, sendo adequada para o arquivamento de associações arbitrárias após uma única experiência. A memória declarativa é flexível e prontamente aplicável a novos contextos. A memória declarativa é adicionalmente subdividida em memória para fatos (ou semântica) e para eventos (ou episódica). De acordo com Tulving (1972), memória episódica é a memória de eventos autobiográficos que podem ser lembrados conscientemente. A memória episódica armazena marcos espaciais e temporais que identificam o tempo e o lugar em particular em que um evento ocorreu. Por exemplo, uma memória episódica poderia envolver a memória de uma saída para jantar em um determinado restaurante com um certo amigo em uma noite particular. A memória semântica, ao contrário da episódica, envolve o conhecimento organizado do mundo, por exemplo, recordar onde determinado restaurante está localizado.

Contrariamente, a memória não-declarativa não pode ser descrita com palavras, ou seja, corresponde aquelas memórias cujo acesso não é consciente e seria evidente apenas através do desempenho. Esse tipo de informação é adquirida ao longo de diversas experiências, estando fortemente ligada à situação de aquisição original; seria, portanto, inflexível e pouco acessível a outros sistemas (Cohen, 1984; Squire & Zola-Morgan, 1991; Squire, 1992). A memória não-declarativa ou procedural pode ainda ser subdividida em habilidades e hábitos, pré-ativação, condicionamento clássico simples e aprendizagem não associativa (Squire e Zola-Morgan, 1991; Xavier, 1993).

A memória também pode ser classificada quanto ao seu tempo de duração, como: (i) memória de curta duração, responsável pelo arquivamento temporário de informações e (ii) memória de longa duração, responsável pelo arquivamento de informações por períodos de tempo mais longos (Peterson & Peterson, 1959). No final da década de 70, foi proposta uma nova classificação de memória que considera o fator determinante para a manutenção da informação o tipo de processamento inicial que a originou e não mais o tempo cronológico (Olton, 1979; Olton et al., 1979). De acordo com este novo conceito, informações apresentadas em contextos temporais específicos seriam manipuladas por um sistema de memória denominado operacional (ou memória de trabalho), sendo as informações mantidas por períodos de tempo durante os quais essas informações fossem relevantes para a execução de uma determinada tarefa, devendo ser posteriormente “apagadas”. Já informações que são usadas em diferentes situações e que, portanto, independem do contexto específico em que foram adquiridas, seriam arquivadas sob a forma de memória de referência, podendo ser arquivadas por diferentes intervalos de tempo. Independente da classificação adotada, a existência de pelo menos dois sistemas de memória com características distintas tanto de processamento da informação quanto de tempo de manutenção desta informação está bem estabelecida (Olton, 1979; Olton et al., 1979).

A perda da memória e/ou capacidade de aprender novas informações é conhecida como amnésia. A amnésia pode ser definida como um estado mental patológico em que a memória e o aprendizado estão afetados em proporções maiores que as demais funções cognitivas em pacientes sem alteração do nível de consciência (Kopelman, 2002). A amnésia anterógrada caracteriza-se pela diminuição da capacidade de consolidar novos conhecimentos após o evento que causou o trauma, levando o indivíduo a uma incapacidade parcial ou completa de recordar o passado recente. Já a amnésia retrógrada é definida pela perda de acesso a eventos que ocorreram, ou a informação que foi aprendida, antes do trauma. A amnésia também pode ser caracterizada de acordo com a região afetada. Indivíduos com amnésia diencefálica apresentam lesões principalmente em estruturas do diencefalo, sendo o núcleo medial dorsal do tálamo e os corpos mamilares no hipotálamo as regiões mais atingidas (Victor et al., 1989). Já amnésia temporal é causada por lesões principalmente no lobo temporal medial (ou áreas anatomicamente relacionadas), sendo o hipocampo a estrutura crítica no desencadeamento dessa síndrome. As primeiras sugestões sobre a importância dos lobos temporais mediais para a memória vieram de observações

sobre o paciente H.M., que logo após sofrer ablação bilateral dessa região começou a apresentar uma grave e inesperada deficiência de memória (Milner et al., 1968).

Atualmente, estudos neuropsicológicos têm fornecido mais informações sobre as estruturas e conexões cerebrais que são importantes para a memória. Além disso, testes comportamentais específicos em animais de laboratório permitem o estudo dos diferentes tipos de memória.

A avaliação da aprendizagem e memória de referência e/ou trabalho pode ser feita utilizando o teste no Labirinto Aquático de Morris (LAM) (Morris et al., 1981). Nesta tarefa, o animal aprende a localizar uma plataforma submersa (reforço positivo) em uma piscina (água=estímulo aversivo) utilizando, para isso, dicas espaciais distribuídas na sala de teste (**Fig. 3**). Uma das vantagens do labirinto aquático em relação a outras técnicas de estudo de aprendizagem espacial é que não depende de privação alimentar nem de apresentação de choques elétricos (Gimenes-Júnior, 2008).

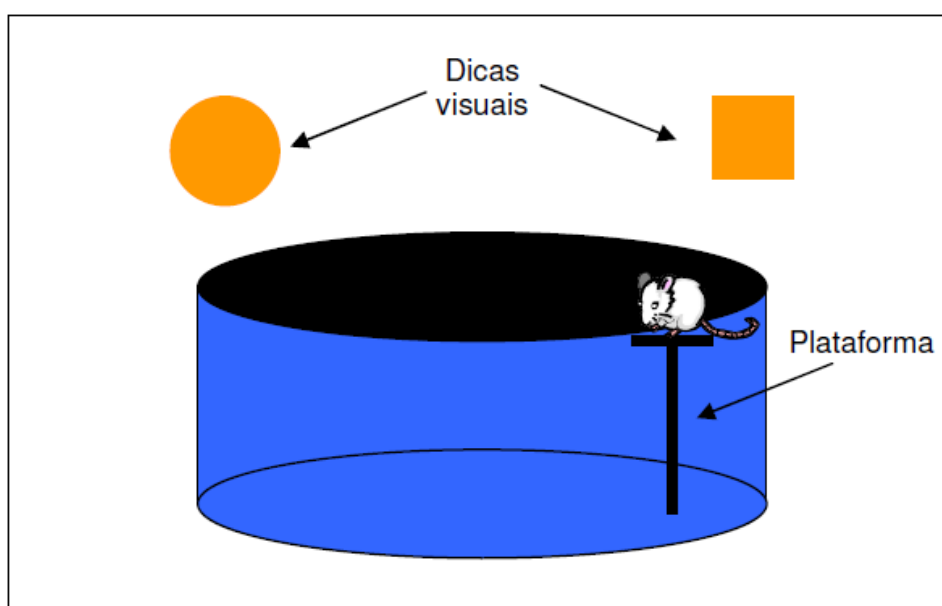


Fig. 3. Desenho esquemático indicando componentes da sala do teste comportamental e do Labirinto Aquático de Morris.

Outro teste utilizado para avaliar memória é o teste de alternância espontânea, que leva em consideração a tendência natural de ratos, camundongos e outros animais de explorar de forma abrangente um novo ambiente. Dessa forma, quando expostos ao labirinto, os animais tendem a alternar a escolha dos braços de maneira não reforçada, utilizando dicas espaciais presentes fora do labirinto. Este teste tem sido cada vez mais usado em estudos farmacológicos, como um método simples e rápido de mensurar aquisição e retenção de informação, não exigindo treinamento extensivo e uso de reforços convencionais (Hughes, 2004). Durante o teste, o animal deve lembrar os braços recém explorados, de forma a ser capaz de alternar sua escolha na tentativa seguinte, usando para isso a memória de trabalho de dicas espaciais presentes no ambiente. A tarefa de alternância envolve algumas regiões cerebrais, entre elas, o giro denteado do hipocampo, apresentando-se prejudicada em animais com lesões nessa região (Lalonde, 2012).

Uma série de estudos utilizando diferentes testes comportamentais, entre eles o LAM e o teste de alternância espontânea têm revelado alterações cognitivas em ratos DT similares às alterações encontradas em pacientes com a SWK. Langlais et al. (1992) mostraram que após um período de recuperação do episódio de DT, ratos apresentaram déficits na habilidade para encontrar a plataforma no LAM. Esse resultado é consistente com dados obtidos pelo nosso grupo que observou que animais DT apresentaram um pior desempenho que ratos controles na terceira e quarta sessões do treino no LAM, indicando um atraso no processo de aprendizagem (Pires et al., 2005; Carvalho et al. 2006). Entretanto, os déficits nos ratos DT são observados somente nas primeiras sessões do LAM, ou seja, não existe diferença entre os grupos DT e controle no desempenho na última sessão do treino. Esse dado indica que os animais DT apresentam uma velocidade de aprendizado menor, mas se continuam sendo treinados são capazes de aprender a tarefa de forma similar aos controles.

Déficits cognitivos também foram observados em ratos DT em tarefas de: alternância espontânea (Savage et al., 2003) conforme mencionado acima, alternância tardia, esquiva ativa e esquiva passiva (Mair et al., 1985). Irle & Markowitsch (1983) observaram um pior desempenho de ratos submetidos à DT e ao consumo crônico de etanol na aquisição da esquiva passiva quando comparados ao grupo controle. Nesse estudo, exames histológicos revelaram danos neurológicos proeminentes no tálamo e cerebelo. Além disso, foi observada perda neuronal nos corpos mamilares, em algumas regiões do córtex e no

tronco encefálico próximo ao terceiro ventrículo. Os resultados de Savage et al. (2003) estão de acordo com esse dados, pois mostram que a DT em ratos produz déficits cognitivos persistentes em tarefas envolvendo alternância espontânea em Labirinto em Cruz, constituído de quatro braços fechados.

Os efeitos da DT na memória, causando amnésia retrógrada ainda são controversos. Em um dos poucos estudos, no qual os autores avaliaram a presença de amnésia retrógrada em ratos DT, os animais mostraram retenção normal da localização da plataforma. Nesse caso, a localização da plataforma foi inicialmente aprendida durante um período de duas semanas antes do início do tratamento com piritiamina (Langlais et al. 1992). Esses resultados são confirmados em estudo conduzido pelo nosso grupo, que não encontrou efeito do etanol, da DT e nem da combinação de ambos os tratamentos na memória remota (Pires et al. 2005). Por outro lado, amnésia retrógrada foi encontrada em um estudo em que os animais foram incapazes de recuperar o desempenho na tarefa de alternância espacial que haviam aprendido antes do episódio de DT (Mair et al., 1985).

Béracochéa (2005) propôs três hipóteses sobre a localização da disfunção neural responsável pelos déficits cognitivos resultantes da DT. A primeira hipótese é que relevante dano funcional é restrito ao diencéfalo, sendo o tálamo uma das primeiras regiões a apresentar sinais de neurodegeneração. A segunda hipótese é que a DT afeta estruturas do lobo temporal, incluindo o hipocampo e que a amnésia diencefálica surge devido a uma disfunção entre o diencéfalo e o lobo temporal medial (Béracochéa, 2005; Savage et al., 2003). Evidências sugerem que até mesmo um dano discreto no diencéfalo altera a função de outras regiões, em particular o hipocampo. A terceira hipótese é que os danos causados pela DT são amplamente distribuídos e engloba múltiplas regiões corticais (Paller et al. 1997). Essas hipóteses permanecem sendo consideradas e muitos pontos continuam obscuros sobre as relações entre os substratos neurobiológicos e os aspectos de disfunções cognitivas.

3.2 Atividades e Disfunções Motoras

O equilíbrio motor é a capacidade física que permite ao indivíduo controlar qualquer posição do corpo sobre uma base de apoio, que esteja estacionária ou em movimento. O equilíbrio estático caracteriza-se pelo tipo de equilíbrio conseguido em determinada posição, ou pela capacidade de manter certa postura sobre uma base estática. O equilíbrio dinâmico é aquele conseguido com o corpo em movimento, determinando sucessivas alterações da base de sustentação, mantendo, dessa forma, uma resposta natural do organismo ao desequilíbrio provocado pelo deslocamento (Shumway-Cook & Woollacott, 2006).

A coordenação motora é definida como a capacidade de produzir a contração dos músculos de forma tal que sua atividade orquestrada resulta em um movimento biologicamente adequado ao contexto. Para a realização de um ato motor, o sujeito deve ser capaz de produzir ou ter arquivada uma estimativa interna dos parâmetros necessários para a sua execução (Vargas et al., 2008).

Em um modelo proposto por Wolpert & Kawato (1998), o sistema motor é visto como uma alça sensoriomotora fechada: comandos motores geram contrações musculares, que, por sua vez, acionam uma alça de realimentação sensorial que desencadeia um novo movimento. Essa retroação é composta pelas informações sensoriais derivadas tanto do próprio movimento como das modificações nas relações físicas entre as partes do sistema musculoesquelético e as informações provenientes do ambiente. O novo comando motor incorpora essas informações, gera outro comando motor e assim por diante.

Evidências sugerem que a predição, a correção e a execução dos movimentos estão organizadas em três níveis de controle: a medula espinhal, os sistemas descendentes do tronco encefálico e as áreas motoras do córtex cerebral. A integração é realizada por retroalimentação, por *feed-forward* e por mecanismos adaptativos, distribuídos entre os três níveis de controle motor. Os três níveis dos sistemas motores recebem entradas sensoriais e estão sob a influência de dois sistemas subcorticais: os núcleos da base e o cerebelo (Mussa-Ivaldi & Bizzi, 2000).

O cerebelo e os núcleos da base participam tanto do planejamento motor quanto do controle da execução do movimento. Essas regiões cerebrais subcorticais projetam para o córtex cerebral por meio de núcleos talâmicos distintos. O cerebelo melhora a precisão do

movimento pela comparação entre os comandos motores descendentes e a informação sobre a ação motora resultante. Essas correções pelo cerebelo dependem da atividade cerebelar sobre o tronco encefálico e as áreas motoras corticais, que se projetam diretamente para a medula espinhal, monitorizando tanto sua atividade como os sinais de retroalimentação que recebem da periferia (Kandel et al., 1997).

Os núcleos da base representam uma importante conexão subcortical entre o córtex motor e o restante do córtex cerebral. Eles são constituídos por grandes estruturas bem delimitadas, dentre as quais se destacam pela importância o corpo estriado (caudado e putamen), o globo pálido e a substância negra. O principal circuito motor do qual os núcleos da base participam origina-se nas áreas de associação. Dos núcleos da base, fibras projetam-se para o córtex-motor através do tálamo. As principais conexões aferentes do estriado originam-se do globo pálido constituindo a *ansa lenticulares* e o *fasciculus lenticulares*, feixes de fibras que se projetam aos núcleos talâmicos que, por sua vez, projetam-se ao córtex motor. Essas conexões formam o circuito cortico-estriado-tálamo-cortical. Através dessa e de outras vias, os núcleos da base implementam o processamento cortical e influenciam outros sistemas motores descendentes (Brandão, 1991).

De acordo com Jenkins et al. (1994) o cerebelo é ativado em fases iniciais do processo de aprendizagem motora, ao passo que o estriado é significativamente mais ativo durante a execução de tarefas já aprendidas. Até pouco tempo atrás, considerava-se que o cerebelo e os núcleos da base não eram interconectados, entretanto, achados contradizem essa visão e outros autores propõem uma importante interconexão entre essas estruturas (Hoshi et al., 2005).

O córtex pré-frontal está envolvido no planejamento de comportamentos complexos como, por exemplo, decidir levantar em determinada hora para chegar ao trabalho no horário, decidir parar na biblioteca para devolver um livro ou decidir que tipo de quadro pintar para uma aula de artes. O córtex pré-frontal especifica o objetivo para o qual os movimentos devem ser direcionados, e não os movimentos precisos a serem executados. Para executar um planejamento, o córtex pré-frontal envia instruções ao córtex pré-motor, que produz sequências complexas de movimento, apropriadas à tarefa. Se o córtex motor for lesionado, tais sequências não poderão ser coordenadas e o objetivo não poderá ser alcançado (Kolb & Whishaw, 2002).

Vários testes têm sido empregados para avaliar o comportamento motor em modelos experimentais, entre eles pode-se citar o *rotarod* e o *beam balance*. O teste no *rotarod*, desenvolvido inicialmente por Dunham e Miya (1957) é uma tarefa frequentemente utilizada para testar os efeitos de drogas no SNC. O procedimento requer que o animal mantenha o equilíbrio e a coordenação motora em uma base giratória, sendo, portanto, uma ferramenta útil para avaliar a função motora.

O teste no *beam balance* tem sido utilizado para avaliar a função vestibulomotora. O sistema vestibular, além de estabilizar a imagem na retina e participar do equilíbrio, fornece informações ao SNC para orientação espacial e percepção de movimento. Do ponto de vista funcional, a percepção estática e de movimento e o controle do equilíbrio necessitam da integração dos sistemas vestibular, proprioceptivo e visual, o que torna essas funções multisensoriais. Enquanto o *rotarod* é uma tarefa útil para determinar déficits motores grossos em ratos, a detecção de déficits motores mais sutis como coordenação motora fina, requer o uso de diferentes métodos como o *beam balance* (Buccafusco, 2001).

Dados obtidos por diferentes autores têm demonstrado que importantes estruturas encefálicas envolvidas na modulação e integração das respostas motoras (Lalonde & Strazielle, 2007) são seletivamente comprometidas na DT, destacando-se o cerebelo (Butterworth, 2003, Martin et al., 2003), o corpo estriado (Sjöquist et al. 1988, Yamashita et al., 1993) e o córtex pré-frontal (Carvalho et al., 2006).

A degeneração cerebelar é consideravelmente mais comum entre os alcoolistas do que a SWK, desenvolvendo-se em média 10 anos após o consumo crônico de álcool (Charness, 1993). Em estudos de autópsia, 40% dos alcoolistas apresentaram sinais dessa lesão (Torvik, 1987), que é caracterizada por retração de determinadas regiões do cerebelo, área envolvida principalmente na coordenação muscular. Dados de outros estudos também demonstram o papel dessa região em vários aspectos do funcionamento cognitivo e sensorial (Parks et al. 2003).

Freeman et al. (1987) relataram diminuição do comportamento exploratório em animais DT no teste “campo aberto”, tanto no que diz respeito à distância percorrida quanto ao número de levantamentos sob as patas traseiras, o que pode indicar, além de disfunção no componente motivacional, alterações no comportamento motor dos animais. Os efeitos da DT no desenvolvimento motor de animais experimentais também foram avaliados nas proles de mães submetidas à deficiência de B1 durante a lactação e a

gestação (Bâ & Seri, 1993, 1995; Bâ, 2008). Conforme resultados apresentados por esses autores, a DT se relaciona com níveis baixos de desenvolvimento funcional para algumas habilidades relacionadas ao controle motor dos animais (Bâ, 2008). Da mesma forma, nosso grupo de pesquisa (Ferreira-Vieira, 2009) observou que animais provenientes de mães restritas de tiamina no período perinatal apresentam uma redução significativa no tempo de permanência no teste do *rotarod* e um aumento na largura do passo no teste de impressão de patas.

Esses resultados sugerem que indivíduos com deficiência de B1 podem apresentar déficits relacionados à função motora, sendo provável que, considerando a complexidade dos sistemas neuroanatômicos relacionados com atividades motoras descritos acima, os mecanismos responsáveis pelas lesões neuropatológicas sejam múltiplos e necessitem de estudos mais detalhados para melhor entendê-los.

4. Alterações neuroquímicas induzidas pela deficiência de tiamina

4.1. GABA e Glutamato

Dentre os diversos circuitos envolvidos na neurotransmissão no SNC de mamíferos, a interação coordenada entre os estímulos excitatórios e inibitórios originados nos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, respectivamente; é fundamental tanto para o desenvolvimento quanto para a manutenção de funções cognitivas complexas como aprendizado e memória (Foster & Kemp, 2006).

Baseados em evidências indiretas alguns autores consideram que um aumento na liberação de neurotransmissores no hipocampo, principalmente de glutamato, seja o primeiro passo para a formação do potencial de longa duração (LTP - *long term potentiation*) (McGaugh, 2000; McGaugh & Izquierdo, 2000). O LTP é um fenômeno caracterizado por um aumento na eficácia da comunicação sináptica, sendo o principal correlato eletrofisiológico dos processos de aprendizado e memória.

O mecanismo molecular relacionado a formação do LTP no hipocampo envolve a ativação inicial do receptor glutamatérgico ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), seguido pela ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e metabotrópicos (mgluR). Esse processo abre canais de cálcio promovendo dessa forma, a ativação de enzimas como proteína quinase cálcio-dependente (PKC), proteína quinase

cálcio calmodulina dependente classe II (CaMKII), proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que por sua vez ativam mecanismos intracelulares que culminam com a síntese de proteínas necessárias para a manutenção do potencial de longa duração (McGaugh & Izquierdo, 2000). Manipulações farmacológicas envolvendo a LTP parecem estar associadas a alterações comportamentais, dependentes do hipocampo, que podem ser quantificadas por um déficit no desempenho de tarefas que envolvem aprendizado espacial (Boast et al., 1999, Bikbaev et al., 2008).

Outra substância fundamental no processamento da memória é o GABA (ácido gama-aminobutírico), um importante neurotransmissor inibitório do SNC (Chapouthier & Venault, 2002; Ramirez et al., 2005). Diversos tipos de neurônios GABAérgicos já foram localizados no hipocampo (Han et al., 1993) e a utilização de agonistas e antagonistas de receptores GABAérgicos corroboram o importante papel deste circuito na aprendizagem e memória.

Evidências científicas indicam que drogas que ativam o sistema GABAérgico promovem prejuízo na formação da memória quando administradas no ventrículo lateral, prosencéfalo basal, hipocampo e amígdala (Nagahara & McGaugh, 1992; Spanis et al., 1999; Maruki et al., 2001). Da mesma forma, um aumento da função inibitória GABAérgica provocado pela administração sistêmica de diazepam induz prejuízo cognitivo quando os indivíduos são avaliados no Labirinto Aquático de Morris (Arolfo & Brioni, 1991; McNamara et al., 1993). Por outro lado, drogas que inibem o sistema GABAérgico, promovem melhora no aprendizado e na memória (Nutt & Malizia, 2001; Getova & Dimitrova, 2007).

Além da participação do GABA e do Glutamato em processos cognitivos, estudos têm sugerido o envolvimento desses neurotransmissores em atividades relacionadas à funções motoras (Ozawa et al. 1998). Wardas et al. (1997) utilizando ligantes radioativos, em estudos com ratos jovens e idosos, mostraram evidências da participação do sistema glutamatérgico em processos relacionados à motricidade, sugerindo que distúrbios motores encontrados em ratos idosos podem ser consequentes à alterações em subunidades de receptores glutamatérgicos centrais. Sanchez- Perez et al. (2005) também demonstraram que os receptores de glutamato cerebelares do tipo N-Metil D-Aspartato (NMDA) são essenciais para a aquisição do aprendizado motor e para a execução de atividades

relacionadas à coordenação motora, corroborando a participação do circuito glutamatérgico no controle motor.

O papel do Glutamato e do GABA nos déficits comportamentais associados à DT é pouco investigado. Resultados de estudos nessa área têm mostrado que manipulações farmacológicas nos sistemas glutamatérgicos e GABAérgico alteram os danos neurológicos e cognitivos associados a DT. Injeções intra septal de bicuculina (antagonista GABA) aumentam a liberação de acetilcolina (ACh) no hipocampo e resulta na recuperação do déficit comportamental em tarefa de memória espacial (Roland & Savage, 2009). Em contraposição, injeção de MK-801 (antagonista não competitivo do receptor NMDA) administrada 30 minutos antes do teste comportamental aumenta a disfunção cognitiva presente em ratos DT (Savage et al., 1999). Nosso grupo de pesquisa encontrou diminuição nos níveis de GABA e glutamato no córtex pré-frontal e aumento significativo na concentração de GABA na substância cinzenta periaquedutal em modelo de deficiência grave de tiamina. Além disso, correlações entre esses neurotransmissores e desempenho no LAM foram observadas nesse estudo. As concentrações de glutamato e GABA não foram afetadas no tálamo (Andrade, 2011).

Os efeitos da DT nos níveis de Glutamato e GABA e em aspectos motores também foram investigados pelo nosso grupo de pesquisa. Nesses estudos a DT foi induzida em ratos através da dieta, sem o uso de piritiamina. Observamos que a DT reduziu significativamente o tempo de permanência dos animais no *beam balance* e no *rotarod* além de aumentar a largura do passo em teste de impressão de patas. Foi também observada redução significativa de glutamato e GABA no cerebelo (Pereira-Caixeta, 2011). Deve-se mencionar que os sinais neurológicos apresentados apareceram três meses após o tratamento, sendo o processo neurodegenerativo muito mais lento que quando se utiliza piritiamina. Uma limitação ao uso desse modelo é o fato desse protocolo causar lesões principalmente no tronco cerebral e cerebelo, não ocorrendo processo degenerativo no tálamo e nos corpos mamilares (Troncoso et al. 1981; Witt, 1985), sendo portanto um modelo mais adequado da EW (fase aguda) que da síndrome de Korsakoff (fase crônica) (Savage et al., 2012).

4.2. Acetilcolina

Existem várias evidências que sugerem um envolvimento do sistema colinérgico central em processos cognitivos (Chang & Gold, 2003; Parent & Baxter, 2004; Friellingsdorf et al., 2006). Alguns autores mostraram que a liberação de ACh está elevada em eventos de aprendizagem e memória (Stefani & Gold, 2001; McIntyre et al., 2002; Chang & Gold, 2003) e que o uso de antagonistas muscarínicos (Izquierdo et al., 1992) e nicotínicos (Felix & Levin, 1997) no hipocampo afeta a memória. Estudos comportamentais dos efeitos de danos a núcleos colinérgicos evidenciaram disfunção cognitiva associada a lesões na banda medial/diagonal e no núcleo basal (Hepler et al., 1985; Kesner et al., 1986). Outra evidência que relaciona função cognitiva e sistema colinérgico é o fato de que, transplantes no hipocampo de tecido de cérebro fetal rico em células colinérgicas podem restaurar a memória perdida por danos cerebrais (Dunnet et al., 1985).

Existem evidências que o consumo crônico de etanol resulta em perda de neurônios colinérgicos, diminuição da atividade da colina acetiltransferase e da concentração de ACh no córtex e hipocampo (Arendt et al., 1989; Casamenti et al., 1993; Cadete-Leite et al., 1995). Alguns autores encontraram diminuição na atividade da colina acetiltransferase no córtex cerebral e hipocampo de animais após tratamento crônico com etanol (Beracochea et al., 1986; Arendt et al., 1989, Casamenti et al., 1993). Dados obtidos pelo nosso grupo indicam que a DT induz uma diminuição na atividade da enzima AChE tanto no córtex quanto no hipocampo, enquanto o tratamento crônico com etanol diminui a atividade da AChE no hipocampo, mas não em outras regiões. Além disso, tanto o tratamento crônico com etanol quanto a DT diminuem a liberação basal e estimulada de ACh no córtex. Nesse estudo, foram encontradas correlações entre o desempenho dos animais nos testes cognitivos espaciais e os parâmetros colinérgicos (Pires et al., 2005).

Esses resultados estão de acordo com dados obtidos por Savage et al. (2003) que avaliaram a liberação de acetilcolina “*in vivo*” durante tarefa de alternância espontânea. Nesse estudo, foi observado um aumento desse neurotransmissor durante o teste comportamental, tanto em animais controles quanto DT. No entanto, a liberação de acetilcolina foi significativamente maior em animais controles que nos animais DT, sendo também observada uma correlação entre liberação de acetilcolina e desempenho no teste. Dados de estudo envolvendo o uso de injeções de fisostigmina (inibidor de

acetilcolinesterase) antes do teste mostraram melhora no desempenho de animais em tarefas de alternância espontânea (Roland et al., 2008), confirmando o papel do sistema colinérgico em tarefas de aprendizagem e memória.

5. Outros aspectos moleculares relacionados à deficiência de tiamina

Apesar dos vários estudos realizados, os mecanismos moleculares responsáveis pelas lesões e disfunções cerebrais induzidas por DT não são completamente conhecidos. Alguns autores relacionaram a morte neuronal observada em deficientes de tiamina ao estresse oxidativo gerado por danos mitocondriais (Park et al., 2000), descontrole do metabolismo oxidativo (Pannunzio et al., 2000), acidose (Hakim & Pappius, 1983) e à redução de atividade das enzimas α -cetoglutarato desidrogenase (Butterworth et al., 1986), transcetolase (Giguère & Butterworth, 1987) e complexo piruvato desidrogenase (Butterworth, 1985), que certamente levam a um déficit energético no cérebro (Lavoie & Butterworth, 1995).

Muitas informações acerca das alterações metabólicas decorrentes da DT têm sido provenientes de estudos com indivíduos alcoolistas, uma vez que há evidências de que muitas das doenças descritas no sistema nervoso destes indivíduos são, particularmente, consequências da DT (Baker et al., 1999; Phillips, 1990).

Lavoie & Butterworth (1995) compararam a atividade da transcetolase, do complexo piruvato desidrogenase e da α -cetoglutarato entre indivíduos alcoolistas e controle e observaram redução da atividade apenas da primeira (35% no cerebelo e tálamo, 22% no córtex frontal, 20% no córtex temporal, 19% no córtex prefrontal) e da segunda enzima (25% no córtex prefrontal).

Corroborando a observação de Lavoie & Butterworth (1995), Alexander-Kaufman et al. (2006, 2007), usando uma abordagem proteômica, também demonstraram que os níveis de expressão da transcetolase e da piruvato desidrogenase subunidade E1 β , estavam significativamente alterados na região BA9 de indivíduos alcoolistas tanto sem complicações, como com cirrose. Em contraste, alterações nos níveis de expressão dessas enzimas não foram observadas no hipocampo e no *splenium* do corpo caloso (Kashem et al., 2009), o que sugere que a DT pode não ter influência no mecanismo que leva aos danos induzidos por álcool no hipocampo.

Poucos estudos têm investigado alterações protéicas em modelo experimental grave de DT. Vetreno et al. (2012) mostraram recentemente redução no Fator Neurotrófico Derivado do cérebro (BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*) no hipocampo após período de recuperação de DT. A capacidade do BDNF de influenciar a função neuronal pode ser intrínseca à sua capacidade para modular a transmissão sináptica regulando a sinapsina I através do seu receptor tirosina quinase B (TrkB) (Jovanovic et al., 2000). A sinapsina I prende pequenas vesículas sinápticas ao citoesqueleto de actina, de uma forma dependente de fosforilação, regulando assim a disponibilidade vesicular nos terminais nervosos e a libertação do neurotransmissor (Greengard et al., 1993). Nosso grupo de pesquisa mostrou que o tratamento crônico com etanol associado à DT induz alterações nos níveis de fosforilação de algumas proteínas hipocâmpais, principalmente a proteína com peso molecular de 86kDa. Uma possível candidata para a p86K é a sinapsina I (Pires et al. 2007).

O uso de técnicas proteômicas (eletroforese bidimensional, análise de imagens e espectrometria de Massa) para estudar os efeitos da DT em modelo experimental ainda não foi empregado. A proteômica estuda os processos biológicos através da análise sistemática das proteínas expressas nas células ou tecidos em condições fisiológicas específicas. Sendo assim, o proteoma reflete o estado de funcionamento do sistema, em um determinado momento e condição, ou seja, a expressão funcional do genoma. O tema foi prontamente absorvido pela comunidade acadêmica como uma das vertentes da era pós-genômica. Enquanto o genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da sua vida, o proteoma é extremamente dinâmico e variável já que considera as mudanças nas taxas de expressão das proteínas, presença de isoformas, interações proteína-proteína, presença ou ausência de novas moléculas associadas a doenças, como também a maioria das modificações pós-traducionais (Tyers & Mann, 2003). A utilização dessa técnica pode auxiliar na elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis pelas lesões e disfunções cerebrais e comportamentais induzidas pela DT.

PARTE I

***ALTERAÇÕES PROTÉICAS E FUNÇÃO COGNITIVA EM MODELO DE
DEFICIÊNCIA GRAVE DE TIAMINA***

PARTE I – EXPERIMENTO 1

HIPÓTESE: O perfil proteômico do tálamo é afetado pela deficiência de tiamina e o déficit cognitivo espacial, observado em estudo prévio usando modelo de deficiência grave dessa vitamina, se relaciona com alterações em proteínas talâmicas.

1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos da deficiência grave de tiamina, em ratos adultos, sobre o perfil proteômico do tálamo e avaliar a relação entre o desempenho em tarefa cognitiva espacial e níveis de proteínas no tálamo*.

2. Específicos

Em ratos adultos, submetidos ou não à deficiência grave de tiamina, avaliar:

2.1. O perfil de proteínas do tálamo;

2.2. A correlação entre os níveis de proteínas no tálamo e o desempenho dos ratos em tarefa de aprendizagem e memória espacial.

* Os tratamentos controle e de DT e os testes comportamentais foram conduzidos em um grupo de animais (sub-grupos: controle e deficiência de tiamina) com duas propostas de estudos neurobiológicos: (i) avaliar parâmetros serotoninérgicos no tálamo e (ii) avaliar o perfil proteômico também no tálamo. Os dados comportamentais e neurobiológicos referentes à proposta (i) foram publicados na *Behavioral Brain Research* (Vigil et al., 2010).

O experimento 1, parte do presente estudo, se refere à proposta (ii), no qual foram utilizadas as amostras de tálamo de um dos hemisférios desses animais para o estudo da expressão de proteínas. As concentrações das proteínas que foram significativamente alteradas pela DT foram utilizadas para a investigação da relação entre esse parâmetro e o desempenho em tarefa cognitiva espacial. Esses dados foram submetidos à publicação na *Neuroscience Letter* (cópia do manuscrito no **anexo 4**). Embora os experimentos referentes às avaliações comportamentais não façam parte desse trabalho, optamos pela apresentação detalhada de todo o método visando um melhor entendimento do estudo.

1. Delineamento Experimental

Trinta e dois ratos machos, com aproximadamente três meses de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram divididos em dois grupos experimentais: I - Grupo controle (C, n = 16): animais tratados com ração padrão e injeções diárias de solução salina, II - Grupo deficiente em tiamina (DT, n = 16): animais tratados com ração deficiente em tiamina e injeções diárias de piritiamina (0,25 mg/ kg, Sigma Chemical Co.).

As rações, com e sem tiamina, foram produzidas no próprio laboratório de acordo com os requerimentos descritos por Warner (1962), sendo que a composição da ração deficiente em tiamina difere da ração padrão apenas com relação à ausência de tiamina (Anexos 5, 6 e 7). O critério para interromper o episódio de DT foi clínico. No momento em que os animais apresentaram sinais neurológicos desta deficiência, ou seja, convulsões e/ou perda do reflexo de endireitamento o tratamento foi interrompido através de injeções de tiamina (100 mg/kg). Após o período de recuperação - aproximadamente um mês - os animais foram submetidos ao teste no LAM onde aspectos da aprendizagem espacial foram avaliados. Um dia após os testes comportamentais, os animais foram mortos por decapitação e o cérebro foi separado. A região do tálamo foi dissecada e as amostras processadas para a avaliação do perfil de proteínas dessa região (Fig. 4). Os procedimentos experimentais adotados neste trabalho estão em concordância com as normas internacionais de uso de animais em laboratório (National Research Council, 1985)

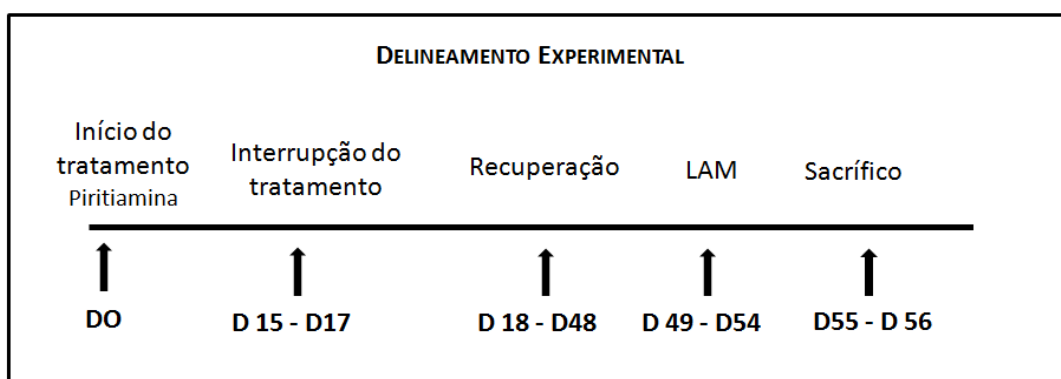


Fig. 4. Esquema do Delineamento Experimental. DO: Dia Zero = primeiro dia do tratamento. Tratamento= episódio de deficiência de tiamina. LAM= Labirinto Aquático de Morris.

2. Estudo Comportamental – Labirinto Aquático de Morris.

2.1. Equipamento

Os testes foram realizados no Labirinto Aquático de Morris, que consiste em uma piscina circular de fibra de vidro, com 1,80 m de diâmetro, contendo água a 25⁰C até o nível de 30 cm, conforme previamente descrito (Morris, 1981) (**Fig. 5**). Esta piscina é dividida, virtualmente, em quatro quadrantes denominados NW (noroeste), SW (sudoeste), NE (nordeste) e SE (sudeste). Uma plataforma de resgate, circular (15 cm de diâmetro) e de acrílico transparente foi fixada no centro de um desses quadrantes, a dois centímetros abaixo do nível da água. Para impedir a localização visual da plataforma, a água foi turvada com a adição de 80 g de leite em pó. A piscina não possui nenhuma pista, marca ou sinal interno, mas se encontra instalada em uma sala de 3 x 3 m, com pistas visuais estáveis extra-labirinto, que servem de referências espaciais para que o animal localize a plataforma. Uma câmera de televisão com lente angular foi fixada no teto da sala bem acima da piscina para registrar os testes. Essa camara é acoplada a um computador onde um programa de análise de imagens é utilizado para tratamento dos dados registrados durante o teste.



Fig. 5. Foto da sala onde são realizados os testes no Labirinto Aquático de Morris. Nessa foto pode-se observar: (i) a piscina azul no centro da sala e (ii) algumas das pistas visuais extra-labirinto (p.ex. torneira e mangueira à esquerda, caixa azul à direita). O círculo branco foi desenhado na foto para indicar a localização da plataforma submersa.

2.2. Treino

Cada animal foi submetido a um treino constituído de quatro tentativas por sessão. As sessões foram diárias durante cinco dias consecutivos. A plataforma estava localizada em uma posição fixa no centro de um dos quadrantes, denominado quadrante alvo. Em cada tentativa o animal foi colocado na piscina a partir de uma posição cardeal diferente, sinalizada na borda (norte, sul, leste, oeste) com o focinho voltado para a parede da piscina. A tentativa era finalizada quando o animal encontrava a plataforma ou quando era conduzido até ela caso não a encontrasse no tempo máximo previamente estipulado, que foi de 60 segundos. Depois de encontrar ou ser guiado até a plataforma, os ratos eram deixados neste local por 15 segundos e em seguida retirados da piscina. O intervalo entre as tentativas foi de aproximadamente 12 minutos. A latência, tempo em segundos gasto pelo animal para encontrar a plataforma e a distancia percorrida (cm) foram utilizadas para avaliar a aquisição da informação espacial. Quanto maior a latência ou a distância percorrida, pior o desempenho do animal.

3. Dissecção do cérebro

No dia seguinte à última avaliação comportamental, os animais foram mortos por decapitação. O cérebro foi rapidamente retirado da cavidade craniana e dissecado de acordo com as coordenadas estereotáxicas apresentadas por Paxinos & Watson (1986). O cérebro foi colocado ventralmente sobre uma superfície plana. Em seguida foi realizado um corte sagital para possibilitar a visualização da região medial diencefálica e permitir a retirada do tálamo.

4. Estudo bioquímico - Análise Proteômica

4.1. Preparação da amostra

As amostras de tálamo provenientes de oito animais, sendo estes quatro controles e quatro deficientes de tiamina foram preparadas como descritas previamente por Paulson et al. (2004), com algumas modificações. Em resumo, cada tálamo foi homogeneizado em clorofórmio/metanol/água (4/8/3 v/v/v), a suspensão foi agitada continuamente por 1 hora e centrifugada à 2000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante, contendo os lipídios, foi descartado e esse processo foi repetido por mais duas vezes. O precipitado (*pellet*) foi seco à \pm 4°C durante a noite. Em seguida, o *pellet* foi dissolvido em 100 μ L de tampão da amostra contendo: urea 7M, tiourea 2M, heptil fenil hidroxipropil dimetilamoniopropanosulfonato

(C7bZO) 1% e Tris 40mM. As amostras foram incubadas por 4 horas e, após centrifugação (5000 x g por 5 minutos) o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada por método espectrométrico, usando o *Kit Quant 2-D (GE Healthcare)*.

4.2. Eletroforese Bidimensional e análise quantitativa

O protocolo para a eletroforese bidimensional foi seguido conforme descrito anteriormente por Wildgruber et al. (2000). As amostras, 250 µg de proteína, foram solubilizadas em tampão de rehidratação, contendo: uréia 7M, tiourea 2M, colamidopropil dimetilamonio propanosulfonato (CHAPS) 2%, gradiente de pH imobilizado (IPG) 0,5%, azul de bromofenol 0,002% e aplicadas às tiras com IPG (7cm, pH 3-11 NL) (GE Healthcare) por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a focalização isoeletrica na unidade *IPGphor (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, E.U.A)* ajustando-se as condições (parâmetros) da “corrida” nas seguintes sequências: 200V durante 6 h, 500V durante 1 h, 1000V durante 1 h, 8000V (gradiente) e, finalmente, 8.000V para um total de 35 Milvolts/hora (MVH). Antes de proceder a segunda dimensão as tiras foram tratadas por 15 minutos, sob suave agitação, em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 74mM, pH 8.8, uréia 6M, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,002%, SDS 2%) contendo DTT 1% e, em seguida por mais 15 minutos contendo iodocetamida 3%.

Na segunda dimensão as proteínas foram separadas em gel 12,5% de poliacrilamida em presença de SDS (PAGE-SDS) no sistema miniVE Vertical (*Amersham Biosciences, San Francisco, CA*). As tiras IPG foram mergulhadas por alguns minutos no tampão de corrida e em seguida posicionadas horizontalmente no topo do gel e cobertas com solução de agarose morna (agarose 0,5%, SDS 1% e traços de azul de bromofenol) para selar. A “corrida” eletroforética foi realizada limitando-se a corrente a 100 V até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel.

Após eletroforese, as proteínas foram fixadas no gel por duas horas, nas seguintes condições: uma hora e meia (3 X 30 minutos) em solução de etanol 30%, ácido ortofosfórico 2%, em seguida mais 30 minutos (3 X 10 minutos) em ácido fosfórico 2% e finalmente mais 30 minutos na solução de ácido fosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 12%. Após a etapa de fixação, os géis foram corados com *Coomassie Blue Coloidal (G250 - Sigma)* 2%, por cinco dias.

Análise quantitativa: Os mapas bidimensionais obtidos foram escaneados no *Image Master LabScan* v. 3.0 e analisados através do programa *Image Master™ 2D Platinum* v. 6.0 (GE Healthcare). A detecção dos *spots* foi realizada de modo automático adotando os seguintes parâmetros: *smooth*=2, área mínima=5 e *saliência*= 65,000. Após este procedimento alguns ajustes (correções) manuais foram realizados, sendo estes: separação de dois *spots* próximos detectados como um único *spot* pelo programa, adição de *spots* não detectados pelo programa, remoção de manchas (*backgrounds*) detectadas pelo programa como *spot*.

Os *spots* coincidentes em função da sua posição no gel foram pareados automaticamente a partir de *landmarks*. O gel com o maior número de *spots* foi escolhido como o gel referência.

5. Análise estatística

Os dados relativos ao aprendizado no LAM foram analisados por ANOVA 2 x 5, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: tratamento (dois níveis: deficiência de tiamina e controle) e desempenho nas cinco sessões consecutivas de treino. Os resultados dos testes comportamentais foram analisados através do programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 17.0.

Para a comparação do perfil de proteínas entre os grupos controle e DT foi realizada a normalização dos *spots*, ou seja, a intensidade óptica de cada *spot* foi mensurada pela somatória dos “*pixels*” dentro da área do *spot* (volume do *spot*) e convertida para uma porcentagem em relação à intensidade do total de *spots* detectados no gel. Dessa forma os dados foram analisados em $\%V = \text{volume } spot / \sum \text{volumes de todos os } spots \text{ presentes no gel}$.

A distribuição gaussiana dos dados foi verificada considerando os valores de porcentagem de volume dos *spots*. O teste *t* de *Student* foi utilizado para verificar se houve diferença significativa no volume relativo de cada proteína entre o grupo controle e DT. Essas análises foram feitas utilizando-se o programa de análise de imagens *Image Master™ 2D Platinum* v. 6.0 (GE Healthcare).

Foram feitas análises de regressão linear entre os valores de porcentagem de volume dos *spots* (proteína) - que apresentaram níveis de expressão alterados - de cada animal e a sua latência na terceira sessão do LAM. Em todas as análises, diferenças foram consideradas significativas no nível de 5 % .

1. Estudo Comportamental (Vigil et al., 2010)

O resultado da aquisição da tarefa espacial nas cinco sessões de treino no Labirinto Aquático de Morris está expresso em latência (tempo gasto, em segundos, para o animal encontrar a plataforma) e apresentado na **figura 6**. O teste ANOVA com medidas repetidas no último elemento (2x5, fatores: tratamento e sessões) mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina ($F_{(1,30)} = 6,00$; $p=0,02$) e da sessão ($F_{(4,12)} = 27,06$; $p=0,00$). Houve uma tendência de interação entre deficiência de tiamina e sessão ($F_{(4,12)} = 2,30$; $p=0,06$). O desempenho dos animais do grupo controle foi significativamente melhor quando comparado ao grupo deficiente de tiamina na terceira ($t_{(30)} = 2,7$, $p = 0,01$) e na quarta sessão ($t_{(30)} = 3,6$, $p = 0,001$).

Apesar do efeito significativo da deficiência de tiamina no aprendizado, os animais submetidos à deficiência foram capazes de aprender a tarefa espacial, diferindo dos animais controles apenas na velocidade de aquisição, pois ao final do período de treino (5ª sessão) todos os animais apresentaram o mesmo desempenho.

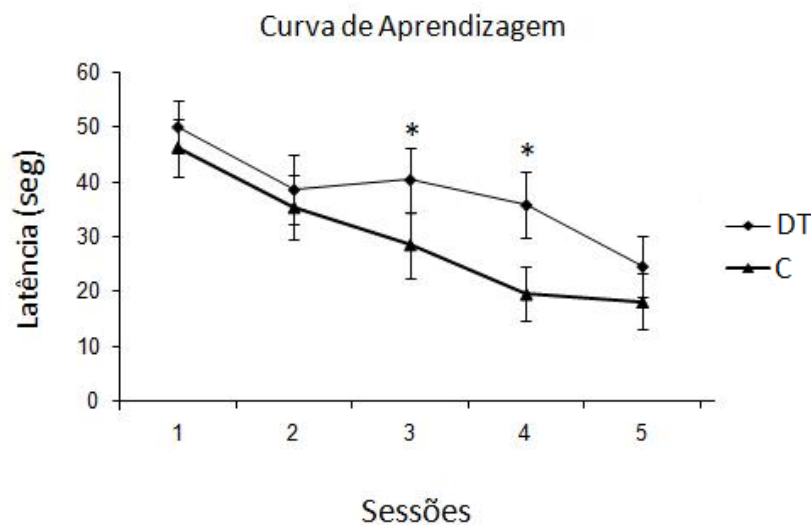


Fig. 6. Curva de aprendizagem no Labirinto Aquático de Morris (LAM) durante as cinco sessões de treino. O desempenho dos animais é apresentado para os grupos DT=Deficiente de Tiamina e C=Controle. Detalhes no texto.

2. Estudo Bioquímico - Análise Proteômica

A **Figura 7** mostra o perfil das proteínas expressas no tálamo de ratos dos grupos controle (painel a) e deficiente de tiamina (painel b), detectadas nas condições empregadas no presente estudo (detalhes na sessão de métodos, item 4.2). Cerca de 320 *spots* foram detectados em cada um dos géis dos animais de ambos os grupos. Ou seja, não houve diferença no número de proteínas expressas entre deficiente de tiamina e controle. A comparação entre os géis pode ser limitada pela dificuldade de sobreposição dos *spots*. Entretanto, neste estudo, em média 257 *spots* em cada gel (cerca de 80% dos *spots*) apresentaram correspondência no gel de referência, permitindo excelente comparação entre os grupos.

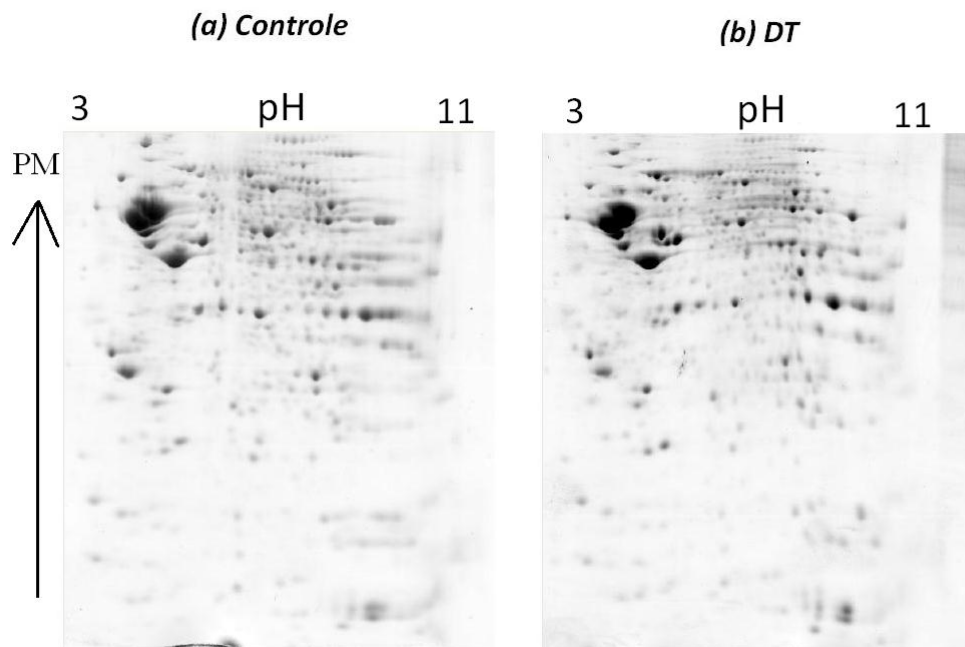


Fig. 7. Perfil de proteínas, detectadas por eletroforese bidimensional, expressas no tálamo de ratos dos grupos controle (painel a) e deficiente de tiamina (DT= painel b). A primeira dimensão foi realizada em tiras IPG de 7 cm faixa de pH 3 a 10 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12,5% em presença de SDS. Os géis foram corados com Coomassie Coloidal. PM= peso molecular.

Aplicando-se o teste *t*, **unilateral**, para comparar a % de volume das proteínas dos animais dos grupos controle e deficiente de tiamina, observou-se que 16 proteínas apresentaram padrões diferenciais de expressão ($p < 0,05$). Esses *spots* (16 proteínas) estão indicados com um círculo, na foto do gel apresentado na **Fig. 8**. Considerando os resultados obtidos no teste *t* de *student* **bilateral**, somente sete proteínas apresentaram-se alteradas de forma significativa no grupo deficiente de tiamina (**Fig. 8** - setas). Dessas proteínas significativamente alteradas no grupo deficiente de tiamina, três mostraram-se com o volume aumentado e as outras quatro com o volume reduzido em relação ao controle. (**Fig. 9**).

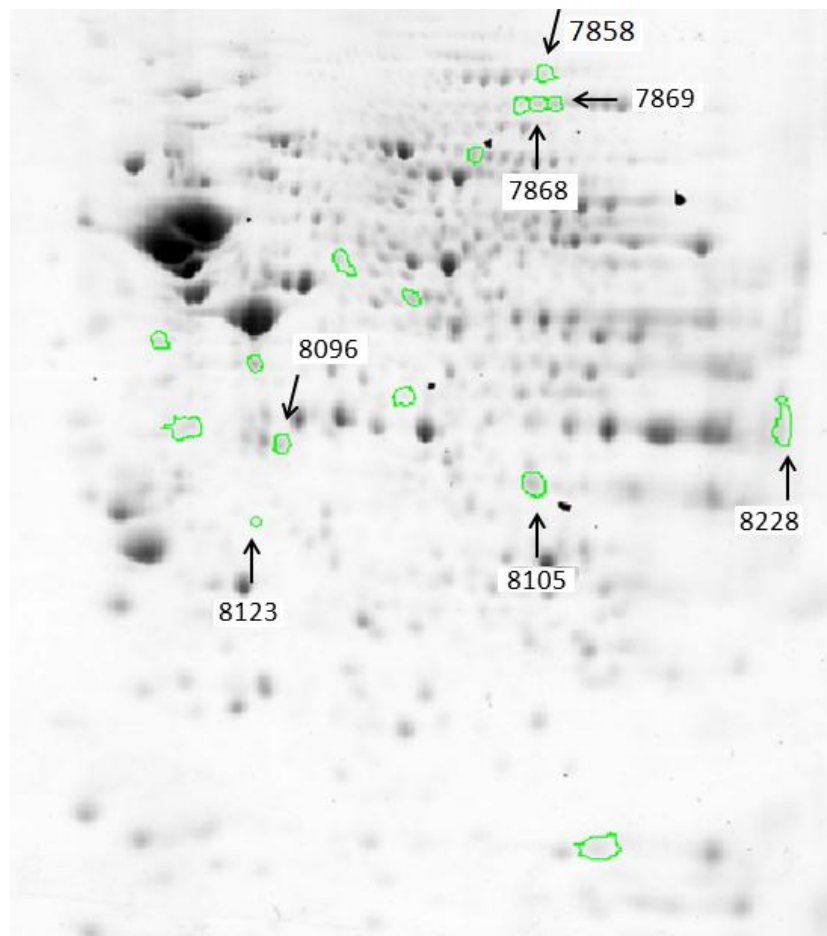


Fig. 8. Perfil Protômico do tálamo de ratos Wistar. *Spots* circundados indicam proteínas expressas de forma significativamente diferente entre os grupos DT e controle ($p \leq 0.05$, unilateral). Setas indicam as sete proteínas com expressão significativamente diferente, $p < 0,05$, quando o teste *t*- *student* é bilateral.

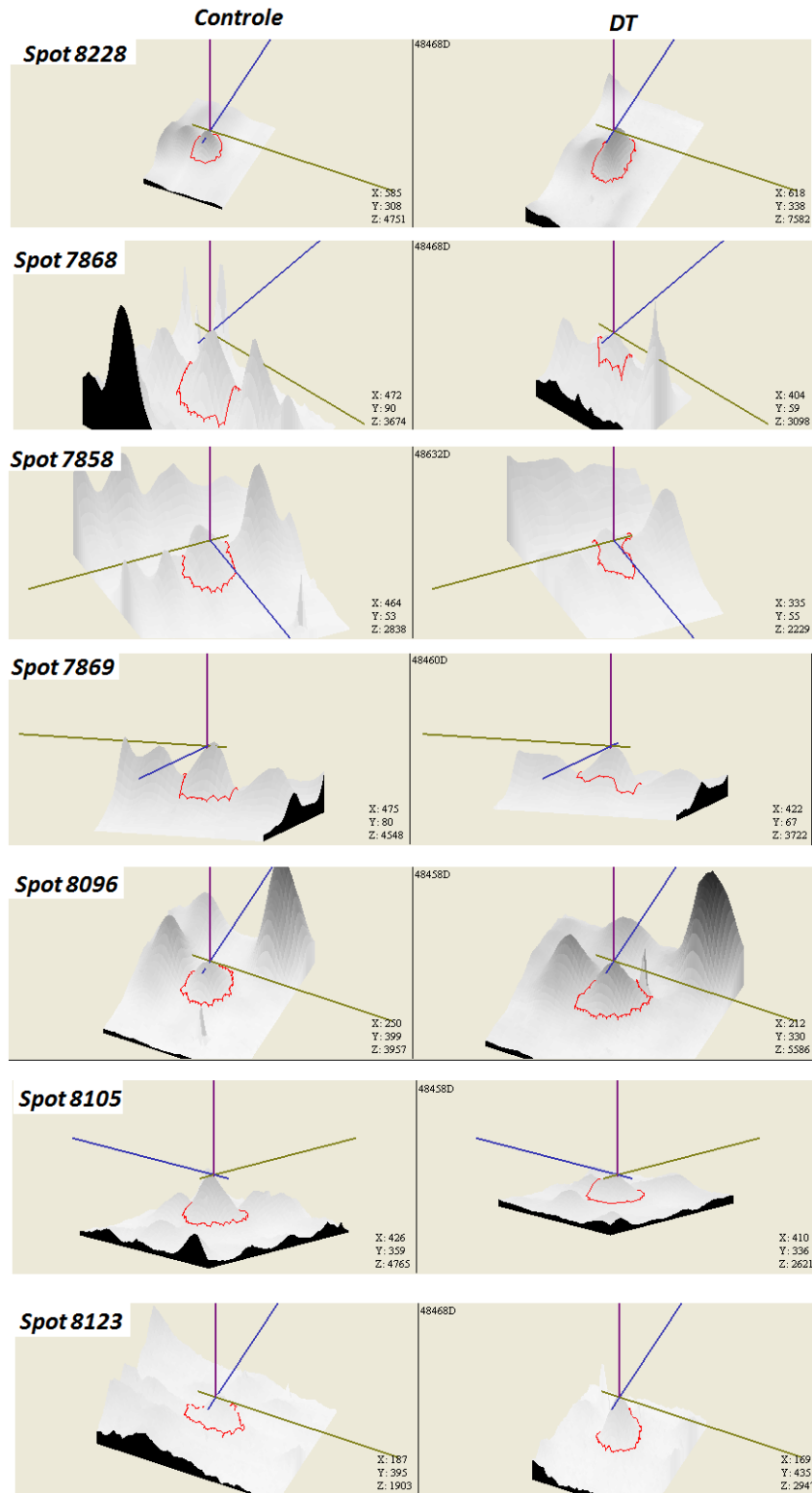


Fig. 9. Imagem tridimensional gerada pelo programa *Image Master*TM 2D Platinum v. 6.0 das sete proteínas do tálamo diferencialmente expressas em amostras controle (coluna à esquerda) e deficiente de tiamina (DT: coluna à direita). A deficiência de tiamina teve efeito significativo ($p < 0,05$, bilateral) sobre a expressão dessas proteínas, sendo que quatro foram reduzidas (*spots* 7868, 7858, 7869, 8105) e três aumentadas (*spots* 8228, 8096, 8123) em relação aos controles.

Os resultados das análises de regressão entre o desempenho dos animais no LAM e os níveis de cada uma das sete proteínas que tiveram expressão alterada pela DT, mostraram que quatro dessas proteínas apresentaram correlação significativa com a latência para encontrar a plataforma, na terceira sessão do treino no LAM (**Fig. 10**). Para três delas (*spots* 7858, 8123 e 8228) a correlação não foi significativa. Foi verificada correlação negativa entre o volume relativo dos *spots* 7868 [$r = -0,77$; $p=0,02$], 7869 [$r = -0,86$; $p=0,005$] e 8105 [$r = -0,83$; $p = 0,02$] e a latência na terceira sessão do treino do LAM. Ou seja, quanto menor a expressão dessas proteínas maior o tempo (pior o desempenho) que os animais gastaram para encontrar a plataforma no terceiro dia de treino no LAM. Uma proteína, *spot* 8096, apresentou correlação positiva com a latência na terceira seção do LAM [$r = 0,90$; $p=0,002$].

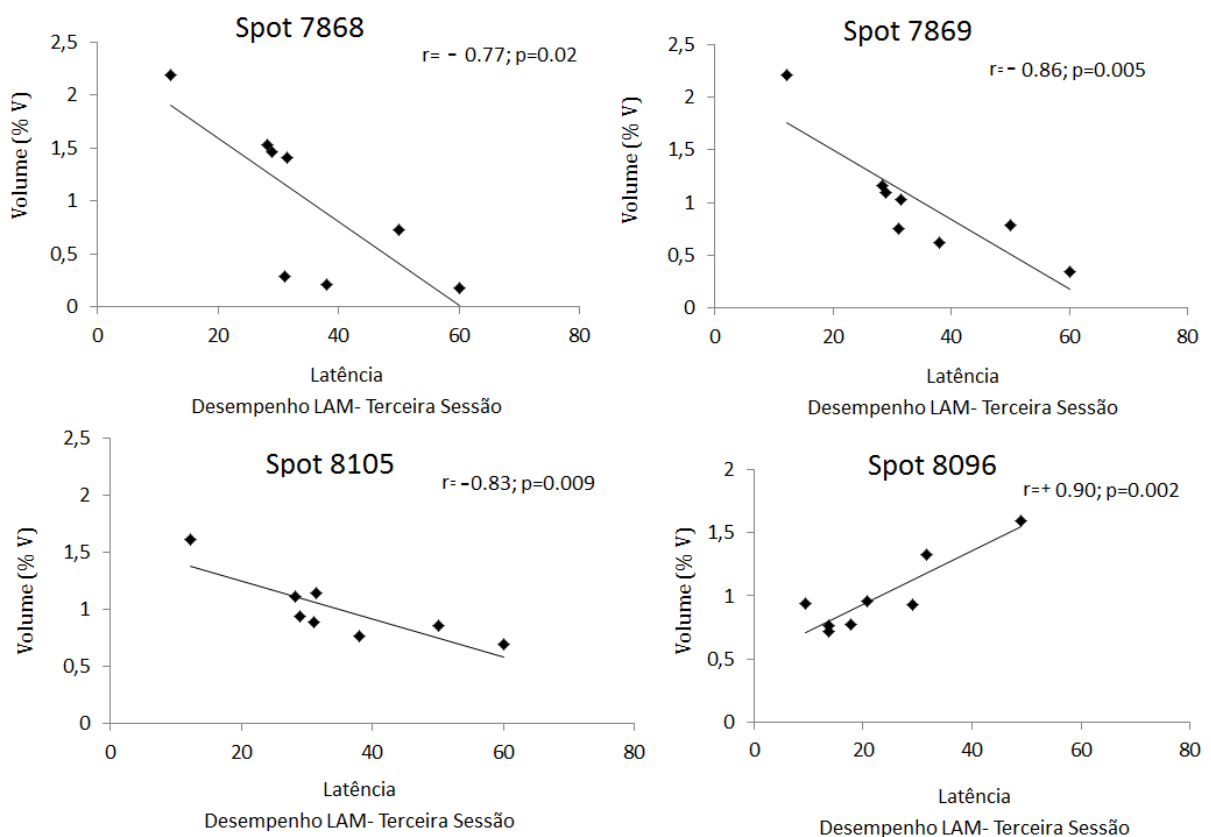


Fig. 10. Gráficos de Dispersão mostrando a correlação entre o volume relativo de cada proteína (*spots* 7868, 7869, 8105, 8096) e a latência para encontrar a plataforma na terceira sessão do Labirinto Aquático de Morris.

Como descrito por Vigil et al. (2010) animais DT mostraram prejuízo na aquisição da tarefa espacial no Labirinto Aquático de Morris. Esses resultados são consistentes com achados prévios obtidos por nosso grupo (Pires et al., 2005, Carvalho et al., 2006) e outros autores (Mumby et al., 1995; Langlais & Savage, 1995) nos quais ratos com DT apresentaram déficits no aprendizado espacial. O desempenho em teste cognitivo espacial é principalmente associado ao hipocampo (Morris et al., 1990; Moser et al., 1995). No entanto, o presente estudo é o primeiro a mostrar que o déficit no LAM em animais DT se relaciona com alterações nos níveis de algumas proteínas do tálamo, indicando a participação dessas proteínas no mecanismo neurobiológico do aprendizado espacial.

De acordo com Aggleton & Brown (1999) a comunicação do hipocampo com os corpos mamilares e o núcleo talâmico anterior, através do fórnix, é fundamental para a memória episódica normal. Além disso, danos a esse eixo são responsáveis pelos déficits centrais em memória (Aggleton & Sahgal., 1993; Savage et a., 2011).

Uma série de estudos tem sido realizada com o objetivo de determinar a relação entre disfunção talâmica e amnésia em modelo experimental de DT. Lesões na lâmina medular interna (LMI) e no núcleo anterior do tálamo são aparentemente responsáveis pelos déficits de memória e aprendizagem presentes em ratos submetidos a DT. Langlais et al. (1992) mostraram que ratos DT com a LMI pouco lesionada possuem uma curva de aquisição no LAM similar aos animais controles, enquanto animais com LMI amplamente lesionada possuem maiores latências para encontrar a plataforma. Da mesma forma, Langlais & Savage (1995) observaram déficits em tarefa de alternância espacial somente em animais com amplas lesões na LMI. O núcleo anterior do tálamo também parece estar envolvido em processos de aprendizagem e memória espacial, uma vez que dano nessa região produz amnésia persistente. Há evidências de considerável perda neuronal (50- 90%) no núcleo anterior do tálamo após episódio de DT (Langlais & Savage, 1995). Ampla lesão nessa região piora o desempenho de roedores em dois tipos de tarefa dependente do hipocampo (alternância espontânea e alternância espontânea tardia). Em contraposição, pequena lesão no núcleo anterior do tálamo não altera o desempenho na alternância espontânea (Savage et al., 2011).

Correlações entre alterações neuroquímicas no tálamo e déficits cognitivos também têm sido reportadas em animais DT. De modo geral, há uma significativa redução dos níveis de GABA e glutamato no tálamo após a restauração dos níveis de tiamina e aumento nos níveis de serotonina e seus metabólitos (Langlais et. al., 1988). Vigil et al. (2010) observaram uma

correlação entre parâmetros serotoninérgicos e desempenho em tarefa de aprendizagem espacial, indicando que níveis elevados de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) estão correlacionados com um prejuízo no desempenho de ratos no LAM.

Apesar do papel do tálamo nos déficits comportamentais associados à DT ter sido reconhecido há muitos anos, os mecanismos moleculares subjacentes a essas alterações são desconhecidos. O presente estudo, além de reportar tanto aumento quanto redução nos volumes de proteínas do tálamo, também mostra que algumas dessas proteínas estão envolvidas no mecanismo neurobiológico associado ao desempenho dos animais no LAM.

É interessante destacar que a correlação entre os volumes das proteínas alteradas só foi verificada com a latência para encontrar a plataforma na terceira sessão do LAM. Uma típica curva de aquisição no LAM para animais DT mostra um déficit nas etapas intermediárias do processo de aprendizagem (3^o e 4^o sessões) seguido por um desempenho similar aos controles (5^o sessão) (Langlais et al., 1992, Carvalho et al., 2006). Uma possível explicação para esses resultados é que o processo de aprendizagem, que pode ser considerado um processo neurobiológico dinâmico, possui uma característica cinética que seja crítica, em etapas intermediárias, para a codificação da informação responsável pela mudança do comportamento. Então, como consequência da neurodegeneração, a velocidade do processo é afetada, mas ao longo do treino, todos os animais são capazes de aprender a tarefa. Nesse caso, pode-se dizer que as sete proteínas alteradas que foram mostradas nesse estudo têm um papel no início do processo, sendo um dos substratos biológicos para aprendizagem espacial. Além disso, pode-se supor que caso o treino continue, outros mecanismos biológicos são requisitados para compensar a disfunção e os déficits comportamentais induzidos pela deficiência de tiamina.

Estudos adicionais são necessários para caracterizar, por espectrometria de massa, as proteínas alteradas. Até o momento, somente a proteína G (*GTP-binding nuclear protein Ran*) foi identificada. Proteína G é uma classe de proteínas envolvida na tradução de sinais celulares. Quando um ligante ativa o receptor acoplado à proteína G, ele induz uma mudança conformacional no receptor que permite que este funcione como um fator que ativa a troca do nucleotídeo guanina, colocando GTP no local do GDP que está na subunidade $G\alpha$. Isso desencadeia a dissociação da subunidade $G\alpha$ do dímero $G\beta\gamma$ e do receptor. Ambas, $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$, podem então ativar diferentes cascatas de sinalização (vias de segundo mensageiro, como o AMPc, por exemplo) e proteínas efetoras (Hamm, 1998).

Estudos genéticos, farmacológicos e eletrofisiológicos em uma variedade de organismos têm ressaltado a importância da via AMPc/PKA na plasticidade sináptica, aprendizado e memória. Experimentos realizados em *aplysias* e drosófilas forneceram as primeiras evidências que mecanismos de sinalização mediados por AMPc acoplado à proteína G exercem um papel importante em formas de aprendizado e memória (Barco et al. 2002; Bourchouladze 2002; Lonze & Ginty 2002). Não há nenhum relato na literatura sobre o papel da proteína G no déficit de aprendizagem presente em ratos DT.

Os dados do presente estudo sugerem que o processo de neurodegeneração induzido pela DT envolve alterações em proteínas específicas no tálamo, tanto no sentido de aumentar quanto diminuir a expressão dessas moléculas. Além disso, nosso trabalho confirma o papel do tálamo na amnésia presente em ratos DT, provendo um novo caminho para estudo dos mecanismos moleculares subjacentes aos déficits comportamentais induzidos pela DT. Além disto, os dados obtidos abrem um novo caminho para se entender, em futuros estudos, as bases moleculares do aprendizado espacial.

PARTE I – EXPERIMENTO 2

HIPÓTESE: A deficiência grave de tiamina altera os níveis de sinapsina I e/ou fosfo-sinapsina I no hipocampo, interferindo com a relação dessas proteínas com o desempenho dos animais no teste comportamental de alternância espontânea.

1. Objetivo Geral

Verificar os efeitos da deficiência de tiamina nos níveis hipocâmpais de sinapsina I e fosfo-sinapsina e no desempenho de ratos durante tarefa de navegação espacial. Além disso, avaliar a correlação entre os níveis hipocâmpais dessas proteínas e o desempenho no teste de alternância espontânea *.

2. Específicos

Em ratos adultos, submetidos ou não à deficiência grave de tiamina, avaliar:

2.1. Aspectos cognitivos em tarefa de alternância espontânea;

2.2. Os níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I no hipocampo;

2.3. A correlação entre os níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I com o desempenho dos animais no teste comportamental.

** Os dados obtidos nesse estudo foram publicados na *Behavioural Brain Research*. O artigo encontra-se no anexo 3.*

1. Delineamento Experimental

Foram utilizados dezessete ratos machos com aproximadamente dois meses de idade da raça Sprague-Dawley (Harlan Co., Indianapolis, IN, USA). Inicialmente os animais foram alojados em dupla com ilimitado acesso a água e ração em um biotério com ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais foram então divididos em dois grupos experimentais de acordo com o tratamento: (1) controle (C, n = 8) ou (2) deficiente em tiamina (DT, n = 9). Os animais do grupo DT foram tratados com dieta deficiente em tiamina *ad-libitum* e injeções diárias de piritiamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Entre os dias 14-16 do tratamento, os animais DT mostraram perda do reflexo de endireitamento e convulsões generalizadas. Após 4,25 horas do início das convulsões, os ratos receberam duas injeções de tiamina (100 mg/kg) intercaladas em um período de oito horas. Ratos do grupo controle foram tratados com ração deficiente de tiamina em quantidade equivalente a consumida pelos animais do grupo DT e receberam injeções diárias de tiamina (0,4 mg/kg i.p.). Durante o período de convulsões, todos os animais foram colocados individualmente nas gaiolas. Após o tratamento, os animais receberam ração comercial normal e foram então alojados em dupla.

Após o período de recuperação - aproximadamente um mês- os animais foram submetidos ao teste de alternância espontânea, onde aspectos da aprendizagem espacial e memória foram avaliados. Imediatamente após o teste, os animais foram mortos por decapitação e o cérebro foi separado. O hipocampo foi removido para as determinações das concentrações de sinapsina I e fosfo-sinapsina I (**Fig. 11**). Os procedimentos experimentais adotados neste trabalho estão em concordância com as normas internacionais de uso de animais em laboratório (*National Research Council, 1985*).

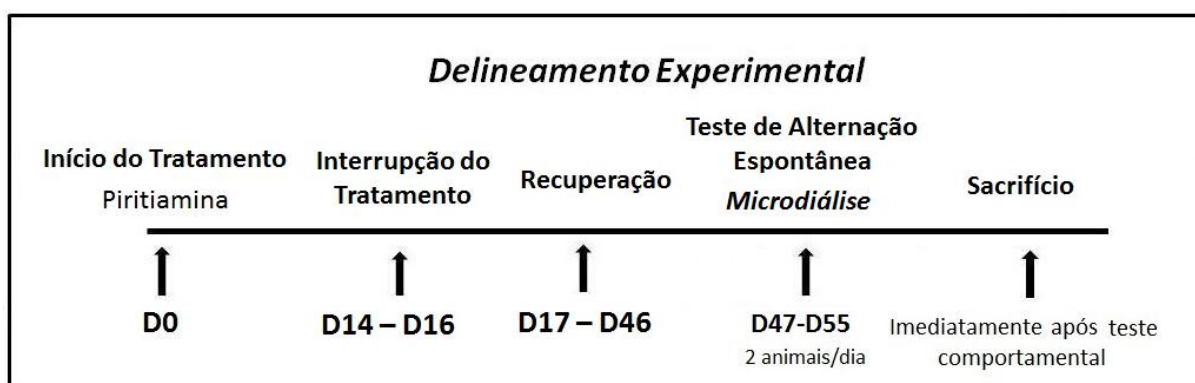


Fig. 11. Esquema do Delineamento Experimental. DO: Dia Zero = primeiro dia do tratamento. Tratamento= episódio de deficiência de tiamina.

2. Estudo Comportamental - Teste de Alternação Espontânea

O teste de alternação espontânea foi realizado no Labirinto em Cruz Elevado conforme descrito por Savage et al. (2003) com algumas modificações. O labirinto consiste de quatro braços de igual distância (55 cm cada), feitos com piso de madeira e paredes laterais de acrílico (12 cm de altura). O equipamento está posicionado 80 cm acima do chão, em uma sala onde há várias dicas (cartazes, portas, mesas) que são utilizadas como referência espacial pelos ratos (**Fig. 12**). Os braços do labirinto foram individualmente nomeados A, B, C e D. Dessa forma, para a realização do teste de alternação espontânea, o animal foi colocado no centro do labirinto e a seqüência de entradas nos braços (Ex: ABCBADC) foi registrada. Posteriormente, foi realizada uma análise dos registros determinando a porcentagem de alternação e o número de braços visitados. Uma alternação foi definida como uma entrada em cada um dos quatro braços durante uma sequencia sucessiva de quatro escolhas. Dessa forma, o número máximo de alternações possíveis seria o total de entradas nos braços menos três (referentes as três primeiras tentativas). O desempenho do animal foi expresso como *percentual de alternações*, calculado através do total de alternações realizadas/máximo de alternações possíveis x 100. Imediatamente após o teste comportamental, o animal foi decapitado e seu cérebro foi removido da caixa craniana. Foi realizado um corte sagital separando os dois hemisférios. O hipocampo de um dos hemisférios foi dissecado e armazenado a -80°C até posterior análise dos níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I

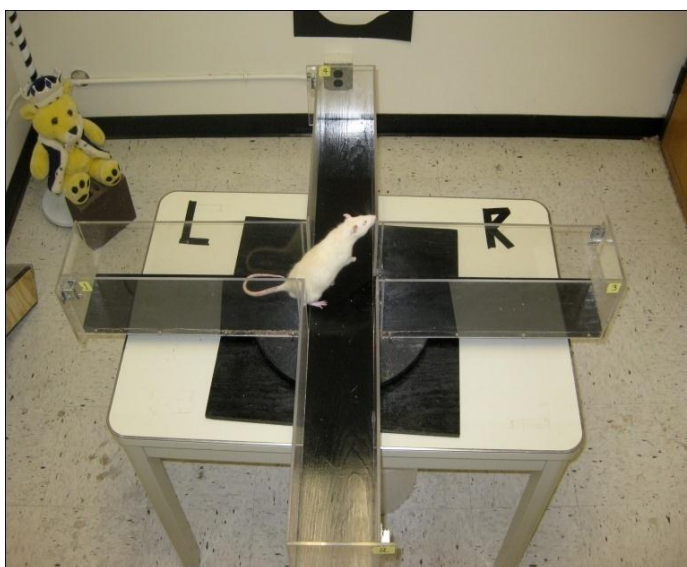


Fig. 12. Foto do Labirinto em Cruz Elevado onde foram realizados os testes de alternação espontânea.

3. Estudo Bioquímico

Para a análise dos níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I no hipocampo, foi utilizada a técnica de *Western blot* como descrito por Werner et al. (2011) com algumas modificações.

Em resumo, os hipocampos foram homogeneizados em tampão de lise (SDS 1%, EDTA 1mM, Tris 10 mM) contendo inibidores de proteases e fosfatases. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada usando o método do ácido bicinconínico (Pierce, Rockford, IL, EUA) e comparada com padrões de albumina de soro bovino. As amostras (25 µg de proteína) foram desnaturadas e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (8-16%) (Life Technologies, Grand Island, NY). Posteriormente, as proteínas de cada gel foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Life Technologies) e bloqueadas durante a noite em tampão TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 150 mM) contendo Tween 0,01% e BSA 1%. Em seguida foram feitas três lavagens com tampão TTBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 150 mM, Tween 0,01%) por 10 minutos cada, e as membranas foram então incubadas durante a noite com anticorpo de fosfo-sinapsina I (diluição 1:250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Após três lavagens (10 minutos cada) com tampão TTBS, as membranas foram expostas ao anticorpo secundário conjugado com peroxidase (diluição 1:15000, anti-cabra HRP, Santa Cruz, CA) durante 1 h. Após novas lavagens, as bandas foram reveladas e os níveis da proteína foram detectados através do método de quimioluminescência (GE Healthcare, Amersham, UK). As membranas foram subsequentemente expostas ao anticorpo de sinapsina I (diluição 1:250, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) e β -actina (diluição 1:500; Millipore, Billerica, MA). A sinapsina I e a fosfo-sinapsina I possuem pesos moleculares diferentes, não ocupando a mesma região do gel. Amostras de cada rato foram analisadas em duplicata e, portanto, para cada rato, o resultado representa a média dos dados obtidos nas duas análises.

4. Análise estatística

A distribuição gaussiana dos dados foi verificada para os resultados comportamentais e bioquímicos. O efeito da DT na porcentagem de alternância e no número total de braços visitados durante tarefa no Labirinto em Cruz Elevado foi verificado utilizando o teste *t de Student*.

Os níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I foram normalizados utilizando a razão entre a intensidade de cada *blot* e a intensidade correspondente de β -actina e, convertido em porcentagem em relação ao grupo controle. Os níveis normalizados de sinapsina I e fosfo-sinapsina I e a taxa de fosforilação de sinapsina I (razões entre os níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I) em animais deficientes de tiamina e controle foram então comparados utilizando o teste *t de Student*. Foram feitas análises de regressão linear entre os dados comportamentais e bioquímicos.

Todos os dados foram analisados através do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 17.0. Diferenças foram consideradas significativas no nível de 5 %.

1. Estudo Comportamental

Como mostrado na **figura 13 (Painel A)**, ratos do grupo deficiente de tiamina (n=9) apresentaram uma redução na porcentagem de alternância quando comparados com animais do grupo controle (n=8) ($t_{(15)} = 2,71$; $p=0,01$). No entanto, não foi verificado efeito da DT no número de braços visitados ($t_{(15)} = 1,49$; $p = 0,15$), ou seja, o nível de atividade dos ratos DT foi o mesmo dos animais controles (**Fig. 13, Painel B**).

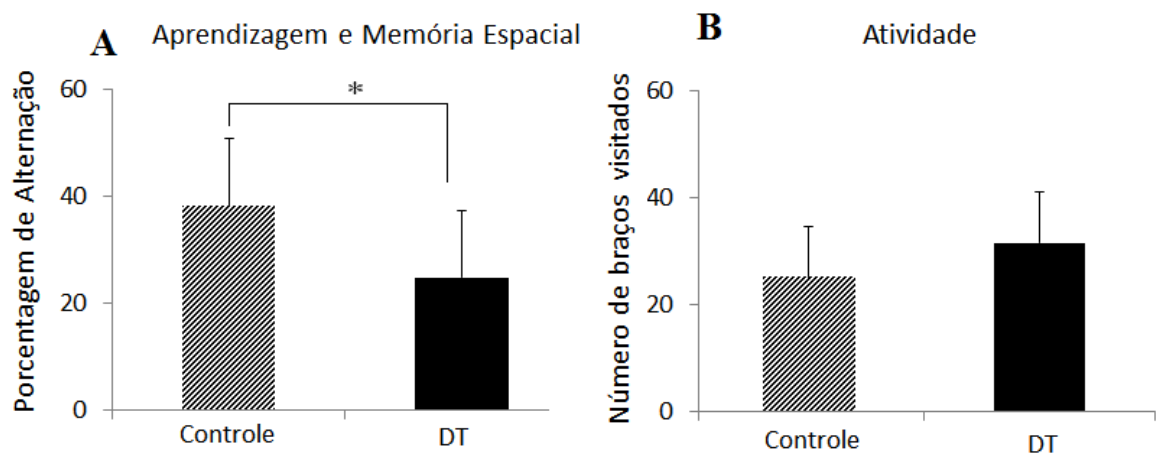


Fig. 13. Dados (média ± DP) do desempenho dos animais no teste de aprendizado e memória espacial avaliados através do comportamento de alternância espontânea no Labirinto em Cruz Elevado A) Porcentagem de alternância espontânea do grupo controle e DT (deficiente em tiamina). B) Nível de atividade dos animais de ambos os grupos representada pelo número de braços visitados. * $p \leq 0.05$.

2. Estudo Bioquímico - Níveis de Sinapsina I e Fosfo-sinapsina I

Foi observada uma redução significativa nos níveis de fosfo-sinapsina I nos animais do grupo DT em comparação com os animais controle ($t_{(15)}=2,20$, $p=0,02$), assim como uma tendência de redução nos níveis de sinapsina I ($t_{(15)}=1,57$, $p=0,06$) (**Figura 14, painéis A e B**). No entanto, os animais DT e controle não diferiram em relação a taxa de fosforilação, que é a razão entre os níveis de sinapsina I por fosfo-sinapsina I ($t_{(15)}= 0,46$, $p = 0,32$) (**Figura 14, painel C**).

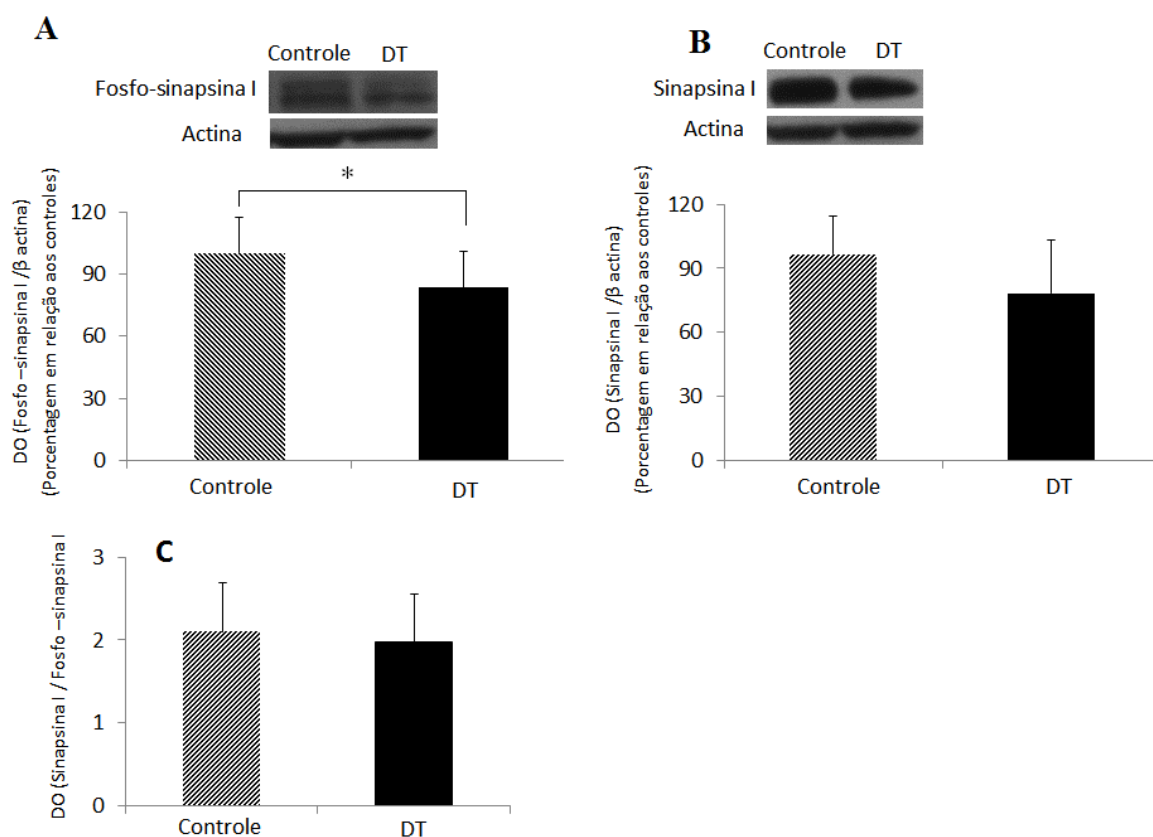


Fig. 14. Níveis relativos (DO= densidade ótica) de fosfo-sinapsina I e sinapsina I no hipocampo de animais controles e animais deficientes de tiamina (DT). Os valores foram expressos como uma razão entre sinapsina I ou fosfo-sinapsina I por β -actina (controle interno) e, em seguida convertidos para porcentagem em relação aos controles. A) Níveis de fosfo-sinapsina I em animais controle e DT. B) Níveis de sinapsina I em animais controle e DT. C) Proporção de sinapsina I para fosfo-sinapsina em animais controle e DT. No topo dos painéis A e B são apresentadas fotos de *blots* representativos de fosfo-sinapsina I e sinapsina I, respectivamente e β -actina para ambos. Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p \leq 0,05$

Análises de regressão entre as porcentagens de alternância espontânea e os níveis de sinapsina I ou fosfo-sinapsina I no hipocampo foram realizadas considerando os animais de ambos os grupos em conjunto ou separados. Foram observadas correlações positivas entre a porcentagem de alternância e concentração média de sinapsina I ($r = + 0,77$; $p=0,02$) (**Fig. 15, painel A**) e fosfo-sinapsina I ($r= + 0,88$; $p=0,007$) (**Fig. 15, painel B**) para animais do grupo controle. No entanto, os dados indicam que a deficiência de tiamina causa uma ruptura dessas relações, uma vez que não foram observadas correlações entre porcentagem de alternância e sinapsina I ($r= - 0,42$; $p=0,25$) ou fosfo-sinapsina I ($r= - 0,31$; $p=0,41$) em animais do grupo DT. A análise de regressão com os dados obtidos dos animais de ambos os grupos não mostrou correlação significativa para sinapsina I ($r=0,44$; $p=0,07$) e nem para fosfo-sinapsina I ($r=0,38$; $p=0,13$).

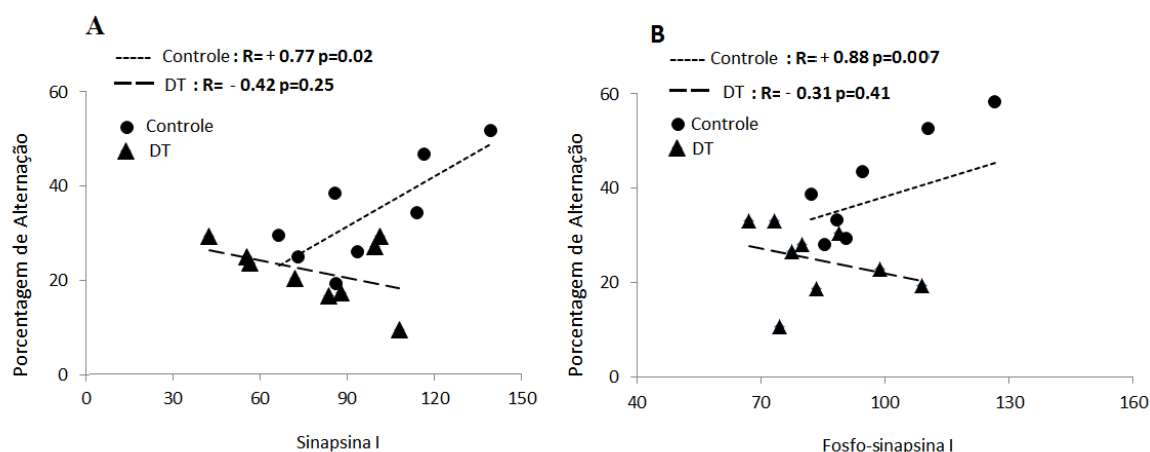


Fig. 15. Gráfico de dispersão dos dados comportamentais e os níveis de sinapsina I (A) e fosfo-sinapsina I (B). DT = deficiência de tiamina.

Após o episódio de DT, roedores apresentam déficits em vários testes de aprendizagem e memória espacial, incluindo alternância espontânea tardia (Mair et al., 1985), *spatial matching to sample (MTS)* (Mair et al., 1991), aquisição da localização da plataforma no LAM (Pires et al., 2005) e alternância espontânea tanto no Labirinto em T elevado (Langlais & Savage, 1995), como no Labirinto em Cruz Elevado (Savage et al., 2003). Os resultados obtidos no presente estudo, além de confirmar dados anteriores mostrando que animais DT apresentam um pior desempenho em tarefa de alternância espontânea, é o primeiro a mostrar que a deficiência dessa vitamina altera os níveis de fosfo-sinapsina I.

Dados de vários estudos mostram alterações nos níveis de sinapsina I (fosforilada e não fosforilada) em estados patológicos. Por exemplo, foi observada redução nos níveis dessa proteína no hipocampo contralateral de ratos após injúria cerebral traumática (Griesbach et al., 2002). Molteni et al. (2002) verificaram que após dois meses em uma dieta rica em gordura saturada e carboidratos, os animais apresentaram redução nos níveis de mRNA e proteína sinapsina I, como também déficits em tarefas de aprendizagem espacial em comparação com controles saudáveis. Em seres humanos, Vawter et al. (2002) mostraram uma diminuição nos níveis totais de sinapsina I em pacientes com esquizofrenia e transtorno bipolar.

A redução nos níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina I em ratos DT pode estar relacionada a redução da expressão de BDNF no hipocampo após tratamento de deficiência de tiamina (Vetreno et al., 2012) uma vez que, o BDNF regula a síntese e fosforilação de sinapsina I. De acordo com Jovanovic et al. (2000) a estimulação da tirosina quinase B através do BDNF causa a ativação de MAP quinases (*Mitogen Activated Protein Kinases*) levando a um aumento da fosforilação de sinapsina I e conseqüentemente a liberação de neurotransmissores. Os resultados obtidos no presente estudo, mostrando que a deficiência de tiamina induz uma alteração nesta via, podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos moleculares de disfunções na neurotransmissão em ratos deficientes de tiamina.

Uma série de estudos têm mostrado alterações funcionais no sistema serotoninérgico (Nakagawasai et al., 2007a), dopaminérgico, noradrenérgico (Nakagawasai et al., 2007b), glutamatérgico (Savage et al., 1999), GABAérgico (Roland & Savage, 2009; Butterworth et al., 1979) e colinérgico (Pires et al., 2005; Savage et al., 2003, Vetreno et al., 2008) em animais deficientes de tiamina. No hipocampo, Savage et al., (2003) mostraram que a liberação de acetilcolina “*in vivo*” durante tarefa de alternância espontânea é

significativamente reduzida em animais DT em relação aos controles. Estudo “*in vitro*” conduzido por Pires et al. (2001) encontrou atividade reduzida da AChE e uma redução na liberação de ACh no hipocampo em meio estimulante. O sistema glutamatérgico no hipocampo também é afetado pela DT. Le et al. (1991) mostraram que a liberação eletricamente estimulada de glutamato em fatias do hipocampo é significativamente menor em animais DT que em animais controle. Uma explicação possível para essas disfunções generalizadas é o fato da via neuroquímica da sinapsina I estar envolvida com múltiplos sistemas de neurotransmissão, uma vez que o sistema de fosforilação da sinapsina I afeta o processo de liberação de vários neurotransmissores.

As alterações em sistemas neurotransmissores em modelos de DT são acompanhadas por déficits em tarefas cognitivas (Savage et al., 2003; Pires et al., 2001; Vigil et al., 2010). Entretanto, os mecanismos moleculares subjacentes a esse processo, ainda não estão bem esclarecidos. Nossos resultados apontam para o envolvimento da sinapsina I em tarefas de aprendizagem e memória espacial. Foi verificada correlação positiva entre níveis hipocampais de sinapsina I (fosforilada e não fosforilada) e alternância espontânea em animais controles. Interessantemente, em animais DT essa correlação é perdida, indicando que a deficiência dessa vitamina rompe essa correlação entre níveis de sinapsina I e comportamento espacial. Além disso, foi observada uma redução em 30% nos níveis de fosfo-sinapsina I em animais DT, sendo este acompanhado por um pior desempenho no teste de memória espacial.

Outras evidências também sugerem que processos neuroquímicos associados à sinapsina I são fundamentais para a aprendizagem espacial. Por exemplo, estudos têm mostrado que a aprendizagem espacial aumenta os níveis de BDNF, seu receptor (TrkB) e sinapsina I no hipocampo (Kushner 2005; Gómez-Pinilla et al., 2001) e que déficits de aprendizagem espacial podem, em parte, serem atribuídos a níveis reduzidos de sinapsina I (Corradi et al., 2008). Estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa mostrou alterações nos níveis de fosforilação de algumas proteínas no hipocampo de ratos após tratamento de recuperação de DT, particularmente a proteína p86 (Pires et al., 2007). Além disso, foi mostrado uma correlação entre o desempenho no LAM com os níveis de fosforilação da proteína p86, sugerindo um papel dessa proteína em processos de aprendizagem e memória. Uma possível candidata para p86 é a sinapsina I.

Em resumo, nossos resultados indicam que a deficiência de tiamina rompe as associações normais entre sinapsina I e fosfo-sinapsina I e aprendizado espacial dependente

do hipocampo. Estes dados corroboram dados obtidos em estudos anteriores, que sugerem o envolvimento de disfunções em sistemas de neurotransmissão no hipocampo nos déficits de aprendizagem e memória espacial presentes em animais DT. Além disto, os resultados aqui apresentados esclarecem sobre componentes dos mecanismos neuroquímicos subjacentes à alterações cognitivas em condições de deficiência de tiamina.

PARTE II

O PAPEL DO GABA, GLUTAMATO E ACETILCOLINA EM ASPECTOS COMPORTAMENTAIS NO MODELO DE DEFICIÊNCIA GRAVE DE TIAMINA

PARTE II – EXPERIMENTO 3

HIPÓTESE: comportamento motor e níveis de GABA e glutamato em regiões do SNC são afetados por um episódio de deficiência grave de tiamina

1. Objetivo Geral

Verificar os efeitos da deficiência grave de tiamina sobre os níveis de GABA e glutamato em diferentes regiões do SNC e o desempenho de ratos em tarefa de atividade motora. Além desses, avaliar a correlação entre parâmetros bioquímicos e aspectos do comportamento motor.

2. Específicos

Em ratos adultos, submetidos ou não à deficiência de tiamina, avaliar:

- 2.1.** A concentração de GABA e glutamato no cerebelo, estriado, hipocampo e córtex pré-frontal;
- 2.2.** O desempenho em tarefas de coordenação e equilíbrio motor;
- 2.3.** A correlação entre os parâmetros bioquímicos e comportamentais

1. Delineamento Experimental

Foram utilizados treze ratos da raça Wistar, com aproximadamente três meses de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O tratamento experimental consistiu em: Grupo Controle (C) - animais tratados com ração padrão e injeções diárias de solução de salina (n= 6) e (ii) Grupo deficiente de tiamina (DT) - animais tratados com ração deficiente em tiamina e injeções diárias de pirritiamina (0,25 mg/ kg, Sigma Chemical Co.) (n= 7). As rações, com e sem tiamina, foram produzidas no próprio Laboratório (LaNeC) (**Anexos 5, 6, 7**). O episódio de DT foi mantido até os animais apresentarem sinais clínicos como convulsões e/ou perda de reflexo de endireitamento (Ciccia & Langlais, 2000). Essas alterações ocorreram por volta do 16º dia após o início do episódio de DT, sendo interrompidas com injeções intraperitoniais de tiamina (1mg/kg de peso). Após o período de recuperação clínica (27 dias) os animais foram submetidos aos testes motores. Um dia após os testes comportamentais os animais foram mortos por decapitação e amostras de regiões do SNC foram coletadas para os ensaios bioquímicos (**Fig. 16**). Todos procedimentos adotados neste estudo foram em concordância com as normas internacionais de uso de animais em laboratório (*National Research Council, 1985*).

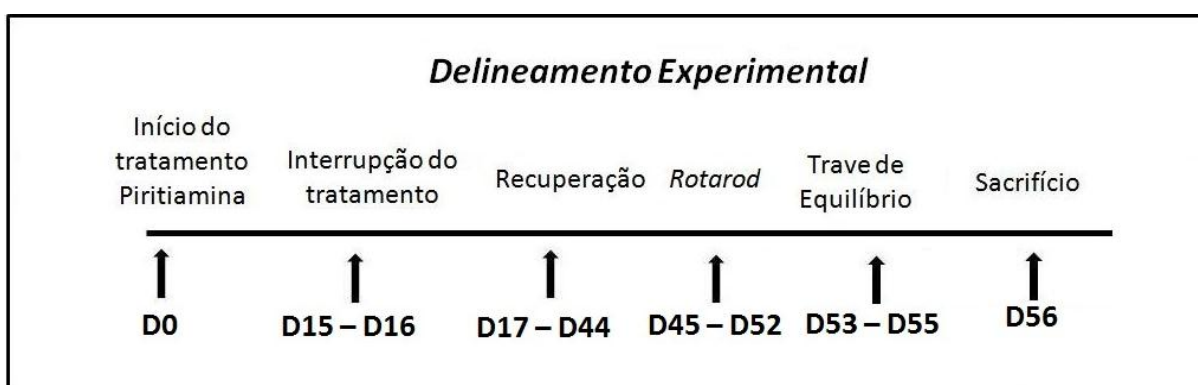


Fig. 16. Esquema do Delineamento Experimental. DO: Dia Zero = primeiro dia do tratamento. Tratamento= episódio de deficiência de tiamina.

2. Estudo Comportamental

2.1 Teste do Rotarod

Equipamento

O teste do *rotarod* foi utilizado para avaliar o equilíbrio e a coordenação motora dos ratos (Shi et al., 2007; Simola et al. 2008). O equipamento utilizado (**Fig.17**) no presente estudo é composto por um cilindro giratório de 5cm de diâmetro e 28 cm de comprimento posicionado horizontalmente a 40 cm de uma plataforma e conectado a um motor elétrico que funciona em diferentes velocidades. Durante o treino e o teste, o animal é colocado sobre o cilindro em rotação, em um valor ajustado, devendo manter o corpo em equilíbrio, para não cair, realizando todos os ajustes posturais necessários, através da coordenação dos movimentos de suas quatro patas (Wang et al., 2006).



Fig. 17- Foto do equipamento (*Rotarod*) utilizado para a avaliação do equilíbrio e coordenação motora dos animais.

Avaliação do equilíbrio e coordenação motora

O protocolo utilizado foi adaptado a partir do descrito por Simola et al. (2008) e consistiu de uma etapa de aclimatação, uma de treino e uma de teste. Durante as *sessões de aclimatação*, que foram realizadas por três dias consecutivos, os ratos foram colocados sobre o cilindro giratório com o aparelho desligado (zero rotação por minuto – 0 rpm), durante 5 minutos em

três tentativas/dia, sendo os intervalos inter tentativa de 30 minutos. Posteriormente, foram realizadas as *sessões de treino*, na qual os animais foram treinados durante três dias consecutivos a permanecerem sobre o cilindro giratório a uma velocidade constante de 5 rpm. As sessões de treino constituíram-se de duas tentativas/dia para cada rato, durante 5 minutos e, também com intervalos de 30 minutos entre as tentativas. Durante o treino, se o animal caísse antes do tempo estipulado (5 min), a latência era registrada e o animal reconduzido à barra pelo experimentador. As *sessões de teste* (memória procedural) foram realizadas em dois dias, 24 e 48 horas após o final do último dia de treino. O primeiro dia de teste, realizado 24 horas após o final do treino, consistiu em três tentativas com duração de 5 minutos cada, com velocidade constante de 5 rpm e com intervalos de 30 minutos entre as tentativas. Para o teste realizado 48 horas após o último dia de treino, a velocidade constante do aparelho foi ajustada para 25 rpm e o animal foi submetido à três tentativas com intervalos também de 30 minutos. Quando o animal sofria uma queda, o tempo que o mesmo havia permanecido (latência) sobre o cilindro era registrado. Em todas as tentativas, aclimatação, treino e testes, os animais foram colocados perpendicularmente ao eixo do cilindro com a cabeça voltada em direção oposta ao sentido da rotação.

2.2. Trave de Equilíbrio (Beam Balance)

O teste da trave de equilíbrio foi utilizado para medir o grau de coordenação motora fina e equilíbrio. O aparelho (**Fig. 18**) consiste de uma base de madeira medindo 31,5 cm de comprimento e 1,8 cm de largura, elevada a 80 cm acima do chão por um suporte de madeira. Durante o teste, que foi realizado por três dias consecutivos, cada animal foi colocado individualmente sobre a base durante 60 segundos em uma única tentativa. Uma caixa contendo maravalha foi colocada abaixo do equipamento com o objetivo de amortecer a queda do animal. O tempo de permanência (latência) sobre a base, sem cair, era registrado (Fujimoto et al., 2004; Kharatishvili, et al., 2009).



Fig. 18. Foto do equipamento - *Trave de equilíbrio* - utilizado para a avaliação do equilíbrio e coordenação motora dos animais.

3. Dissecação do cérebro

Após um dia dos testes comportamentais os animais foram mortos por decapitação, o encéfalo foi rapidamente retirado da cavidade craniana e dissecado de acordo com as coordenadas estereotáxicas apresentadas por Paxinos & Watson (1986). O cerebelo foi retirado e o cérebro foi colocado ventralmente sobre uma superfície com indicações de escala milimetrada e tomando-se como ponto zero a parte mais distal da região anterior. Um corte coronal foi feito a 2 mm na região antero-posterior para a retirada do córtex pré-frontal. Posteriormente, foi realizado um corte sagital e cada hemisfério foi cortado em fatias coronais de 1 mm para a remoção do estriado e hipocampo. Todos os procedimentos para a separação das regiões encefálicas foram executados a baixa temperatura, sobre uma *Placa de Petri* invertida e sobreposta em pedaços de gelo.

4. Estudo Bioquímicos

Todos os procedimentos realizados para a dosagem dos neurotransmissores GABA e glutamato foram executados pelo método cromatográfico (HPLC) desenvolvido pelo nosso grupo (Freitas-Silva et al., 2009). As amostras de córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e cerebelo foram pesadas (10 mg de cada estrutura) e homogeneizadas em 15 volumes de solução constituída por metanol e água (85:15 v/v). Em seguida, a suspensão foi centrifugada (Sorvall RC-5B), a 4°C, durante 15 minutos, em uma força centrífuga relativa de 7.800 x g. O sobrenadante obtido foi coletado e mantido no gelo até ser submetido à derivatização, para ensaio do GABA e glutamato. O objetivo da derivatização é aumentar a sensibilidade de detecção e a seletividade da separação cromatográfica. A reação de derivatização foi feita misturando-se 200 µL de amostra (sobrenadante), 40 µL de orto-oftaldeído (OPA) metanólico (5 mg/mL), 150 µL de tampão borato (pH 9,9) e 10 µL de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) conforme descrito por Mengerink et al. (2002). A solução resultante foi agitada e injetada no sistema cromatográfico após 1 minuto, à temperatura ambiente.

O sistema cromatográfico utilizado é um cromatógrafo *Shimadzu* (LC-10AD, *Tokyo*, Japão) com válvula injetora de 200 µL (*Rheodyne* 7725-I, California, USA) e detector fluorescente (FLD - *Shimadzu spectrofluorometric detector* RF-551, *Tokyo*, Japan) acoplado a uma bomba modelo LC-10. A fase móvel isocrática consistiu de uma solução de acetado de sódio 0.05M, tetrahydrofurano e metanol (50:1:49 v/v), pH 4,0. Os comprimentos de onda, de excitação e emissão, utilizados foram de 337 e 454 nm, respectivamente. Uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (150 mm×4,6 mm, ID) e uma pré-coluna (RT 250-4 E. *Merck*, *Darmstadt* E.R., Germany) foram utilizadas nas análises. O integrador (*Shimadzu* C-R7Ae plus) acoplado ao sistema cromatográfico forneceu a área dos picos dos cromatogramas, a partir da intensidade de fluorescência obtida nas análises. Os picos gerados de cada composto podem ser visualizados, no formato digital ou impresso, e constituem o perfil cromatográfico de uma determinada amostra. Na **figura 19** encontra-se ilustrado o perfil cromatográfico de uma amostra obtida do hipocampo de rato do grupo controle. O tempo médio de eluição do glutamato e do GABA foi de aproximadamente 3.5 e 7.7 minutos, respectivamente. Com a utilização de uma curva padrão, onde concentrações conhecidas dos compostos de interesse são aplicadas no sistema, análises quantitativas podem ser obtidas a partir do programa associado ao integrador. O resultado é expresso em concentrações de

GABA ou glutamato ($\mu\text{g/g}$ de tecido) calculadas através da área dos picos de cada um desses dois componentes, relacionada à respectiva curva padrão.

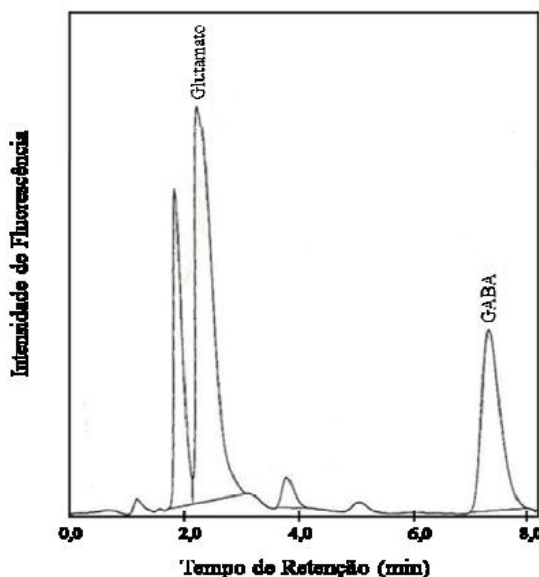


Fig. 19. Cromatograma representativo da sequencia e perfil dos picos de Glutamato e GABA em amostras obtidas no hipocampo de animais do grupo controle.

5. Análises Estatísticas

Os resultados do **treino** no *rotarod* foram analisados usando as médias \pm erro padrão das duas tentativas por sessão (*dados paramétricos*). Foi utilizado o teste ANOVA 2x3, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: tratamento (dois níveis: deficiência de tiamina e controle) e desempenho nas três sessões de treino (= três dias de treino).

Os resultados do **teste** no *rotarod* foram avaliados utilizando a média das três tentativas em cada sessão (5rpm e 25 rpm) e expressos em média \pm desvio padrão (*dados paramétricos*). O efeito da deficiência de tiamina sobre o desempenho dos animais no **teste** foi analisado utilizando ANOVA 2 x 2, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: tratamento (dois níveis: deficiência de tiamina e controle) e desempenho nas 2 sessões de treino (5 rpm e 25 rpm). Os resultados do teste na trave de equilíbrio (*beam balance*) foram comparados utilizando o teste *Mann Whitney*, já que estes apresentaram distribuição não-

paramétrica, com $p < 0,05$ no teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e expressos como mediana das três tentativas \pm desvio interquartilico.

Os efeitos do tratamento sobre os níveis de glutamato e GABA foram avaliados pelo Teste *t* de *Student* bicaudal. Diferenças foram consideradas significativas no nível de 5 %. Todos os dados foram analisados através do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 17.0.

1. Estudo Comportamental

1.1. Rotarod

TREINO: O Teste ANOVA 2x3 com medidas repetidas no último elemento mostrou efeito da sessão sobre o desempenho dos animais ($F_{(2,22)}=4,67$; $p=0,02$). No entanto, não foi verificado efeito da deficiência de tiamina no desempenho dos animais ao longo do treino ($F_{(1,11)}=0,09$; $p=0,770$). Também não foi verificado interação entre sessão e deficiência de tiamina ($F_{(1,11)}=1,6$; $p=0,22$) (**Fig. 20, painel A**).

TESTE: O teste ANOVA 2x2 com medidas repetidas no último elemento mostrou efeito significativo da sessão sobre o desempenho dos animais no teste (memória) ($F_{(1,1)}=84,54$; $p=0,00$), ou seja, o desempenho dos animais na sessão 5rpm foi significativamente diferente do desempenho dos animais na sessão 25 rpm. Não foi verificado efeito da deficiência de tiamina em relação ao desempenho dos animais, avaliados através do tempo de permanência (latência) sobre a barra do *rotarod* na velocidade constante de 5 rpm e 25 rpm ($F_{(1,12)}=0,004$; $p=0,83$). Não houve interação significativa entre deficiência de tiamina e sessão ($F_{(1,1)} = 0,002$; $p=0,96$) (**Fig. 20, painel B**).

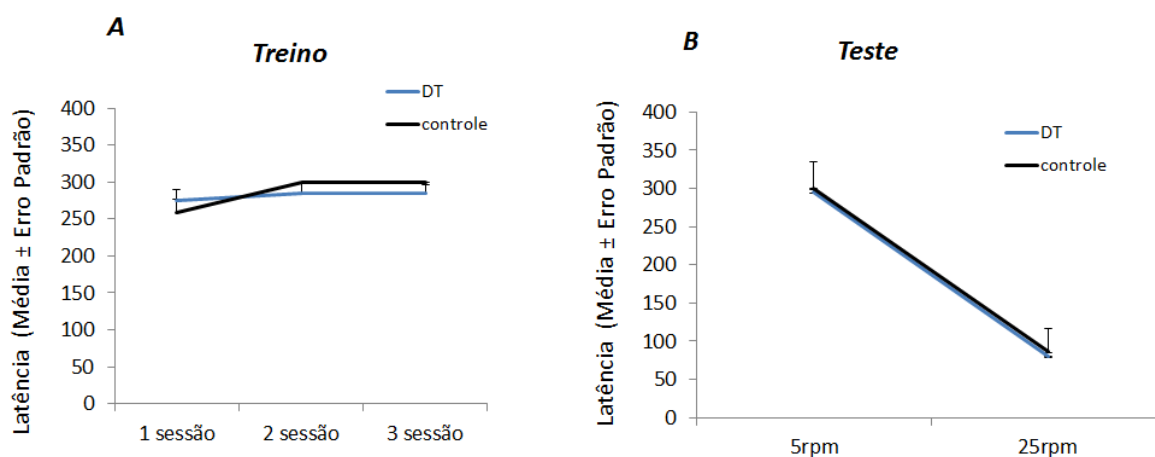


Fig. 20. Dados do desempenho no treino (**painel A**) e no teste do *rotarod* (**painel B**) dos animais deficientes de tiamina (linha azul) e controles (linha preta). Média das tentativas \pm erro padrão, do tempo (segundos) de permanência (latência) sobre a barra giratória do *rotarod*.

1.2. Trave de equilíbrio (*Beam balance*)

Não foi verificada diferença significativa em relação à latência na barra da trave de equilíbrio entre o grupo controle e o grupo deficiente de tiamina. ($U=15,00$; $p=0,44$) (**Fig. 21**).

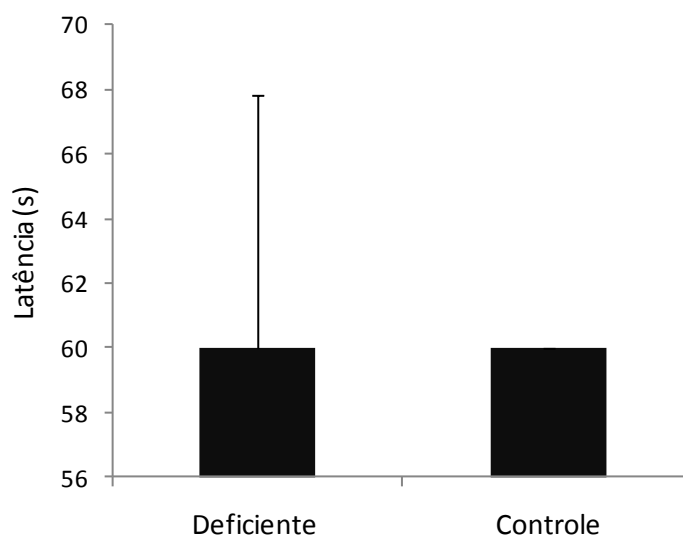


Fig. 21. Desempenho dos animais deficientes de tiamina e controles no teste da Trave de Equilíbrio. Os dados representam mediana \pm desvio interquartil do tempo (segundos) de permanência sobre a barra do equipamento.

3. Estudo Bioquímico

A **figura 22** (painéis A e B) mostra os níveis de glutamato e GABA nas regiões do córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e cerebelo dos animais dos grupos controle e deficiente de tiamina. O Teste t bicaudal mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina na concentração de glutamato no cerebelo ($t = 2,49$; $p = 0,02$). Não foi verificado efeito da deficiência de tiamina nas concentrações de glutamato no córtex pré-frontal ($t = - 0,25$; $p = 0,80$), estriado ($t = - 0,72$; $p = 0,48$) e hipocampo ($t = 1,86$; $p= 0,08$). A deficiência de tiamina afetou significativamente a concentração de GABA no hipocampo ($t=3,16$; $p=0,009$) e cerebelo ($t = 2,74$; $p=0,01$). Não foi verificada diferença significativa nas concentrações de GABA no córtex pré-frontal ($t = 0,84$; $p = 0,41$) e estriado ($t = 13,00$; $p = 0,25$).

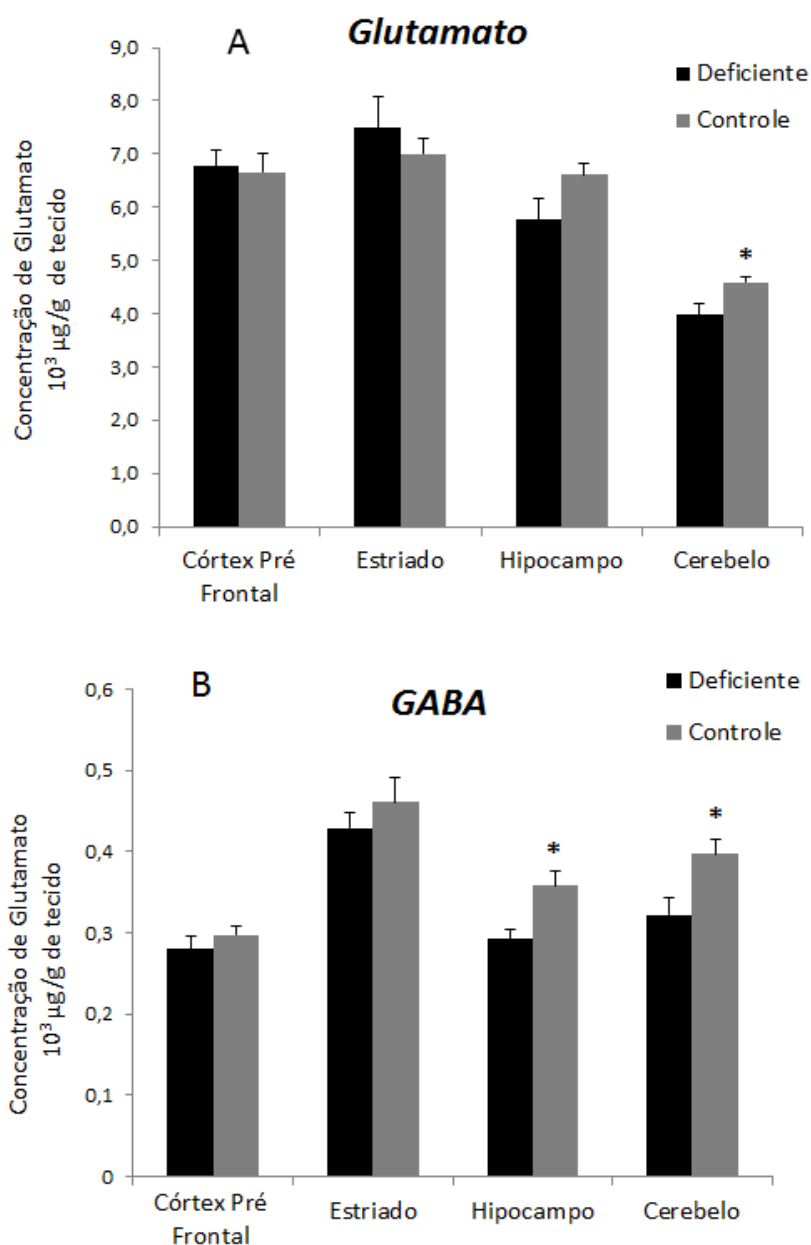


Fig. 22. Concentrações em $10^3 \mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (Painel A) e GABA (Painel B) no córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e cerebelo dos animais dos grupos deficiente de tiamina (barras pretas) e controles (barras cinzas). * $p \leq 0.05$.

Não foram observadas correlações entre os dados bioquímicos e comportamentais quando os animais de ambos os grupos foram analisados em conjunto ou separadamente ($p \leq 0.05$).

Os dados obtidos neste estudo indicam que a DT em ratos adultos não altera o comportamento motor avaliado em testes no *rotarod* e na trave de equilíbrio. Esses dados não eram esperados uma vez que diferentes autores (Butterworth, 2003; Martin et al., 2003; Lalonde & Strazielle, 2007), têm mostrado que importantes estruturas encefálicas envolvidas na modulação e integração das respostas motoras são seletivamente comprometidas pela DT. Além disto, os resultados aqui obtidos mostraram alterações nas concentrações de GABA e glutamato no cerebelo, região com importante papel na atividade motora.

Uma hipótese que poderia ser levantada para explicar os achados mencionados acima é que as disfunções e/ou lesões observadas nessas estruturas envolvidas com o comportamento motor, causadas pela DT, depois de um período de recuperação poderiam ser compensadas por ajustes na atividade de circuitos neuroquímicos que compensariam e reverteriam os efeitos causados pela DT. Nesse contexto pode-se supor papéis modulatórios para o GABA e o Glutamato. Os animais deficientes de tiamina, apesar de não apresentarem déficit motor, apresentaram alteração significativa nos níveis de glutamato e GABA no cerebelo, ou seja, após o insulto, poderia ocorrer um re-equilíbrio da rede através de alterações denominadas “neuroplasticidade” onde os circuitos modulatórios se ajustam de tal forma a re-estabelecer o funcionamento de outros circuitos básicos. Assim, nos animais DT, os sistemas GABAérgico e glutamatérgico teriam, ao longo do tempo, se ajustado e, devido a isso, suas concentrações seriam diferentes quando comparadas aos respectivos animais controles. Essas alterações aconteceriam ao longo do tempo em benefício dos animais, que ao receberem um insulto “deslocariam” o sistema de forma a reverter o prejuízo que então não se manifestaria posteriormente. Essa lógica estaria de acordo com a teoria darwiniana na qual déficits comportamentais devem ser sanados para assegurar a sobrevivência.

Importante mencionar que, em estudo prévio, observamos que um episódio de restrição maternal de tiamina - durante a lactação - afeta aspectos motores da prole, sendo esses efeitos detectados nos animais da prole na fase adulta (Ferreira-Vieira, 2009). Uma possível explicação seria que, diferentemente dos episódios na fase adulta, uma deficiência durante períodos críticos da formação do SNC, como o perinatal, poderiam deixar sequelas irreversíveis no cérebro.

Outros dados obtidos pelo nosso grupo (Pereira-Caixeta, 2011) também parecem contraditórios quando comparados com os achados do presente estudo. Observamos que quando a DT é induzida apenas através da administração de uma ração deficiente, sem o uso

de pirritiamina e, portanto, a cinética do processo neurodegenerativo é muito mais lenta – aproximadamente 60 dias para aparecimento dos sinais neurológicos – o desempenho motor dos animais no *rotarod* é afetado. Levantamos a hipótese que, por se tratar de um efeito crônico mais prolongado, aproximadamente dois meses, esse poderia afetar de forma diferencial o sistema nervoso/muscular, podendo até mesmo interagir com o processo de envelhecimento, deixando sequelas não observadas quando a deficiência é induzida na presença de pirritiamina, onde os sinais neurológicos aparecem com aproximadamente 15 dias. Dois meses para o rato é um período relativamente grande de vida. Importante considerar que a sequência de sinais clínicos observados quando a deficiência é induzida por pirritiamina associada a uma dieta deficiente de tiamina é exatamente a mesma daquela observada quando a deficiência é apenas na dieta. O que difere é a cinética do processo. Portanto, a hipótese seria que uma cinética diferente poderia implicar em efeitos diferentes no sistema periférico – p.ex. sistema muscular - através de ajustes metabólicos crônicos, com consequente comprometimento funcional. Estudos mais detalhados, com delineamento experimental e objetivos adequados, devem ser executados com a finalidade de entender melhor esses resultados.

Apesar da tarefa no *rotarod* ser relativamente simples, reprodutível e amplamente utilizada, apenas um grupo de pesquisadores, até o presente momento, utilizou esse teste para a avaliação de parâmetros motores em ratos adultos deficientes de tiamina. Nesse estudo, Shi et al., (2007) observaram uma redução de 32% no desempenho dos animais após oito dias de DT. Essa redução foi aumentada para 82% e 97% nos dias nove e dez respectivamente. Segundo os autores, a DT não induz grande morte neuronal até o décimo dia da deficiência (-90%), então, os déficits motores observados podem ser atribuídos a outros fatores relacionados à deficiência dessa vitamina. O fato desses autores terem feito a avaliação dos parâmetros motores durante o episódio de deficiência impossibilita a comparação com os resultados aqui apresentados, uma vez que no presente estudo, as avaliações foram feitas após o período de recuperação. Deve-se considerar que, os efeitos da DT, descritos por esses autores, sobre o desempenho motor de animais avaliados durante o episódio podem ser devido a uma baixa de ATP nas células musculares, resultado de disfunções no metabolismo de carboidratos. Portanto, no presente trabalho, o objetivo foi investigar os efeitos crônicos da deficiência sobre os SNC e, suas repercussões sobre aspectos comportamentais. Ou seja, verificar as sequelas neurológicas e comportamentais após um período de recuperação do

episódio de DT. Desta forma, estaríamos nos assegurando que os efeitos eventualmente detectados não seriam devido a um déficit energético agudo.

A redução da atividade espontânea, hipotonia e atrofia dos músculos, perda de pêlo e redução de peso foram descritos repetidamente em ratos com DT (Kark et al.; 1975; Juntunen et al., 1979; Gibson et al., 1982; Hakim & Pappius, 1983). Em condições experimentais, sinais de polineuropatia como a falta de reflexos de estiramento, perda de massa muscular e de força, paresia dos pés podem ser provocadas devido a uma dieta deficiente em B1. No entanto, segundo Farmer (1981) as polineuropatias podem se desenvolver durante a deficiência crônica de tiamina, ou seja, após 3 meses de deficiência. No homem, tais sintomas são observados após 110 dias de deficiência.

Mesmo considerando as hipóteses mencionadas acima, outros fatores devem ser ponderados antes de se tirar conclusões definitivas sobre a não observação de efeitos da DT em aspectos do comportamento motor. Por exemplo, a variabilidade da amostra: o teste no *rotarod* foi realizado com 13 animais, sendo seis controles e sete deficientes de tiamina. As análises dos dados brutos mostraram grande variabilidade entre os animais DT, por exemplo, a latência de um dos animais DT foi de aproximadamente 274 segundos na velocidade de 25rpm, enquanto a latência apresentada por outro animal do mesmo grupo foi de 7,5 segundos. Os dados relativos à latência na trave de equilíbrio também apresentaram grande variabilidade no grupo DT, o que pode ser visto pelo valor relativamente alto do erro padrão apresentado no gráfico do desempenho dos animais nessa tarefa.

Estudos em humanos sugerem que nem todas as pessoas são igualmente sensíveis à DT e suas consequências. Por exemplo, embora a DT possa ocorrer em até 80% dos alcoólicos (Tallaksen et al 1992), apenas cerca de 13% desenvolvem a EW (Harper et al 1988). Isto significa que as consequências graves da DT desenvolvem apenas em um subgrupo de pessoas que consomem álcool e têm uma alimentação inadequada. Uma possível explicação para estas diferenças na susceptibilidade individual é que algumas pessoas são geneticamente predispostas a desenvolver danos cerebrais após ter experimentado episódios repetidos de DT associado ou não ao consumo de álcool (Martin et al., 2003). Com a finalidade de esclarecer melhor essa questão, futuros estudos devem ser realizados utilizando amostras contendo um número maior de indivíduos. Outra alternativa, que não descarta a primeira, é proceder análises morfométricas em regiões específicas do SNC relacionadas com funções motoras; usar critérios para classificação da gravidade das lesões e redistribuir os animais em sub-

grupos de acordo com esse critério. Nesse caso as análises estatísticas seriam realizadas comparando com os animais controles, os animais dos subgrupos deficientes em tiamina com lesões leve, moderada e grave.

Os resultados das avaliações bioquímicas obtidas no presente estudo mostram efeito da DT nos níveis de GABA e glutamato no cerebelo e de GABA no hipocampo. Pode-se argumentar que as medidas das concentrações total de GABA e Glutamato nos tecidos cerebrais podem ser inadequadas para avaliar seus papéis na atividade neurotransmissora, uma vez que esses aminoácidos se localizam em diferentes regiões da célula nervosa e podem ter outras funções. Nesse caso, em vez de mudanças na atividade de neurotransmissão sináptica, as mudanças relatadas poderiam ser consequências de distúrbios nos níveis de glicose e de enzimas que sintetizam e metabolizam o GABA e o glutamato nas diferentes regiões em que estão presentes. Se esse fosse o caso, a alteração observada deveria ocorrer em todas as regiões do encéfalo avaliadas. No entanto, é importante mencionar que os efeitos da DT sobre as concentrações desses dois neurotransmissores foram em regiões cerebrais específicas. Por exemplo, das quatro regiões avaliadas, em apenas duas foram observadas alterações, indicando uma alta probabilidade de efeito, direto ou indireto, específico sobre sistema neuroquímico. No entanto, experimentos devem ser realizados para avaliar os efeitos da DT sobre a liberação desses neurotransmissores e/ou demais parâmetros, como atividade de receptores.

Dessa forma, os dados aqui apresentados indicam que a tiamina e/ou seus derivados parecem desempenhar um papel específico na manutenção dos níveis de GABA e glutamato em algumas regiões do SNC. Como esse efeito é região-específica, parece ser diferente da ação relacionada ao papel dessa vitamina como co-enzima no metabolismo energético.

PARTE II – EXPERIMENTO 4

HIPÓTESE: um episódio de deficiência grave de tiamina altera a liberação de acetilcolina, GABA e glutamato durante aprendizado espacial.

1. Objetivo Geral

Verificar os efeitos da deficiência grave de tiamina na liberação “*in vivo*” de glutamato, GABA e acetilcolina no hipocampo e o desempenho de ratos durante tarefa de alternância espontânea. Além disso, avaliar a correlação entre os parâmetros bioquímicos e aspectos do comportamento.

2. Específicos

Em ratos adultos, submetidos ou não à deficiência grave de tiamina, avaliar:

2.1. Aspectos cognitivos em tarefa de alternância espontânea;

2.2. A liberação de glutamato, GABA e acetilcolina “*in vivo*” no hipocampo durante tarefa de alternância espontânea;

2.3. A correlação entre os parâmetros bioquímicos;

2.4. A correlação entre os parâmetros bioquímicos e comportamentais.

1. Delineameto Experimental

Foram utilizados dezesseis ratos machos com aproximadamente dois meses de idade da raça Sprague-Dawley (Harlan Co., Indianapolis, IN, USA). Inicialmente os animais foram alojados em dupla com ilimitado acesso a água e ração em um biotério com ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais foram então divididos em dois grupos experimentais de acordo com o tratamento: (1) controle (C, n = 8) ou (2) deficiente em tiamina (DT, n = 8). Os animais do grupo DT foram tratados com dieta deficiente em tiamina *ad-libitum* e injeções diárias de piritiamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Entre os dias 14-16 do tratamento, os animais DT apresentaram perda do reflexo de endireitamento e convulsões generalizadas. Após 4,25 horas do início das convulsões, os ratos receberam duas injeções de tiamina (100 mg/kg) intercaladas por um período de oito horas. Ratos do grupo controle foram tratados com ração DT em quantidade equivalente a consumida pelos animais do grupo DT e receberam injeções diárias de tiamina (0.4 mg/kg i.p.). Durante o período de convulsões, todos os animais foram colocados individualmente nas gaiolas. Após o tratamento, os animais receberam ração comercial normal e foram então alojados em dupla. Após o período de recuperação (aproximadamente um mês), todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação da cânula guia que mais tarde alojou a sonda de microdiálise. Cinco dias após a cirurgia, os animais foram manuseados (5min/dia) durante cinco dias consecutivos, sendo então submetidos ao teste de alternância espontânea no Labirinto em Cruz Elevado. A coleta de amostras para os ensaios bioquímicos foi realizada através de microdiálise antes, durante e após o teste comportamental (**Fig. 23**). Os procedimentos experimentais adotados neste trabalho estão em concordância com as normas internacionais de uso de animais em laboratório (*National Research Council, 1985*)

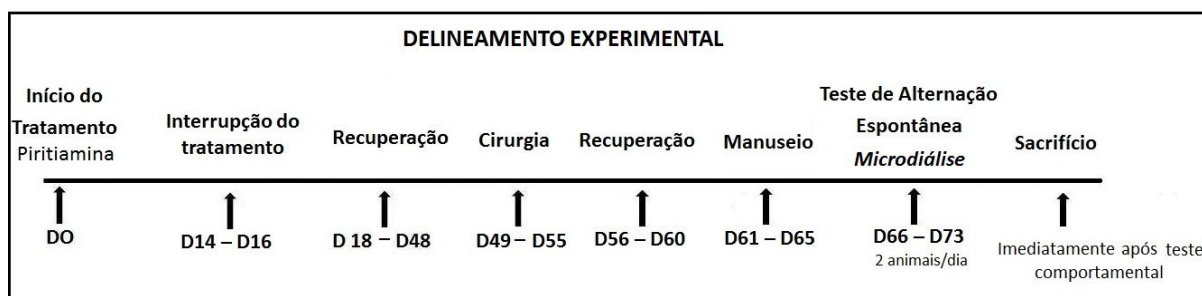


Fig. 23. Esquema do Delineamento Experimental. DO: Dia Zero = primeiro dia do tratamento. Tratamento= episódio de deficiência de tiamina.

2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (0,1 mL/kg) da mistura de Ketamina (83,0 mg/Kg) e Xilazina (17,0 mg/Kg) (Vetreno et al., 2008). Uma cânula guia (CMA/12,3mm, Carnegie Medicine Associates, Chelmsford, MA) foi implantada no hipocampo esquerdo de cada animal de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986). Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam uma dose de Buprenorfina (0,3 mg/kg) e Gentamicina (0,2 mg/kg) e foram colocados em uma incubadora até que a postura ereta fosse recuperada. Conforme mencionado acima, após serem manuseados (5min/dia) por cinco dias consecutivos após a cirurgia, os animais foram então submetidos ao teste comportamental no Labirinto em Cruz Elevado

3. Teste Comportamental e Microdiálise

O teste de alternância espontânea no Labirinto em Cruz Elevado e a microdiálise foram realizados conforme descrito por Savage et al. (2003) com algumas modificações. No dia do teste comportamental, a sonda de microdiálise (CMA/12,3 mm) foi inserida na cânula guia do hipocampo e o animal foi colocado em uma gaiola (41 cm x 30 cm x 35 cm) localizada na sala de teste. As sondas foram perfundidas continuamente com fluido cérebro espinhal (em mM: NaCl 127,6, KCl 4,0, CaCl₂ 1,3, MgCl₂ 0,9, NaH₂PO₄ 0,9, Na₂HPO₄ 2,0, e glucose 1,0; pH = 7.4) a um fluxo de 2µl/min. Após 60 minutos de estabilização, foi coletada uma amostra de diálise durante 18 minutos (volume da amostra: 36 µL). Essa amostra foi utilizada para determinar os níveis basais de acetilcolina, GABA e glutamato (Linha de Base – Pré-teste comportamental). Posteriormente, o animal foi colocado no centro do labirinto, permitindo-se que o mesmo pudesse explorar o local por 18 minutos. O teste de alternância espontânea no Labirinto em Cruz Elevado foi feito conforme descrito na sessão de Material e Métodos do Experimento 2. Durante o teste comportamental também foi coletado uma amostra de diálise (volume da amostra: 36 µL) que foi utilizada para determinar os níveis de acetilcolina, GABA e glutamato liberados durante a execução da tarefa espacial (treino). Após o teste no labirinto, o rato foi transferido para a gaiola onde foi coletada uma amostra (volume da amostra: 36 µL) durante 18 minutos (Linha de base – Pós-teste comportamental).

Dos 36 µl coletados durante cada fase, 10 µl foram utilizados para dosagem de acetilcolina e 26 µl foram utilizados para a dosagem dos aminoácidos, GABA e glutamato, conforme descrito abaixo.

4. Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

4.1. Dosagem de acetilcolina

A dosagem de acetilcolina nas amostras coletadas por microdiálise (*in vivo*), foi feita segundo Chang et al. (2006). Resumidamente, a concentração de ACh em cada amostra de diálise foi determinada por HPLC com um detector eletroquímico (Bioanalytical Systems, Inc.). O sistema de análise incluiu uma coluna analítica microbore de permuta iônica (BAS), um reator microbore ACh/Colina, enzimático imobilizado contendo AChE e colina oxidase (*immobilized enzyme reactor*, BAS), um eletrodo de carbono eletroquímico (BAS), uma válvula de baixa dispersão com capacidade de 10 µl (Rheodyne modelo 9125–087) e uma bomba Shimadzu LC-10ADvp. A fase móvel consistiu de 50 mM de Na₂HPO₄ (pH 8,5). O fluxo programado foi de 140 µL/min e o volume de injeção de cada amostra foi 5,0 µL. O tempo médio de eluição da acetilcolina foi de aproximadamente oito minutos. O limite de detecção desse sistema é de ≤ 5 femtomoles (fmol). Os resultados foram espessos em femtomoles e convertidos em porcentagem em relação ao Pré-teste (linha de base).

4.2. Dosagem de GABA e Glutamato

Todos os procedimentos realizados para a dosagem dos neurotransmissores glutamato, e GABA foram executados através da técnica de HPLC. O método utilizado, descrito por Donzanti & Yamamoto (1988) e Rowley et al. (1995) emprega a detecção eletroquímica dos derivados dos aminoácidos formados por uma reação química com o orto-oftaldeído e β-mercaptoetanol (OPA- metanólico). O sistema inclui um autoinjeter da marca ESA (Modelo 542; Chelmsford, MA, EUA), um amortecedor de pulsos (ESA), e uma coluna Xterra MSC18 (3.0× 50 mm, 2,5 µm). A reação de derivatização foi feita misturando-se 26 µL de amostra com 15 µL de OPA- metanólico (5mg/mL) preparado diariamente. Vinte microlitros (20 µL) da solução resultante foram injetados no sistema cromatográfico para análise da concentração dos aminoácidos. A fase móvel consistiu de uma solução de 100 mM de fosfato de sódio (dibásico, anidro) com 20% por volume de metanol e 3,5% por volume de acetonitrila. A fase móvel foi filtrada em membrana de nylon com espessura de 0,2 µm (Nylaflo; Pall Life Sciences) e o pH foi ajustado para 6,75 com ácido orto-fosfórico ou hidróxido de sódio. Uma célula guarda (ESA5020) foi posicionada antes do autoinjeter e ajustada em um potencial de 700 mV para oxidação da fase móvel e estabilidade da linha de base. Uma célula analítica de detecção (ESA, modelo 5014B; primeiro eletrodo = 150 mV, segundo eletrodo = 400 mV) foi

posicionada após a saída da coluna, sendo controlada por um detector eletroquímico coulométrico (ESA, Cuolochem III) com três eletrodos. Os picos gerados pelo segundo eletrodo através da eluição dos derivados dos aminoácidos foram analisados pelo programa EZChrom Elite (Scientific Software Inc, modelo SS420x), sendo convertidos em ng de aminoácidos utilizando uma curva padrão. Os resultados foram convertidos em porcentagem em relação ao Pré-teste (linha de base).

5. Histologia

Imediatamente após o teste comportamental, o animal foi decapitado e seu cérebro foi removido da caixa craniana. Foi realizado um corte sagital separando os dois hemisférios. O hemisfério com o hipocampo canulado foi fixado em uma solução de formol 10% por no mínimo 72 horas e então transferido para uma solução de 30% de sucrose. O hemisfério foi fatiado a partir da comissura anterior até o tegmento pontino posterior em fatias de 60µm utilizando um micrótomo modelo Sm2000r (Lecia Instruments, Alemanha). As fatias foram coradas com cristal de violeta para a avaliação do posicionamento da cânula no hipocampo. Somente animais cujas cânulas estavam no interior do hipocampo foram incluídos nas análises.

6. Análises estatísticas

A distribuição gaussiana dos dados foi verificada para os dados comportamentais, dessa forma, o efeito da DT na porcentagem de alternância como também no número total de entradas nos braços durante tarefa no Labirinto em Cruz Elevado foi avaliado utilizando o teste *t de Student*.

O efeito da deficiência de tiamina na liberação basal de glutamato (em ng) e acetilcolina (fmol) durante o Pré-teste (linha de base) foi avaliado utilizando o teste *t de Student* (**dados paramétricos**). O efeito da deficiência de tiamina na liberação basal de GABA (em ng) durante período Pré-teste (linha de base) foi avaliado utilizando o teste de *Mann-whitney* (**dados não paramétricos**).

Para estudar o efeito da deficiência de tiamina e das fases (Pré-teste, teste, Pós-teste), os valores em ng (GABA e glutamato) e fmol (acetilcolina) foram convertidos em porcentagem média em relação ao Pré-teste (linha de base), sendo então utilizado o teste

ANOVA 2X3 com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: tratamento= 2 níveis: deficiência de tiamina e controle, fase = 3 níveis. Foram feitas análises de regressão linear para avaliar as relações entre os dados comportamentais e bioquímicos. Diferenças foram consideradas significativas no nível de 5 % ($p < 0,05$). Os resultados foram analisados através do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 17.0.

1. Estudo Comportamental

Como mostrado na **figura 24** (Painel A), ratos deficientes de tiamina (n=8) mostraram uma redução na porcentagem de alternância, quando comparados com animais do grupo controle (n=8) ($t_{(14)}=4,70$; $p=0,00$). No entanto, não foi verificada diferença significativa entre o número de braços visitados pelos animais quando se compara os dois grupos ($t_{(14)}=0,31$ ($t_{(14)}=0,31$; $p = 0,75$), ou seja, o nível de atividade dos ratos DT foi o mesmo que os animais controle (**Fig. 24**, Painel B).

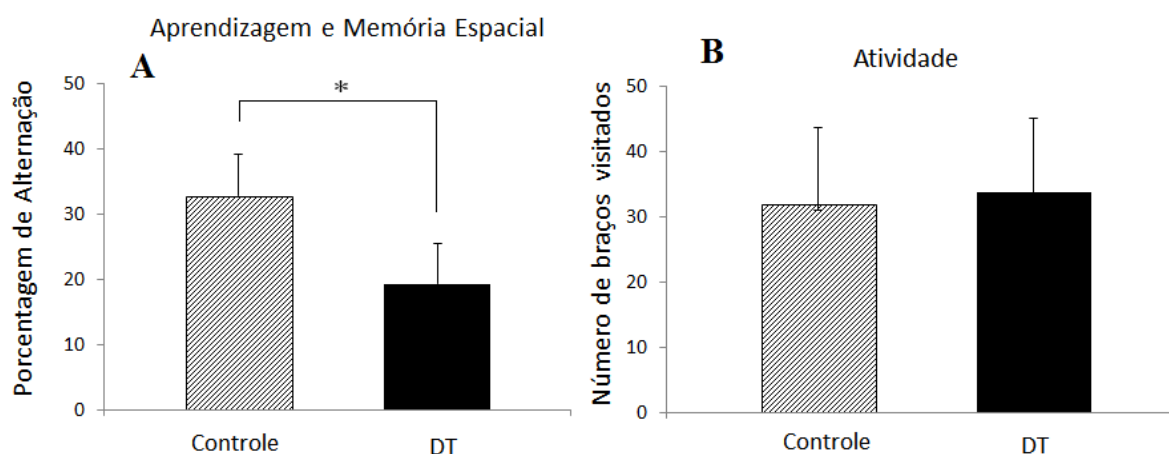


Fig. 24. Resultado do teste comportamental (média \pm DP) realizado no Labirinto em Cruz Elevado. A) Aprendizagem espacial expressa como porcentagem de alternância espontânea do grupo controle e DT (deficiente em tiamina). B) Nível de atividade dos animais de ambos os grupos representada pelo número de braços visitados. * = $p \leq 0.05$.

2. Estudo Bioquímico

2.1. Liberação de glutamato

Não foi observado efeito da deficiência de tiamina nos níveis basais (liberação espontânea) de glutamato no hipocampo (nanogramas) durante o período que os animais estavam na gaiola (Pré-teste) ($t_{(13)} = 1,10$; $p = 0,28$). Comparando as três fases (Pré-teste, teste, Pós-teste) e os dois grupos (Controle x DT), ANOVA com medidas repetidas no último elemento mostrou efeito do tratamento ($F_{[1,14]} = 5,46$, $p = 0,03$) e interação entre tratamento e fase ($F_{[1,2]} = 4,50$, $p = 0,02$) (**Fig. 25**).

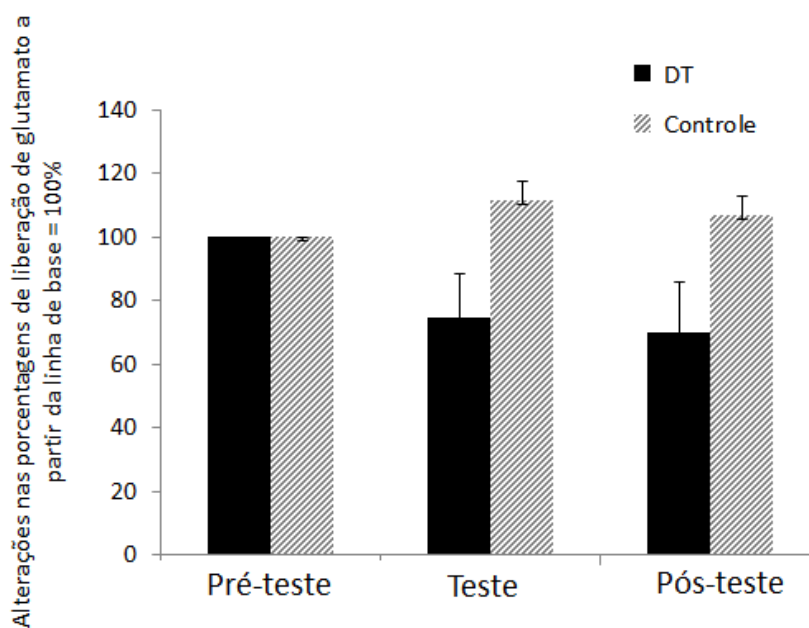


Fig. 25. Níveis de glutamato liberado [porcentagem média em relação a linha de base (Pré-teste) \pm EP] no hipocampo de ratos controles e DT (deficientes de tiamina) durante os períodos Pré-teste, teste e Pós-teste.

2.2. Liberação de GABA

Não foi observado efeito da deficiência de tiamina nos níveis basais (liberação espontânea) de GABA no hipocampo (nanogramas) durante o período que os animais estavam na gaiola (Pré-teste) ($U=20,00$; $p=0,56$). Comparando as três fases (Pré-teste, teste, Pós-teste) e os dois grupos (Controle x DT) ANOVA com medidas repetidas no último elemento não mostrou efeito do tratamento ($F_{[1,13]} = 0,009$, $p=0,92$) e também não houve efeito da interação entre tratamento e fase ($F_{[1,2]} = 0,12$, $p=0,88$) (**Fig. 26**).

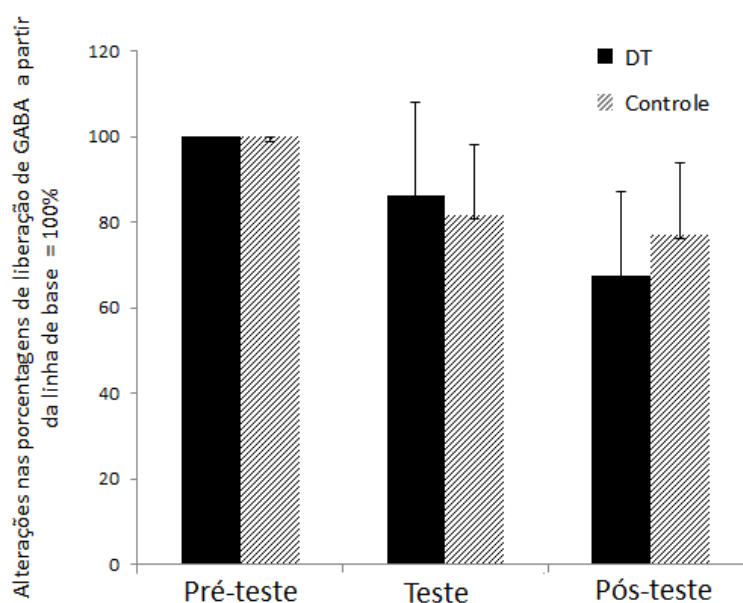


Fig. 26. Níveis de GABA liberado [porcentagem média em relação à linha de base (Pré-teste) \pm EP] no hipocampo de ratos controles e DT (deficientes de tiamina) durante Pré-teste, teste, Pós-teste.

2.3 Liberação de acetilcolina

Não foi observado efeito da deficiência de tiamina nos níveis basais (liberação espontânea) de acetilcolina no hipocampo (fentomoles) durante o período que os animais estavam na gaiola (Pré-teste) ($t_{(14)}=1,00$; $p = 0,33$). Comparando as três fases (Pré-teste, teste, Pós-teste) e os dois grupos (Controle x DT), ANOVA com medidas repetidas no último elemento mostrou efeito do tratamento ($F_{[1,14]} = 8,76$, $p=0,01$) e também efeito da interação entre tratamento e fase ($F_{[1,2]}= 5,98$, $p < 0,00$) (**Fig. 27**).

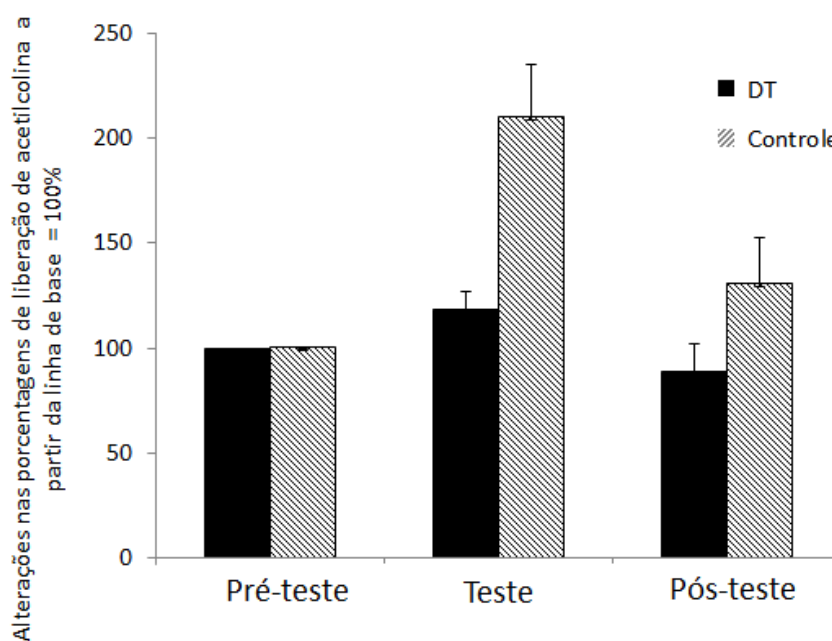


Fig. 27. Níveis de acetilcolina liberada [porcentagem média em relação a linha de base (Pré-teste) \pm EP] no hipocampo de ratos controles e DT (deficientes de tiamina) durante os períodos Pré-teste, teste e Pós-teste.

3. Correlações entre os parâmetros bioquímicos e comportamentais

Os resultados das análises de regressão estão apresentados na Tabela 1. Não foram observadas correlações entre a liberação de glutamato durante teste comportamental e a porcentagem de alternância espontânea, quando os dados dos animais dos dois grupos foram utilizados em conjunto para a análise ($r = 0,29$, $p = 0,27$, $n=16$) ou separados: controle ($r = 0,27$, $p = 0,50$, $n=8$), deficiente de tiamina ($r = 0,29$, $p = 0,47$, $n=8$). Também não foram observadas correlações entre a liberação de GABA e o desempenho dos animais dos dois grupos ($r = 0,15$, $p = 0,59$, $n=16$) ou separados: controle ($r = 0,01$, $p = 0,97$, $n=8$), deficiente de tiamina ($r = 0,51$, $p = 0,19$, $n=8$). Foi verificada correlação entre os níveis de acetilcolina e porcentagem de alternância espontânea ($r = 0,55$, $p = 0,02$, $n=16$) (**Fig 28**). No entanto, quando os grupos foram avaliados separadamente, não foi observada correlação entre essas variáveis para animais controle ($r = 0,28$, $p = 0,49$, $n=8$) e nem para os deficientes de tiamina ($r = 0,28$, $p = 0,49$, $n=8$). Foi verificada uma tendência de correlação entre a liberação de glutamato e acetilcolina durante a execução do teste comportamental quando os dados dos animais dos dois grupos foram utilizados na análise ($r = 0,45$, $p = 0,07$, $n=16$), mas essa correlação foi perdida quando os grupos foram analisados separados: controle ($r = 0,30$, $p=0,46$, $n=8$), deficiente de tiamina ($r = 0,10$, $p=0,80$, $n=8$). Não foi verificada correlação entre a liberação de acetilcolina e GABA quando os dados de todos os animais foram utilizados na análise ($r= 0,08$, $p=0,75$, $n=16$) ou separados: controle ($r= 0,30$, $p=0,51$, $n=8$), deficiente de tiamina ($r= 0,03$, $p=0,92$, $n=8$). Também não foram observadas correlações entre a liberação de glutamato e GABA quando os dados dos animais dos dois grupos foram utilizados na análise ($r=0,14$, $p= 0,60$, $n=16$) ou separados: controle ($r=0,06$, $p= 0,88$, $n=8$), deficiente de tiamina ($r=0,16$, $p=0,69$, $n=8$).

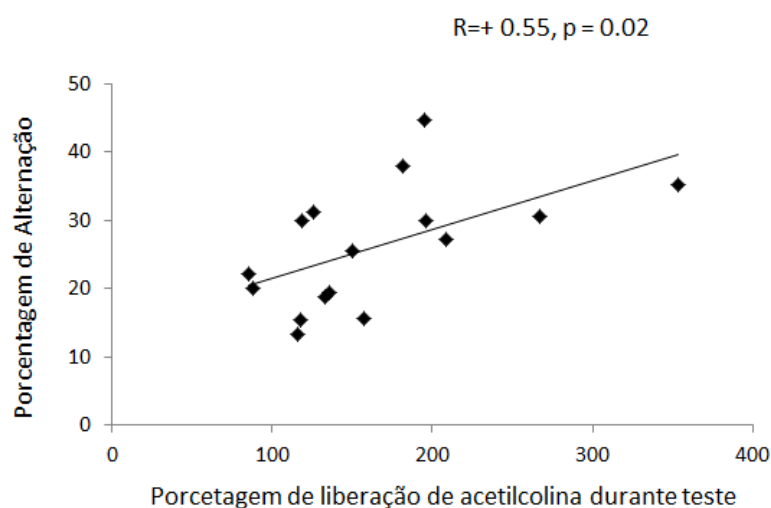


Fig. 28. Gráfico de Dispersão mostrando a correlação entre o desempenho dos animais no teste de alternância espontânea, expresso como porcentagem de alternância e liberação de acetilcolina (porcentagem em relação a linha de base – Pré-teste).

<i>Grupo</i> <i>Variáveis</i>	<i>DT + Controle</i> <i>(n=16)</i>	<i>DT</i> <i>(n=8)</i>	<i>Controle</i> <i>(n=8)</i>
% Alternação x Glutamato	r = 0.29, p = 0.27	r = 0.29, p = 0.47	r = 0.27, p = 0.50
% Alternação x GABA	r = 0.15, p = 0.59	r = 0.51, p = 0.19	r = 0.01, p = 0.97
% Alternação x Acetilcolina	r = 0.55, p = 0.02*	r = 0.16, p = 0.69	r = 0.28, p = 0.49
Acetilcolina x Glutamato	r = 0.45, p = 0.07*	r = 0.10, p=0.80	r = 0.30, p=0.46
Acetilcolina x GABA	r= 0.08, p=0.75	r= 0.03, p= 0.92	r= 0.30, p=0.51
Glutamato x GABA	r=0.14, p= 0.60	r=0.16, p=0.69	r=0.06, p= 0.88

Tabela 1: Resultado das análises de regressão entre as variáveis bioquímicas e comportamentais. Os dados dos grupos deficiente de tiamina e controle foram analisados separadamente ou em conjunto: dados dos animais DT (n=8) ou dados dos animais Controle (n=8) ou DT + controle (n=16).

DT=deficiência de tiamina. *p ≤0.05.

Nossos resultados confirmam estudos anteriores mostrando que ratos após episódio de DT apresentam déficits em tarefa de aprendizagem e memória espacial, incluindo alternância espontânea (Langlais & Savage, 1995; Savage et al., 2003).

A liberação espontânea de glutamato, GABA e acetilcolina no hipocampo durante o pré-teste (linha de base) não diferiu significativamente entre animais controles e deficientes de tiamina, indicando que, em situações onde não há uma demanda cognitiva, os níveis desses neurotransmissores não se alteraram em função da DT. Esses dados são corroborados por estudos anteriores, nos quais foram observadas alterações nos níveis fisiológicos (não estimulado) de GABA e glutamato no tálamo, mas não em outras regiões após período de recuperação da DT (Thompson & McGeer, 1985; Heroux & Butterworth, 1988; Langlais et al., 1988). Da mesma forma, no experimento 3, não foi observado efeito da DT nas concentrações hipocampais de glutamato em tecido analisado *post-mortem*. Em relação a acetilcolina, têm-se mostrado que os níveis basais (não estimulado) desse neurotransmissor no hipocampo não difere em função da DT (Savage et al., 2003; Roland et al., 2008; Anzalone et al., 2010). A alteração nos sistemas glutamatérgico e colinérgico no hipocampo em animais deficientes de tiamina, comparada aos animais controles, é significativa quando condições ambientais – atividade cognitiva espacial- requerem estimulação hipocampal.

Nossos resultados mostraram efeito da deficiência de tiamina na liberação de glutamato ao longo das fases. Animais controle apresentaram em média, um aumento de 10% na liberação desse neurotransmissor durante teste comportamental em relação ao pré-teste (linha de base), enquanto animais deficientes de tiamina apresentaram uma redução média de 25%. Durante teste comportamental, a diferença de liberação de glutamato entre os grupos foi em média de 35%. Dados similares foram observados por Zhang et al. (1991) que mostraram uma diferença de 25 à 35% na liberação de glutamato no hipocampo de ratos idosos em relação a ratos adultos imediatamente após teste no LAM. Le et al. (1991) observaram que a liberação de glutamato eletricamente estimulada em fatias do hipocampo é significativamente menor em animais DT que em controles.

Em relação aos dados de liberação de acetilcolina hipocampal foi observado um aumento desse neurotransmissor durante o teste comportamental, tanto em animais controles quanto deficientes de tiamina. Utilizando também técnicas de microdiálise, vários autores têm mostrado aumento nos níveis de acetilcolina no córtex e hipocampo de ratos após estimulação sensorial (Nilsson et al., 1990; Inglis et al., 1994), na presença de uma novidade ambiental

(Aloisi et al., 1997; Ceccarelli et al., 1999, Inglis et al., 1994; Giovannini et al., 1998) e testes de memória e aprendizagem espacial (Savage et al., 2003). No entanto, nossos resultados mostraram que a liberação de acetilcolina foi maior em animais controles que nos animais DT. Esse dado indica um papel da tiamina na magnitude da resposta a um estímulo cognitivo. Resultados similares foram observados por Savage et al. (2003) que observaram alterações no sistema colinérgico do hipocampo em animais deficientes de tiamina durante teste comportamental. A microdiálise é uma ferramenta útil para investigar a liberação “*in vivo*” de neurotransmissores no cérebro de animais (Young 1993; Westerink 1995; Bradberry, 2000) uma vez que, a concentração do neurotransmissor na amostra de diálise reflete os níveis extracelulares em função não somente da liberação, mas também da inativação e da recaptação do neurotransmissor (Westerink 1995; Westerink & Timmerman 1999). Além disso, técnicas de microdiálise permitem investigar a liberação de um neurotransmissor em função de uma variável, como por exemplo, uma demanda comportamental.

Vários autores têm mostrado o envolvimento dos sistemas glutamatérgico e colinérgico do hipocampo durante tarefa envolvendo aprendizagem e memória espacial. Alguns deles mostraram que a liberação de ACh está elevada em eventos de aprendizagem e memória (Stefani & Gold, 2001; McIntyre et al., 2002; Chang & Gold, 2003) e que o uso de antagonistas muscarínicos (Izquierdo et al., 1992) e nicotínicos (Felix & Levin, 1997) no hipocampo afeta a memória. O sistema glutamatérgico do hipocampo tem sido associado com comportamentos de aprendizagem e memória espacial devido ao papel dos receptores NMDA no potencial de longa duração (LTP). A principal evidência do LTP como um mecanismo de formação de memória surgiu a partir de estudo no qual os autores utilizaram um bloqueador de receptor NMDA no hipocampo e observaram uma redução no LTP e déficits no aprendizado espacial em roedores (Morris et al., 1986). Enquanto receptores glutamatérgicos NMDA parecem estar envolvidos no arquivamento de informações, pouco se sabe sobre os eventos pré-sinápticos nesse processo. Poucos autores reportaram a relação entre liberação de glutamato e desempenho em teste comportamental. Shimizu et al. (1998) observaram que a liberação de glutamato no hipocampo dorsal correlaciona com os déficits espaciais produzidos por benzodiazepínicos e etanol.

A correlação positiva entre a liberação de acetilcolina e porcentagem de alternância espontânea durante tarefa de navegação espacial sugere que os níveis reduzidos de ACh no hipocampo desempenham um papel nos déficits cognitivos presentes em ratos DT. Além

disso, a tendência de correlação entre os níveis de glutamato e acetilcolina durante teste comportamental aponta para uma inter-relação entre esses dois sistemas. As vias glutamatérgicas modulam a atividade colinérgica cortical e hipocampal tanto diretamente: antagonista do receptor NMDA injetado no núcleo basal inibe a liberação espontânea e estimulada de ACh no córtex (Rasmusson et al, 1996) e a administração de antagonistas dos receptores NMDA no septo medial inibe a liberação estimulada de ACh no hipocampo (Moor et al, 1998.); quanto indiretamente, uma vez que vias glutamatérgicas regulam a atividade do sistema Gabaérgico, os quais atuam na modulação de neurônios colinérgicos do septo medial (Giovannini et al., 1994). A ausência de correlação entre a liberação de GABA e glutamato foi inesperada, uma vez que a interação coordenada entre os estímulos excitatórios e inibitórios originados nos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, respectivamente; é fundamental tanto para o desenvolvimento quanto para a manutenção de funções cognitivas complexas como aprendizado e memória (Foster & Kemp, 2006). Uma possível explicação é que essa associação entre os sistemas neurotransmissores seja afetado pela DT. Nesse caso era de se esperar que essa correlação estivesse presente quando se analisou a correlação somente utilizando dados dos animais controles. No entanto, correlação significativa também não foi observada e uma hipótese para explicar esse achado poderia ser o baixo número de indivíduos na amostra.

Apesar de haver poucas evidências de neurodegeneração no hipocampo após episódio de DT (Langlais et al.,1992), nossos dados sugerem alterações funcionais nos sistemas glutamatérgico e colinérgico dessa região, especialmente quando condições ambientais requerem uma demanda cognitiva. Além disso, a correlação entre os níveis de acetilcolina e desempenho em teste de memória e aprendizagem espacial confirma dados da literatura sobre o papel desse sistema em processos cognitivos. A relação entre liberação de glutamato e acetilcolina durante teste corrobora a hipótese de modulação do sistema colinérgico pelo glutamatérgico em tarefas cognitivas. No entanto, não foi observada correlação entre liberação de glutamato e desempenho no teste de alternância espontânea. Como também mencionado acima, não foi observado correlação entre liberação hipocampal de glutamato e GABA durante a execução da tarefa cognitiva espacial. Essas ausências de correlações envolvendo sistemas modulatórios remetem à hipótese de que os efeitos regulatórios exercidos pelos sistemas excitatórios e inibitórios não são efeitos lineares e as interfaces entre múltiplos sistemas podem resultar em uma regulação polimodal não linear. Nesse caso, um

tratamento de dados usando modelos matemáticos mais complexos deve ser posteriormente testado.

1. A tiamina tem um papel na manutenção dos níveis normais de proteínas talâmicas.
2. Disfunções protéicas no tálamo podem estar relacionadas com a amnésia anterógrada presente tanto em modelos animais de deficiência grave de tiamina, quanto em humanos com SWK .
3. A tiamina é importante na manutenção dos níveis normais de sinapsina I e fosfo-sinapsina I no hipocampo,
4. Sinapsina I e fosfo-sinapsina I hipocampal estão envolvidas no mecanismo neurobiológico relacionado com o desempenho de ratos na tarefa de alternância espontânea.
5. Um episódio grave de deficiência de tiamina rompe as associações normais entre níveis hipocampais de sinapsina I e fosfo-sinapsina I e comportamento cognitivo dependente do hipocampo.
6. Aspectos motores, como coordenação e equilíbrio motor, não são afetados pela deficiência grave de tiamina em animais adultos avaliados após um mês de recuperação.
7. A tiamina parece ter um papel específico no SNC não relacionado a sua função como co-enzima no metabolismo energético.
8. O sistema colinérgico e glutamatérgico do hipocampo estão envolvidos no desempenho de ratos durante tarefa de memória espacial.
9. Demandas cognitivas em tarefas de localização espacial envolvem ativações dependentes de tiamina dos sistemas hipocampais glutamatérgico e colinérgico.

Conclusão Final

A tiamina desempenha papel importante em mecanismos moleculares de sistemas neurobiológicos talâmicos e hipocâmpais relacionados com processos de aprendizagem e memória espacial

A deficiência grave de tiamina, induzida por piritiamina em roedores, é um modelo experimental bem estabelecido na literatura e adequado para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de neurodegeneração (Hakim & Pappius, 1983; Vortmeyer & Colmant, 1988; Langlais et al., 1996; Pitkin & Savage, 2001, 2004; Savage et al., 2007). Esse modelo vem sendo utilizado por vários autores (p.ex. Savage et al., 1999; Mair et al., 1991; Langlais et al., 1996), incluindo nosso grupo de pesquisa (Carvalho et al., 2006; Pires et al., 2005, 2007; Vigil et al. 2010) com a finalidade de se estudar disfunções em sistemas neurobiológicos e/ou aspectos comportamentais causadas pela deficiência dessa vitamina. Esse modelo reproduz as lesões cerebrais e os déficits comportamentais encontrados nos indivíduos com a SWK (Witt, 1985; Vetreno et al., 2011) e, considerando as estruturas cerebrais afetadas, representa um importante instrumento para se estudar os substratos neurobiológicos de aspectos específicos do comportamento cognitivo e motor.

Dados provenientes de vários estudos têm mostrado que os ratos deficientes de tiamina e/ou indivíduos com a SWK apresentam déficits de aprendizagem espacial e memória (Dalla Barba et al., 1990; Becker et al., 1990; Langlais & Savage, 1995, Pires et al., 2006;) e também alterações motoras (Kark et al.; 1975; Juntunen et al., 1979; Gibson et al., 1982; Hakim & Pappius, 1983). As disfunções cognitivas são atribuídas a lesões em estruturas da região diencefálica, principalmente o tálamo e os corpos mamilares (Langlais et al., 1992). Apesar de não existirem evidências de neurodegeneração no hipocampo em ratos deficientes de tiamina (Langlais et al. 1992), a comunicação tálamo-hipocampal poderia explicar uma disfunção nessa região, contribuindo para a amnésia presente nesses animais (Savage et al., 2003). O cerebelo e os núcleos da base se projetam para o córtex cerebral por meio do tálamo e participam da atividade motora. Apesar dos vários estudos sobre os efeitos da deficiência de tiamina muitos pontos continuam obscuros, principalmente aqueles relacionados aos mecanismos moleculares relacionados às disfunções cognitivas e motoras.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com dados da literatura sobre o envolvimento do **tálamo** e do **hipocampo** nos déficits cognitivos presentes em animais deficientes de tiamina. As alterações mostradas no **hipocampo** são: (i) redução no conteúdo de GABA (ii) redução na liberação estimulada de glutamato e acetilcolina durante execução de tarefa envolvendo aspectos da aprendizagem e memória espacial (iii) alterações nos níveis de fosfo-sinapsina I e uma tendência a redução nos níveis de sinapsina I. Além disso, foi mostrado (iv) uma correlação entre os níveis hipocampais de sinapsina I/ fosfo-sinapsina I e

desempenho em teste de alternância espontânea (aprendizagem e memória espacial) que é desfeita pela deficiência de tiamina e também uma (v) correlação entre liberação de acetilcolina e desempenho em tarefa de aprendizagem e memória espacial. Resumidamente, os dados mostram disfunções em sistemas neurotransmissores no hipocampo [GABAérgico (Experimento 3) glutamatérgico e colinérgico (Experimento 4)] e alterações nos níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina (Experimento 2), sendo esses fatores relacionados com o desempenho de ratos em tarefa cognitiva. Baseado nesses dados, e nas evidências do envolvimento da via da sinapsina I e fosfo-sinapsina I na liberação de neurotransmissores (Jovanovic et al. 2000), pode-se supor que os processos neuroquímicos afetados pela deficiência de tiamina envolvem a via da sinapsina I, influenciando, dessa forma, a liberação de GABA, glutamato e acetilcolina e conseqüentemente o desempenho em tarefa cognitiva. Dessa forma, uma das perspectivas desse estudo é a avaliação dos níveis de sinapsina I e fosfo-sinapsina-I nas amostras de hipocampo (que estão armazenadas em freezer -80C) provenientes dos animais utilizados no Experimento 4. Além disso, pretende-se, em estudos futuros avaliar os níveis de outras moléculas envolvidas na via da sinapsina I, como o CREB (Elemento ligante responsivo ao AMPc = *cAMP response element-binding*), BDNF e MAP quinases.

No **tálamo** foi mostrado alterações nas concentrações de proteínas em animais deficientes de tiamina, abrindo novas perspectivas para a identificação de componentes moleculares que fazem parte dos mecanismos associados ao desempenho cognitivos dos animais. Mais especificamente o conhecimento dos substratos neurobiológicos da etapa inicial do processo de aprendizagem e memória espacial.

Os dados do presente estudo sugerem que a tiamina está envolvida no aprendizado e memória explícita, no entanto, os resultados do teste do *rotarod* mostraram que essa vitamina parece não interferir em aspectos relacionados ao comportamento motor e memória e aprendizagem procedural. Outros fatores devem ser considerados antes de se levantar conclusões definitivas sobre a ausência desse efeito. Conforme mencionado no Experimento 3, importantes regiões encefálicas envolvidas com aspectos motores são afetadas pela deficiência de tiamina. Além disso, dados sugerem que, quando a deficiência de tiamina é feita somente através da ração (processo neurodegenerativo mais longo), animais apresentam déficits motores detectados através da avaliação em testes no *rotarod*, trave de equilíbrio e impressão de patas (Pereira-Caixeta, 2011). Dessa forma, uma das perspectivas desse estudo é a avaliação

do efeito do protocolo de deficiência (deficiência de tiamina na dieta x deficiência de tiamina na dieta associada à piritiamina) sobre aspectos motores. Além disso, a alta variância dos dados relativos ao desempenho dos animais nos testes motores sugere que o comprometimento das regiões cerebrais difere entre os animais deficientes de tiamina. Assim, um fator importante a ser incluído nos próximos estudos é proceder análises morfométricas em regiões específicas do SNC relacionadas com funções motoras e usar critérios para classificação da gravidade das lesões e redistribuir os animais em sub-grupos de acordo com esse critério.

Concluindo, os dados aqui apresentados além de contribuir para o esclarecimento sobre os componentes dos mecanismos neuroquímicos subjacentes à alterações cognitivas em condições de deficiência de tiamina, também abrem um novo caminho para se entender, em futuros estudos, as bases moleculares do aprendizado espacial.

- Aggleton JP, Sahgal A. The contribution of the anterior thalamic nuclei to anterograde amnesia. *Neuropsychologia*. 1993; 31: 1001–1019.
- Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal – anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci*. 1999; 22: 425-489.
- Alexander-kaufman K, Harper C, Wilce P, Matsumoto I. Cerebellar Vermis Proteome of Chronic Alcoholic Individuals. *Proteome*. 2007; 31(8):1286-1296.
- Alexander-Kaufman K, James G, Sheedy D, Harper C, Matsumoto I. Differential protein expression in the prefrontal white matter of human alcoholics: a proteomics study. *Molecular Psychiatry*. 2006;11(1):56-65.
- Andrade, PR. Níveis de GABA e Glutamato Centrais e Aspectos Cognitivos em Modelo Experimental de Deficiência Grave de Tiamina. *Dissertação de Mestrado*. 2011. Pós-Graduação de Neurociências. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Anzalone S, Vetreno RP, Ramos RL, Savage LM. Cortical cholinergic abnormalities contribute to the amnesic state induced by pyriithiamine-induced thiamine deficiency in the rat. *The European journal of neuroscience*. 2010; 32(5):847-58.
- Arendt T, Allen Y, Marchbanks RM, et al. Cholinergic system and memory in the rat: Cholinergic system and memory in the rat: effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain brain transplants and excitotoxic lesions of cholinergic basal forebrain projection system. *Neuroscience*. 1989; 435-462.
- Arolfo MP, Brioni JD. Diazepam impairs place learning in the Morris water maze. *Behav. Neural. Biol*. 1991; 55: 131-136.
- Bâ A, Seri BV. Functional development of central nervous system in the rat: ontogeny of nociceptive thresholds. *Physiol Behav*. 1993; 54:403–405.
- Bâ A. Metabolic and Structural Role of Thiamine in Nervous Tissues. *Cell Mol Neurobiol*. 2008; 28: 923–931.
- Baker KG, Harding AJ, Halliday GM, et al. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. *Neuroscience*. 1999; 91: 429-438.
- Barco A, Alarcon JM, Kandel ER. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell*. 2002; 108: 689–703.
- Béracochéa D. Interaction between emotion and memory: importance of mammillary body damage in a mouse model of the alcoholic Korsakoff syndrome. *Neural Plasticity*. 2005; 12: 275– 287.
- Beracochea DJ, Durkin TP, Jaffard R. On the Involvement of the Central Cholinergic System in Memory Deficits Induced by Long Term Ethanol Consumption in Mice. *Biochemical Behavior*. 1986; 24:519-524.
- Bikbaev A, Neyman S, Ngomba RT, et al. MGluR5 mediates the interaction between late-LTP, network activity and learning. *PloS one*. 2008; 3(5): e2155.

- Boast C, Bartolomeo AC, Morris H, Moyer JA. 5HT antagonists attenuate MK801-impaired radial arm maze performance in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1999; 71: 259-271.
- Bourtchouladze R, Patterson SL, Kelly MP, et al. Chronically increased G α signaling disrupts associative and spatial learning. *Learning and Memory.* 2006; 13: 745–752.
- Bowden SC. Separating cognitive impairment in neurologically asymptomatic alcoholism from Wernicke-Korsakoff syndrome: is the neuropsychological distinction justified? *Psychological bulletin.* 1990;107(3):355-66.
- Brandão ML. *As Bases Psicofisiológicas do Comportamento.* São Paulo. EPU. 1991.
- Bradberry CW, Barrett-Larimore RL, Jatlow P, Rubino SR. Impact of self-administered cocaine and cocaine cues on extracellular dopamine in mesolimbic and sensorimotor striatum in rhesus monkeys. *J Neurosci.* 2000;20:3874–3883
- Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal – anterior thalamic axis. *Behavioral and Brain Sciences.* 1999; 22:425-489.
- Buccafusco J J. *Methods of behavior analysis in neuroscience.* Washington, DC. CRC Press. 2001.
- Butterworth RF, Giguere JF, Besnard AM. Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy: 1.The pyruvate dehydrogenase complex. *Neurochem Res.* 1985; (10):1417-28.
- Butterworth RF, Giguère JF, Besnard AM. Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy. 2.alpha-Ketoglutarate dehydrogenase. *Neurochemical Research.* 1986; 11: 567-577.
- Butterworth RF, Hamel E, Landreville F, Barbeau A. Amino acid changes in thiamine-deficient encephalopathy: some implications for the pathogenesis of Friedreich's ataxia. *Can J Neurol Sci.* 1979; 6(2): 217-222.
- Butterworth RF. Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutrition Research Reviews.* 2003; 16: 277–283.
- Cadete-Leite A, Andrade JP, Souza N, et al. Effects of chronic alcohol consumption on the cholinergic innervation of the rat hippocampal formation as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry. *Neuroscience,* 1995; 64: 357-374.
- Carvalho FM, Pereira SRC, Pires RGW, et al. Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. *Behavioral Assessment.* 2006; 83:481 - 489.
- Casamenti F, Scali C, Vannuchi MG, et al. Long-term ethanol consumption by rats: effect on acetylcholine release in vivo, choline acetyltransferase activity and behavior. *Neuroscience.* 1993; 56: 465-471.
- Ceccarelli I, Casamenti F, Massafra C, et al. Effects of novelty and pain on behavior and hippocampal extracellular ACh levels in male and female rats. *Brain Res.* 1999; 815: 169-176.

- Chang Q, Gold PE. Switching Memory Systems during Learning: Changes in Patterns of Brain Acetylcholine Release in the Hippocampus and Striatum in Rats. 2003; 23(7):3001-3005.
- Chang Q, Savage LM, Gold PE. Microdialysis measures of functional increases in ACh release in the hippocampus with and without inclusion of acetylcholinesterase inhibitors in the perfusate. *Journal of Neurochemistry*. 2006; 97: 697–706.
- Chapouthier G, Venault P. GABA-A receptor complex and memory processes. *Cur. Top. Med. Chemistry*. 2002; 2(8): 841-851.
- Charness ME. Brain lesions in alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1993; 17:2-11.
- 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. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2000; 24(5):622-34.
- Cohen NJ. Preserved learning capacity in amnesia: evidence for multiple memory systems. In: Squire LR, Schacter DL. (Eds.) *The neuropsychology of memory*. New York, Guilford Press, p. 83-103. 1984.
- Corradi A, Zanardi A, Giacomini C, Onofri F, Valtorta F, Zoli M, et al. Synapsin- I- and synapsin-II-null mice display an increased age-dependent cognitive impairment. *Journal of Cell Science* 2008; 121:3042–5.
- Donzanti BA, Yamamoto BK. An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates. *Life Sci*. 1988; 43:913–922.
- Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharmaceut. Assoc*. 1957; 46: 208-210.
- Dunnett SB, Toniolo G, Fine A, et al. Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis and learning impairments. *Behaviour*. 1985; 16(4): 787-797.
- Farmer WT. Neurologic complications of vitamin and mineral disorders. In: Baker AB, Baker, LH (Eds.). *Clinical neurology*. Philadelphia, Harpercollins College Div. 103-147. 1981
- Felix R, Levin ED. Nicotinic Antagonist Administration into the Ventral Hippocampus and spatial working memory in rats. *Science*. 1997; 81(4):1009-1017.
- Ferreira-Vieira TH. Restrição de tiamina no período perinatal, induz, em animais na idade adulta, déficits motores e alterações em parâmetros centrais GABAérgicos e glutamatérgicos. *Dissertação de Mestrado*. 2009. Pós-Graduação de Neurociências. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Foster AC, Kemp JA. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006; 6: 7-17.
- Freeman GB, Nielsen PE, Gibson GE. Effect of age on behavioral and enzymatic changes during thiamin deficiency. *Neurobiol Aging*. 1987; 8(5):429-434.

- Freitas-Silva DM, Ferraz VP, Ribeiro AM. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *Journal of Neuroscience Methods*. 2009; 177(2): 289-293.
- Frielingsdorf H, Thal LJ, Pizzo DP. The septohippocampal cholinergic system and spatial working memory in the Morris water maze. *Behavioural brain research*. 2006;168(1):37-46.
- Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Biobehavioral Reviews*. 2004;28:365-378.
- Getova DP, Dimitrova DD. Effects of GABAB receptor antagonists CGP63360, CGP76290A and CGP76291A on learning and memory processes in rodents. *C. E. J. Med*. 2007; 2(3): 280-293.
- Gibson G, Barclay L, Blass J. The role of the cholinergic system in thiamin deficiency. *Ann NY Acad Sci*. 1982; 378: 382-40.
- Giguère JF, Butterworth RF. Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine deficiency encephalopathy: 3.Transketolase. *Neurochemical Research*. 1987; (3): 305-310
- Gimenes-Júnior. Busca alimentar, memória espacial e ansiedade em ratos: possível participação do núcleo mamilar medial. Dissertação de Metrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. 2008.
- Giovannini MG, Bartolini L, Kopf SR, et al. Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. *Brain Res*. 1998; 784: 218-227.
- Giovannini MG, Mutolo D, Bianchi L, et al. NMDA receptor antagonists decrease GABA outflow from the septum and increase acetylcholine outflow from the hippocampus: a microdialysis study. *J. Neurosci*. 1994; 14:1358-1365.
- Gómez-Pinilla F, So V, Kessler JP. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Research* 2001;904:13–9.
- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science*. 1993; 259:780–785.
- Griesbach GS, Hovda DA, Molteni R, Gomez-Pinilla F. Alterations in BDNF and synapsin I within the occipital cortex and hippocampus after mild traumatic brain injury in the developing rat: reflections of injury-induced neuroplasticity. *Journal of Neurotrauma* 2002;19:803–14.
- Haas RH. Thiamine and the brain. *Annual Review of Nutrition*. 1988; 8: 483-515.
- Hakim AM, Pappius HM. Sequence of metabolic, clinical and histological events in experimental thiamine deficiency. *Ann. Neurol*. 1983; 13:365-375.
- Hamm HE. The Many Faces of G Protein Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273 (2): 669-672.
- Han ZS, Buhl EH, Lörinczi Z, Somogyi P. A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci*. 1993; 5: 395-410.

- Harper C, Rodriguez M, Gold J, Perdices M. The Wernicke–Korsakoff syndrome in Sydney—a prospective necropsy study. *Medical Journal of Australia*. 1988; 149:718–720.
- Harper C. Thiamine (vitamin B1) deficiency and associated brain damage is still common throughout the world and prevention is simple and safe! *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2006; 13(10):1078-82.
- He X, Sullivan EV, Stankovic RK, et al. Interaction of thiamine deficiency and voluntary alcohol consumption disrupts rat corpus callosum ultrastructure. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32(10):2207-16.
- Hepler DJ, Olton DS, Wenk GL, et al. Lesions in Nucleus Basalis Magnocellularis and Medial Septal Area of Rats Produce Qualitatively Similar Memory Impairments. *Journal of Neuroscience*. 1985; 5(4):866-873.
- Heroux M, Butterworth RF. Reversible alterations of cerebral γ -aminobutyric acid in pyridoxamine-treated rats: implications for the pathogenesis of Wernicke’s encephalopathy. *J Neurochem*. 1988; 51: 1221- 1226.
- Homewood J, Bond NW, Mackenzie A. The Effects of Single and Repeated Episodes of Thiamin Deficiency on Memory in Alcohol-Consuming Rats. *Science*. 1997; 14(1):81-91.
- Hoshi E, Tremblay L, Feger J, et al. The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat. Neurosci*. 2005; 8:1491–1493.
- Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004; 28: 497-505.
- Inglis FM, Day JC, Fibiger HC. Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal. *Neuroscience*. 1994; 62: 1049-1056.
- Irle E, Markowitsch H J. Widespread neuroanatomical damage and learning deficits following chronic alcohol consumption or vitamin-B1 (thiamine) deficiency in rats. *Behavioural Brain Research*. 1983; 9:277–294.
- Izquierdo I, Cunha CDA, Rosat R, et al. Neurotransmitter Receptors Involved in Post-training Memory Processing by the Amygdala, Medial Septum, and Hippocampus of the Rat. *Methods*. 1992; 6:16-26.
- Jansen BCP, Donath WF. On the isolation of antiberiberi vitamin. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet*. 1926; 29:1390-1400.
- Jenkins IH, Brooks DJ, Frackowiak RSJ, Passingham FE. Motor Sequence Tomography Learning: A Study with Positron. *Learning*. 1994; 14: 3775-3790.
- Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, et al. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neuroscience*. 2000; 3:323–9.
- Juntunen J, Teravainen H, Eriksson K. Peripheral neuropathy and myopathy. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 1979; 383:241-252.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Fundamentos da Neurociência e do Comportamento*. Rio de Janeiro. Prentice-Hall do Brasil. 1997

- Kark RAP, Brown WJ, Edgerton VR. Experimental thiamine deficiency. *Arch Neurol* 1975; 32: 818-825.
- Kashem M, Sarker R, Des Etages H, et al. Comparative proteomics in the corpus callosal sub-regions of postmortem human brain. *Neurochemistry international*. 2009; 55(7), 483-90.
- Kesner RP, Crutcher KA, Measom MO. Medial Septal and Nucleus Basalis Magnocellularis Lesions Produce Order Memory Deficits in Rats Which Mimic Symptomatology of Alzheimer's disease. *Neurobiology*. 1986; 7: 287-295.
- Kharatishvili I, Sierra A, Immonen RJ, Gröhn OHJ, Pitkänen A. Quantitative T2 mapping as a potential marker for the initial assessment of the severity of damage after traumatic brain injury in rat. *Experimental neurology*. 2009;217(1):154-64.
- Kolb B, Wishaw, IQ. *Neurociência do comportamento*. São Paulo. Manole. 2002.
- Kopelman MD. Disorders of memory. *Brain*, 2002; 125: 2152-2190.
- Kopelman MD. Rates of forgetting in Alzheimer-type dementia and Korsakoff's syndrome. *Neuropsychologia*. 1985; 23: 623-38.
- Kril JJ, Homewood J. Neuronal changes in the cerebral cortex of the rat following alcohol treatment and thiamine deficiency. *Journal of Neuropathology and Experimental Neuropathology*. 1993; 52:586-593.
- Kushner SA, Elgersma Y, Murphy GG, et al. Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *Journal of Neuroscience* 2005;25:9721-34.
- Lalonde R, Strazielle C. Brain regions and genes affecting postural control. *Progress in Neurobiology*. 2007; 81: 45-60.
- Lalonde R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002; 26:91-104.
- 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, Mair RG, Anderson CD, McEntee WJ. Long-lasting changes during thiamine deficiency-induced lesions and amino acid changes in the rat brain, *Neurochemistry Research*. 1988; 13 (12): 1199-1206.
- Langlais PJ, Mandel RJ, Mair R G. Diencephalic lesions, learning impairments, and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. *Behavioural Brain Research*. 1992; 48: 177-185.
- Langlais PJ, Savage LM. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. *Behavioural Brain Research*. 1995; 68:75-89.
- Lavoie JR, Butterworth RF. Reduced Activities of Thiamine-Dependent Enzymes in Brains of Alcoholics in the Absence of Wernicke's Encephalopathy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1995; 19 (4): 1073-1074.

- Lê O, Hérox M, Butterworth RF. Pyridoxamine-induced thiamine deficiency results in decreased Ca²⁺-dependent release of glutamate from rat hippocampal slices. *Metabolic Brain Disease* 1991; 6:125–32.
- Lonze B, Ginty D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002; 35: 605-623.
- Mair RG, Anderson CD, Langlais PJ, McEntee WJ. Thiamine deficiency depletes cortical norepinephrine and impairs learning processes in the rat. *Brain Res*. 1985; 360: 273-84.
- Mair RG, Knoth RL, Rabchenuk SA, Langlais PJ. Impairment of olfactory, auditory, and spatial serial reversal learning in rats recovered from pyridoxamine-induced thiamine deficiency. *Behavioral neuroscience*. 1991; 105(3):360-74.
- Martin PR, Singleton CK, Hiller–Sturmhöfel S. The Role of Thiamine Deficiency in Alcoholic Brain Disease. *Alcohol Research Health*. 2003; 27 (2):134-142.
- Maruki K, Izaki Y, Hori K, Nomura M, Yamauchi T. Effects of rat ventral and dorsal hippocampus temporal inactivation on delayed alternation task. *Brain Research*. 2001; 895: 273-276.
- McGauch JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000; 21: 208 - 210.
- McGauch JL. Memory-A century of consolidation. *Science*. 2000; 287: 248 251.
- McIntyre CK, Pal SN, Marriott LK, Gold PE. Competition between Memory Systems: Acetylcholine Release in the Hippocampus Correlates Negatively with Good Performance on an Amygdala-Dependent Task. *Memory*. 2002; 22(3):1171-1176.
- McNamara RK, dePape GE, Skelton RW. Differential effects of benzodiazepine receptor agonists on hippocampal long-term potentiation and spatial learning in the Morris water maze. *Brain Res*. 1993; 62: 63-70.
- Mengerink Y, Kutlán D, Tóth F, et al. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthalaldehyde / 3-mercaptopropionic acid and phthalaldehyde / N-acetyl-L-cysteine reagents high-performance liquid chromatography-mass spectrometry study. *J. Chrom*. 2002; 949: 99-124.
- Milner B, Corkin S, Teuber HL. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of H.M. *Neuropsychologia*, v.6, p.215-34, 1968.
- Mishkin M. A memory system in the monkey. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1982; 298: 85-95.
- Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, et al. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 2002; 112:803–14.
- Moor E, Schirm E, Jacso J, Westerink BH. Involvement of medial septal glutamate and GABA receptors in behaviour-induced acetylcholine release in the hippocampus: a dual probe microdialysis study. *Brain Res*. 1998; 789:1-8

- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986; 319, 774–776
- Morris RGM, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE. Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *European Journal of Neuroscience*. 1990; 2(12) 1016 – 1028.
- Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 1981; 12:239-260.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, et al. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1995; 92: 9697-9701.
- Mumby DG, Mana MJ, Pinel JP, David E, Banks K. Pyridoxamine-induced thiamine deficiency impairs object recognition in rats. *Behavioral neuroscience*. 1995; 109(6):1209-14.
- Mussa-Ivaldi FA, Bizzi E. Motor learning through the combination of primitives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000; 355:1755-1769.
- Nagahara AH, McGaugh JL. Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks. *Brain Research*. 1992; 591: 54-61.
- Nakagawasai O, Murata A, Arai A, et al. Enhanced head-twitch response to 5-HT related agonists in thiamine deficient mice. *J. Neural Transm*. 2007a; 114: 1003-1010.
- Nakagawasai O, Tadano T, Hozumi S, et al. Immunohistochemical estimation of brain choline acetyltransferase and somatostatin related to the impairment of avoidance learning induced by thiamine deficiency. *Brain Research Bulletin*. 2000; 52(3):189-96.
- Nakagawasai O, Tadano T, Hozumi S, et al. Involvement of muscarinic receptor on the impairment of avoidance learning in mice fed a thiamine deficient diet. *Biogenic Amines* 2001; 16:199–210.
- Nakagawasai O, Yamadera F, Iwasaki K, Asao T, et al. Preventive effect of kami-untan-to on performance in the forced swimming test in thiamine-deficient mice: Relationship to functions of catecholaminergic neurons. *Behavioural Brain Research*. 2007b; 177(2): 315-321.
- National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Care and Use of Laboratory Animals*. Washington (DC): U.S. Department of Health and Human Services; 1985.
- Nilsson OG, Kalen P, Rosengren E, Bjorklund A. Acetylcholine release in the rat hippocampus as studied by microdialysis is dependent on axonal impulse flow and increases during behavioural activation. *Neuroscience*. 1990; 36: 325-338.
- Nutt DJ, Malizia AL. New insights into the role of the GABA (A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br. J. Psychiatry*. 2001; 179: 390-396.
- Oliveira FA, Galan DT, Ribeiro AM, Cruz JS. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K⁺ channels. *Brain Research*. 2007; 1134: 79-86.

- Olton DS, Becker JT, Handelmann G E. Hippocampus, space and memory. *Behavioral and Brain Sciences*. 1979; 2:313-365.
- Olton DS. Mazes, maps and memory. *American Psychologist*. 1979; 34: 583-596.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol*. 1998; 54: 581-618.
- Paller KA, Acharya A., Richardson A. et al Functional neuroimaging of cortical dysfunction in alcoholic Korsakoff's syndrome. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 1997; 9:277-293.
- Pannunzio P, Hazell AS, Pannunzio M, et al. Thiamine Deficiency Results in Metabolic Acidosis and Energy Failure in Cerebellar Granule Cells: An In Vitro Model for the Study of Cell Death Mechanisms in Wernicke's Encephalopathy. *Journal of Neuroscience Research*. 2000; 292:286 -292.
- Parent MB, Baxter MG. Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learning & memory*. 2004;11(1):9-20.
- Park LCH, Calingasan KU, Zhang H, et al. Metabolic impairment elicits brain cell type-selective changes in oxidative stress and cell death in culture. *J. Neurochemistry*. 2000; 74: 114-124.
- Parks MH, Morgan VL, Pickens DR, et al. Brain MRI activation associated with self-paced finger-tapping in chronic alcohol dependent patients. *Alcohol Clin Exp*. 2003; 27(4): 704-711
- Paulson L, Martin P, Nilsson CL, et al. Comparative proteome analysis of thalamus in MK-801-treated rats. *Proteomics*. 2004; 4: 819-825.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London. Academy Press. 1986.
- Pereira-Caixeta. Deficiência de tiamina e isolamento social afetam aspectos do comportamento motor e níveis centrais de GABA e glutamato. Dissertação de Mestrado. 2011. Pós-Graduação de Neurociências. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Peterson LR, Peterson MJ. Short-term retention of individual verbal items. *Journal of Experimental Psychology*. 1959; 58: 193-198.
- Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Bell RL, et al. Development and resolution of brain lesions caused by pyrithiamine- and dietary-induced thiamine deficiency and alcohol exposure in the alcohol-preferring rat: a longitudinal magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32(5):1159-77.
- Phillips SC. Cerebellar white matter after long-term ethanol consumption in mice. *J Stud Alcohol*. 1990; 51:14-18.
- Pires RGW, Pereira SRC, Carvalho FM, , et al. Correlation between phosphorylation level of a hippocampal 86 kDa protein and extinction of a behaviour in a model of Wernicke – Korsakoff syndrome. *Behavioural Brain Research*. 2007; 180:102-106.
- Pires RGW, Pereira SRC, Oliveira-silva IF, et al. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: A study using a model of Wernicke – Korsakoff Syndrome. *Behavioural Brain Research*. 2005;162:11-21.

- Pires RGW, Pereira SRC, Pittella JEH, et al. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. *Biochemistry*. 2001;70:227-235.
- Pitkin SR, Savage LM. Aging potentiates the acute and chronic neurological symptoms of pyriethiamine-induced thiamine deficiency in the rodent. *Behavioural brain research*. 2001; 119(2):167-77.
- Ramirez DR, Buzzetti RA, Savage, LM. The role of the GABA (A) agonist muscimol on memory performance: reward contingencies determine the nature of the deficit. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2005; 84(3):184-191.
- Rasmusson DD, Szerb JC, Jordan JL. Differential effects of alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid and N-methyl- D-aspartate receptor antagonists applied to the basal forebrain on cortical acetylcholine release and electroencephalogram desynchronization. *Neuroscience*. 1996; 72:419-427.
- Reed LJ, Lasserson D, Marsden P. FDG-PET findings in the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Cortex*. 2003; 39: 1027-45.
- Ribeiro AM, Pereira SRC. Animal models for evaluation of behavioral and molecular neurobiological changes with emphasis os spatial memory and cholinergic system impairments in chronic alcohol abuse. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 1998; 50(2/3): 183-195.
- Roland JJ, Mark K, Vetreno RP, Savage LM. Increasing hippocampal acetylcholine levels enhance behavioral performance in an animal model of diencephalic amnesia. *Brain research*. 2008;1234:116-27.
- Roland JJ, Savage LM. Blocking GABA-A receptors in the medial septum enhances hippocampal acetylcholine release and behavior in a rat model of diencephalic amnesia. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2009; 92(3):480-487.
- Roland JJ, Savage LM. The role of cholinergic and GABAergic medial septal/diagonal band cell populations in the emergence of diencephalic amnesia. *Neuroscience*. 2009;160(1):32-41.
- Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde- sulphite derivatisation. *J. Neurosci. Meth.* 1995; 57: 93-99.
- Sanchez-Perez A, Llansola M, Cauli O, Felipo V. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. *Cerebellum*. 2005; 4(3): 162-70.
- Savage LM, Chang Q, Gold PE. Release During Spontaneous Alternation Testing Diencephalic Damage Decreases Hippocampal Acetylcholine Release During Spontaneous Alternation Testing. *Learning & Memory*. 2003; 10:242-246.
- Savage LM, Hall JM, Vetreno RP. Anterior thalamic lesions alter both hippocampal-dependent behavior and hippocampal acetylcholine release in the rat. *Learning and Memory*. 2011; 18(12): 751-758.

- Savage LM, Pitkin SR, Knitowski KM. Rats exposed to acute pyriethamine-induced thiamine deficiency are more sensitive to the amnesic effects of scopolamine and MK-801: examination of working memory, response selection and reinforcement contingencies. *Behavioral Brain Research*. 1999; 104 (1-2): 13-26.
- Savage LM, Roland J, Klintsova A. Selective septohippocampal - but not forebrain amygdalar - cholinergic dysfunction in diencephalic amnesia. *Brain research*. 2007;1139:210-9.
- Savage, L.M.; Hall, J.M.; Resende, L.S. Translational Rodent Models of Korsakoff Syndrome Reveal the Critical Neuroanatomical Substrates of Memory Dysfunction and Recovery. *Neuropsychology Review*, 2012. DOI 10.1007/s11065-012-9194-1. Disponível online: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528861.
- Shi Q, Karuppagounder SS, Xu H, et al. Responses of the mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex to thiamine deficiency may contribute to regional selective vulnerability. *Neurochemistry International*. 2007;50:921-931.
- Shimizu K, Matsubara K, Uezono T, et al. Reduced Dorsal Hippocampal Glutamate Release significantly correlates with the spatial memory deficits produced by benzodiazepines and ethanol. *Science*. 1998;83(3):701-706.
- Shumway-Cook A, Woollacott MH. *Motor Control: Theory and Practical Applications*. Maryland, Lippincott Williams & Wilkins. 2000.
- Simola N, Bustamante D, Pinna A, et al. Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Exp Brain Res*. 2008; 185: 595–601.
- Sjöquist B, Johnson H A, Neri A, Lindén S. The influence of thiamine deficiency and ethanol on rat brain catecholamines. *Drug and Alcohol Dependence*. 1988; 22(3):187-193.
- Spanis CW, Bianchin MM, Izquierdo I, McGaugh, JL. Excitotoxic basolateral amygdala lesions potentiate the memory impairment effect of muscimol injected into the medial septal area. *Brain Research*. 1999; 816: 329-336.
- Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science*. 1991; 253 (5026): 1380-1386.
- Squire LR. Declarative and nondeclarative memory: Multiple brain systems supporting learning and memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 1992; 99:195-231.
- Stefani MR, Gold PE. Intrahippocampal Infusions of K-ATP Channel Modulators Influence Spontaneous Alternation Performance: Relationships to Acetylcholine Release in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2001; 21(2):609-614.
- Tallaksen CME, Bohmer T, Bell H. Blood and serum thiamin and thiamin phosphate esters concentrations in patients with alcohol dependence syndrome before and after thiamin treatment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1992; 16: 320–325.
- Thompson AD, Pratt O E, Jeyasingham M, Shaw GK. Alcohol and brain damage. *Hum. Toxicol*. 1988; 7:455-463.
- Thompson SG, McGeer EG. GABA-transaminase and glutamic acid decarboxylase changes in the brain of rats treated with pyriethamine. *Neurochemical Research*. 1985; 10:1653-1660.

- Thomson AD, Cook CCH, Guerrini I, Sheedy D, Harper C, Marshall EJ. Wernicke's encephalopathy revisited: translation of the case history section of the original manuscript by Carl Wernicke 'Lehrbuch der Gehirnkrankheiten für Aerzte und Studierende' (1881) with a commentary. *Alcohol and Alcoholism*. 2008;43:174–9.
- Todd KG, Butterworth RF. Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 893:404-411.
- Torvik A. Topographic distribution and severity of brain lesions in Wernicke's encephalopathy. *Clin. Neuropathology*. 1987; 6:25-29.
- Troncoso JC, Johnston MV, Hess KM, et al. Model of Wernicke's Encephalopathy. *Arch. Neurol.* 1981; 38:350–354.
- Tulving E. Episodic and semantic memory. In: Tulving E, Donaldson W (Eds.). *Organization of Memory*. New York: Academic Press. p. 381-402. 1972.
- Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003; 422 (6928): 193-197.
- Vargas CD, Rodrigues EC, Fontana A. Controle Motor. In: Lent R (Eds.). *Neurociência da Mente e do Comportamento*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. p. 203-225. 2008.
- Vawter MP, Thatcher L, Usen N, et al. Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2002; 7:571–8.
- Vetreno RP, Anzalone SJ, Savage LM. Impaired, spared, and enhanced ACh efflux across the hippocampus and striatum in diencephalic amnesia is dependent on task demands. *Neurobiol Learn Memory*. 2008; 90:237-244.
- Vetreno RP, Klintsova A, Savage LM. Stage-dependent alterations of progenitor cell proliferation and neurogenesis in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome. *Brain Research*. 2011;1391:132-46.
- 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 Research*. 2012; 1436:178-92
- Victor M, Adams RD, Collins GH. *The Wernicke–Korsakoff Syndrome and Related Neurological Disorders due to Alcoholism and Malnutrition*. Philadelphia, F. A. Davis Co. 1989.
- Vigil AFB, Oliveira-silva IF, Ferreira LF et al. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behavioural Brain Research*. 2010; 210:140-142.
- Vortmeyer AO, Colmant HJ. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 1988; 414: 61-67.
- Wang XM, Gao X, Zhang X-H, et al. The negative cell cycle regulator, Tob (transducer of ErbB-2), is involved in motor skill learning. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 340(4):1023-7.
- Wardas J, Pietraszek M, Schulze G, Ossowska K, Wolfarth, S. Age-related changes in glutamate receptors: An autoradiographic analysis. *Polish J. Pharmacol.* 1997; 49: 401-10.

- Warner RG. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: Nutrient requirements of laboratory animals. National Academy of Sciences–National Research Council, National Academy of Sciences, Washington (DC), pp. 51–95 Publication 990. 1962
- Werner DF, Kumar S, Criswell HE, et al. PKC γ is required for ethanol-induced increases in GABAA receptor $\alpha 4$ subunit expression in cultured cerebral cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*. 2011;116:554–563.
- Westerink BHC, Timmerman W. Do neurotransmitters sampled by brain microdialysis reflect functional release? *Anal Chim Acta*. 1999;379:263–74.
- Westerink BH. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav. Brain Res*. 1995; 70: 103–24.
- WHO, World Health Organization. Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies; 1999.
- Wildgruber R, Harder A, Obermaier C, et al. Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients Proteomics and 2-DE. *Electrophoresis*. 2000; 21(3): 2610-2616.
- Williams RR, Cline JK. Synthesis of Vitamin B1. *Journal of the American Chemical Society*. 1936. 58:1504-1505.
- Witt ED. Neuroanatomical consequences of thiamine deficiency: a comparative analysis. *Alcohol and Alcoholism*. 1985; 20:201–221.
- Wolpert DM, Kawato M. Multiple paired forward and inverse models for motor control. *Neural Netw*. 1998; 11(7):1317-1329.
- Xavier GF. A modularidade da memória e o sistema nervoso. *Psicologia USP*. 1993; 4: 61-115.
- Yamashita H, Zhang YX, Nakamura S. The effects of thiamin and its phosphate esters on dopamine release in the rat striatum. *Neuroscience Letters*. 1993; 158:229-231.
- Young AMJ. Intracerebral microdialysis in the study of physiology and behaviour. *Rev Neurosci* 1993; 4:373–95
- Zhang WQ, Mundy WR, Thai L, et al. Decreased glutamate release correlates with elevated dynorphin content in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Hippocampus*. 1991; 1: 391–397
- Zhao N, Zhong C, Wang Y, et al. Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. *Neurobiol. Dis*. 2008; 29:176–185.
- Zimitat C, Kril J, Harper C, et al. Progression of neurological disease in thiamine-deficient rats is enhanced by ethanol. *Alcohol*. 1990; 7:493–501.
- Zubaran C, Fernandes JG. Rodnight R. Wernicke-Korsakoff syndrome. *Postgrad. Med. J*. 1997; 73: 27-31.

ANEXOS

ANEXO 1

Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring.

ANEXO 2

Translational Rodent Models of Korsakoff Syndrome Reveal the Critical Neuroanatomical Substrates of Memory Dysfunction and Recovery.

ANEXO 3

Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels

ANEXO 4

Spatial cognitive deficits in animal model of Wernicke Korsakoff Syndrome are related to changes in thalamic protein concentrations

ANEXO 5

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

Anexo 5: Composição da ração produzida no laboratório

*A caseína da ração deficiente em tiamina foi autoclavada, secada e triturada antes do uso para garantir a ausência de vitamina B1 na mesma.

^a Ver anexo 2

^b Ver anexo 3

ANEXO 6

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

Anexo 6: Composição da mistura de sais

ANEXO 7

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

Anexo 7: Composição da mistura de vitaminas.

* A ração deficiente em tiamina foi produzida sem a adição de Tiamina-HCl. A constituição dos dois tipos de rações - padrão e deficiente - foi a mesma, exceto com relação à presença ou não de tiamina