



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

KELLY RAYANNE GONDIM SILVA

**SUPLEMENTAÇÃO COM PIRIDOXINA E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL EM
RATOS ALBINOS WISTAR: análise comportamental e eletrofisiológica**

Recife

2019

KELLY RAYANNE GONDIM SILVA

**SUPLEMENTAÇÃO COM PIRIDOXINA E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL EM
RATOS ALBINOS WISTAR: análise comportamental e eletrofisiológica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientador: Profº. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Recife

2019

Catálogo na Fonte Bibliotecária: Mônica
Uchôa, CRB4-1010

S586s Silva, Kelly Rayanne Gondim.

Suplementação com piridoxina e desenvolvimento cerebral em ratos albinos wistar: análise comportamental e eletrofisiológica / Kelly Rayanne Gondim Silva.– 2019.

61 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Depressão cortical alastrante. 2. Piridoxina. 3. Suplementos nutricionais. 4. Comportamento animal. 5. Crescimento e desenvolvimento. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2019-064)

KELLY RAYANNE GONDIM SILVA

**SUPLEMENTAÇÃO COM PIRIDOXINA E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL EM
RATOS ALBINOS WISTAR: análise comportamental e eletrofisiológica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. José Antônio dos Santos
UFPE- Centro Acadêmico de Vitória (CAV)

Drª. Denise Sandrelly Cavalcanti de Lima
Universidade Federal de Pernambuco-HC

Drª. Rosângela Figueiredo Mendes da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a **Deus** meu amor maior, e a **Virgem Maria** que sempre guiou meus passos durante toda essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A ti meu Deus sou grata por me segurar pela Tua destra até aqui, ainda que eu tenha muito mais do que eu preciso, e por me abençoares muito mais do que eu mereço. Quando tudo parecia impossível Tua voz sempre me encorajou a prosseguir, nunca desististes de mim e me fez prevalecer todos os obstáculos (viagens, cansaços, medos, angústias e solidão). Eis me aqui Senhor seguindo adiante com sonhos e planos sob a Tua vontade, e proteção da Mãezinha que sempre passa na frente junto com meu querido anjo da guarda. Sei que já sou uma vencedora, pois teu Amor é meu maior bem.

À minha família por todo apoio dado durante essa fase da minha vida: Amo a todos! Em especial aos meus amados pais, Cícera e João, por todo o carinho e cuidado que me deram ao longo da vida, pelos conselhos e exemplos de dignidade, que contribuem para o meu caráter. Aos meus irmãos (Keila e Victor) por compartilharem das minhas conquistas e serem minha fonte de alegria quando o cansaço abatia meu coração. Às minhas tias (Iê e Pinhô), que nunca esquecem de zelar pela nossa felicidade nas suas orações e ligações que nos acalentam.

Ao meu amigo-namorado, Getúlio, por toda ajuda e aperreios que suportou, pelas conversas e por todas as vezes em que não me deixou desistir, lhe sou grata por acreditar que eu seria capaz de enfrentar todas as dificuldades me fazendo uma pessoa cada dia mais resiliente.

Ao professor Rubem Guedes, por me aceitar como orientanda e me permitir conhecer um pouco do mundo científico, o qual nos transmite tão levemente através da sua grande experiência. Agradeço seus ensinamentos, paciência, reclamações para aprimoramento e seus cafés. Levarei seu exemplo profissional por toda minha vida.

A todos do LAFINNT, pelo acolhimento e orientações durante a pesquisa também pelos momentos de lazer e gargalhadas compartilhadas. Lembrarei de vocês com estima: Joselma, Regina, Rose, Suênia, Elian e aos demais que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Agradeço aos meus estagiários: Laís Alves, Julia Maria, Ângelo Rafael, Thaísa Paiva, Izaura Souza e Luísa Figueira. A contribuição, dedicação e responsabilidade de vocês nesse processo permitiu que a realização desse trabalho fosse menos difícil.

Aos meus queridos animais, a quem tanto cuidei com dedicação e zelo pela vida de cada um. Sou grata por fazerem parte da minha experiência no campo da ciência, guardo nossos momentos no meu coração e na memória.

Aos técnicos administrativos do Departamento de Nutrição da UFPE: Edeones França (Dr. França) e Dr. Bruno – médicos-veterinários do biotério, Fernando Wesley – técnico de lab. química, Cecília e Andreia – secretárias PPGN, pelo apoio técnico excepcional.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano – Campus Salgueiro pelo apoio que me foi dado permitindo que a realização dessa capacitação fosse possível e reconhecendo a sua importância para o desenvolvimento do servidor bem como do seu trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos que entenderam a minha ausência em alguns momentos e em especial àqueles que acompanharam esta etapa dando apoio de alguma forma: Vanyelle, Annamaria, Danúzia, Danúbia, Cida e Seu Joaquim. Aos meus colegas da turma de mestrado: Henrique Gouveia, Lucélia, Yalle, Luana, Gabriel e Penha. Agradeço também as minhas companheiras de moradia: Cida, Dani, Carol e Elaine pelos momentos de convívio e harmonia.

Agradeço imensamente essa nova oportunidade da vida, que me permitiu ter essa experiência de crescimento pessoal e espiritual ao longo desses dois anos. Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé (2 Timóteo 4:7). Que Deus abençoe a todos!

Senhor, fazei de mim um instrumento da Vossa paz.

(Oração de São Francisco,2019)

RESUMO

A vitamina B₆ compreende sete compostos: piridoxal, piridoxina, piridoxamina, as suas respectivas formas fosforiladas, e o ácido piridóxico. O termo piridoxina (PN) foi proposto para nomear as formas naturais desse composto. A forma metabolicamente ativa é o piridoxal fosfato (PLP), que participa em mais de 100 reações enzimáticas, incluindo o metabolismo dos carboidratos, lipídeos e na síntese, catabolismo, e interconversão de aminoácidos. A vitamina B₆ tem um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso humano, especialmente no metabolismo de neurotransmissores. Neste estudo, investigamos, em ratos, os efeitos da suplementação com piridoxina, administrada por via orogástrica (gavagem), sobre comportamentos sugestivos de ansiedade, bem como a atividade eletrofisiológica cerebral. Ratos *Wistar* receberam, do dia pós-natal (P) 7 ao P27, cloridrato de piridoxina (1, 5 e 10 mg/kg/dia). Em P60-70, os animais foram submetidos ao teste no labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação de comportamentos sugestivos de ansiedade. Em P71-80, sob anestesia, registramos o fenômeno eletrofisiológico designado como depressão alastrante cortical (DAC). Em comparação com os grupos controle (velocidades: $3,38 \pm 0,11$ mm/min; amplitude: $6,8 \pm 1,7$ mV; duração: $65,4 \pm 7,3$ s), o tratamento com piridoxina nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia esteve associado a um aumento significativo da velocidade ($3,91 \pm 0,12$ e $4,82 \pm 0,24$ mm/min, respectivamente) e amplitude da DAC ($9,6 \pm 2,4$ e $9,9 \pm 2,4$ mV, respectivamente), bem como a uma redução da duração ($55,7 \pm 6$ s e $51,1 \pm 6,4$ s; $p \leq 0,05$), de maneira dose-dependente, e a uma tendência não-significante de mais comportamento de ansiedade, em comparação com os controles naïve (ingênuo; sem qualquer tratamento) e os tratados com salina. Nossos dados demonstram um efeito facilitador da suplementação com PN, no período crítico de desenvolvimento, sobre a propagação da DAC. Esse efeito é duradouro e dose-dependente, e seus mecanismos deverão ser futuramente investigados. Esses resultados permitem antever avanços na compreensão dos mecanismos pelos quais a PN influencia o desenvolvimento e funcionamento do cérebro de mamíferos, com vista à aplicação dos resultados no cérebro humano.

Palavras-chave: Depressão cortical alastrante. Piridoxina. Suplementos nutricionais. Comportamento animal. Crescimento e desenvolvimento.

ABSTRACT

Vitamin B₆ comprises seven compounds: pyridoxal, pyridoxine, pyridoxamine, its respective phosphorylated forms and pyridoxic acid. The term pyridoxine (PN) has been proposed to name the natural forms of this compound. The metabolically active form is pyridoxal phosphate (PLP) that participate in more than 100 enzymatic reactions, including carbohydrate and lipid metabolism, and in the synthesis, catabolism, and interconversion of amino acids. Vitamin B₆ plays a key role in the development of the human nervous system, especially in the metabolism of neurotransmitters. In this study, we investigated the effects of orogastric (gavage) supplementation with pyridoxine in rats on anxiety-like behavior and brain electrical activity. Wistar rats received pyridoxine hydrochloride (1, 5 and 10 mg/kg/day) from postnatal day (P) 7 to P27. On P60-70, the animals were subjected to the test in the elevated plus maze to evaluate anxiety-like behavior. On P71-80, under anesthesia, we recorded the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD). Compared with saline-treated controls (CSD velocity, 3.38 ± 0.11 mm/min; CSD amplitude, 6.8 ± 1.7 mV, and CSD duration 65.4 ± 7.3 s), pyridoxine treatment with 5 mg/kg/day and 10 mg/kg/day was associated to a significant increase in CSD propagation velocity (respectively 3.91 ± 0.12 and 4.82 ± 0.24 mm/min) and amplitude (9.6 ± 2.4 and 9.9 ± 2.4 mV), as well as a reduction in CSD duration (55.7 ± 6 s and 51.1 ± 6.4 s; $p \leq 0,05$ and a non-significant trend to increased anxiety-like behavior,. This effect was long-lasting and dose-dependent. Our data demonstrate a dose-dependent, facilitating and long-lasting effect of pyridoxine on CSD propagation in the rat brain, when the animals were supplemented at the critical period of development. Data allow foresee advances in the understanding of the mechanisms by which pyridoxine influences the development and functioning of the mammalian brain, aiming the application of the outcoming knowledge on the human brain.

Keywords: Cortical spreading depression. Pyridoxine. Dietary supplements. Animal behavior. Growth and development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estruturas químicas da vitamina B ₆	13
Figura 2 –	Metabolismo da vitamina B ₆	18
Tabela 1 –	Ingestão dietética de referência para vitamina B ₆	19
Figura 3 –	Esquema de eventos da DAC	25
Tabela 2 –	Condições que facilitam a propagação da DAC.....	26
Tabela 3 –	Condições que dificultam a propagação da DAC.....	27
Figura 4 –	Diagrama temporal dos procedimentos experimentais....	31
Figura 5 –	Labirinto em cruz elevado	32
Gráfico 1 –	Pesos corporais dos animais.....	34
Gráfico 2 –	Teste LCE dos animais	35
Figura 6 –	Registros eletrofisiológicos.....	36
Gráfico 3 –	Velocidades da DAC.....	37
Gráfico 4–	Durações e amplitudes da DAC	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAC	DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL
ECoG	ELETROCORTICOGRAMA
GABA	ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO
GAD	GLUTAMATO DESCARBOXILASE
LCE	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO
P	DIA PÓS-NATAL
PL	PIRIDOXAL
PLP	PIRIDOXAL 5'FOSFATO
PM	PIRIDOXAMINA
PMP	PIRIDOXAMINA 5'FOSFATO
PN	PIRIDOXINA
PNP	PIRIDOXINA 5'FOSFATO
PNPO	PIRIDOXAMINA 5'FOSFATO OXIDASE
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
VLV	VARIAÇÃO LENTA DE VOLTAGEM

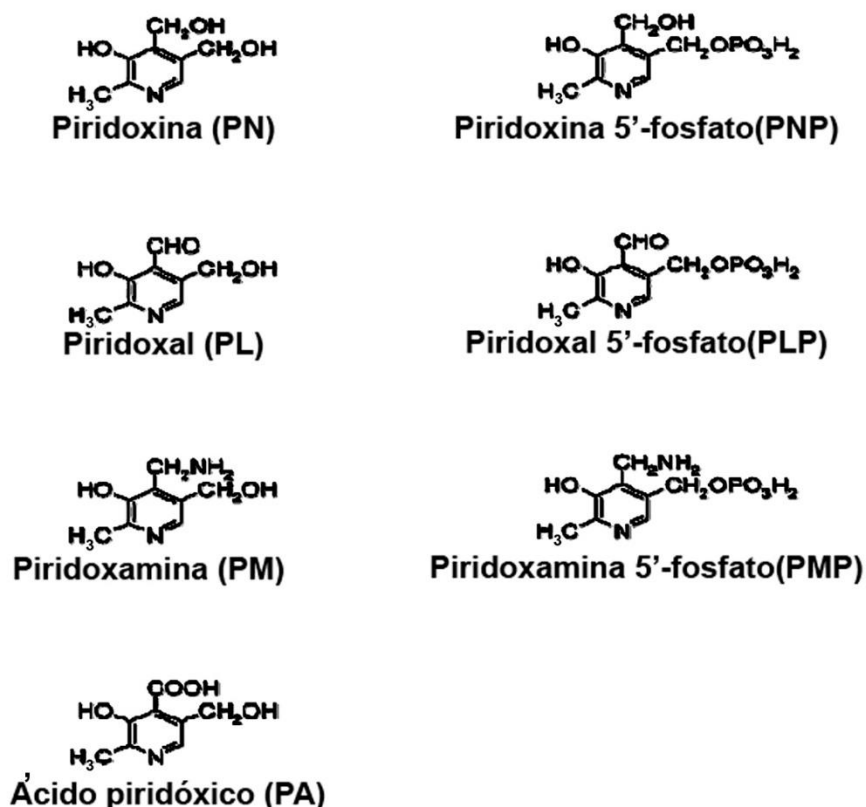
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	PIRIDOXINA	17
2.2	PIRIDOXINA E SISTEMA NERVOSO	20
2.3	DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL	24
3	HIPÓTESE	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GERAL	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5	MÉTODOS	30
5.1	ANIMAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	30
5.2	ANÁLISE COMPORTAMENTAL: LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	31
5.3	REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL	32
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6	RESULTADOS	34
6.1	PESOS CORPORAIS	34
6.2	TESTE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	34
6.3	REGISTROS DA DAC	35
6.4	PARÂMETROS DA DAC	36
7	DISCUSSÃO	39
8	CONCLUSÃO	46
8.1	PERSPECTIVAS	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	61

1 INTRODUÇÃO

A vitamina B₆ compreende uma família de moléculas hidrossolúveis com sete compostos: piridoxal (PL), piridoxina (PN), piridoxamina (PM), suas formas 5'-fosforiladas (PLP, PNP e PMP) e o ácido piridóxico (BOWLING, 2011; EGGERSDORFER *et al.*, 2012). Esses compostos agem como coenzimas em processos do metabolismo de aminoácidos (transaminação, descarboxilação e desaminação), síntese de nucleotídeos, metabolismo de neurotransmissores, síntese de heme, gliconeogênese e glicogenólise, função imune e fatores de transcrição (KRAEMER *et al.*, 2012; WHITTAKER, 2016).

Figura 1 - Estruturas químicas da vitamina B₆



Fonte: Adaptado de Harper, MURRAY *et al.* (2009).

A piridoxal-5'-fosfato (PLP) é a forma ativa mais comum no metabolismo humano e está, em sua maior parte, presente no músculo ligada à enzima glicogênio fosforilase. Alimentos de origem animal, como carne bovina, porco, frango e peixe, são excelentes fontes de piridoxal e piridoxamina. Por outro lado, a piridoxina é

amplamente distribuída nas plantas. A ingestão de alimentos proteicos constitui a principal fonte dietética desse composto, pois apresenta uma relação positiva com a quantidade de vitamina B₆ necessária para as reações enzimáticas do organismo (HANSEN *et al.*, 1996; BOWLING, 2011; ERDMAN Jr *et al.*, 2012).

A PLP desempenha um importante papel no cérebro, onde sua necessidade é cerca de 100 vezes maior do que nos órgãos periféricos, particularmente no período de desenvolvimento, quando a síntese de vários neurotransmissores é dependente da PLP (CLAYTON, 2006; YARLAGADDA e CLAYTON, 2007). Participa da conversão de dopa em dopamina e também da conversão do neurotransmissor excitatório glutamato no neurotransmissor inibitório ácido gama-amino butírico (GABA; sigla da expressão inglesa gamma-amino butyric acid). Participa ainda da síntese de epinefrina, norepinefrina, serotonina, serina e histamina (BOWLING, 2011). As enzimas dependentes de PLP exercem um papel importante na síntese de compostos neuroprotetores, como o ácido quinurênico, um intermediário do metabolismo do triptofano com ação antiexcitotóxica e anticonvulsiva (HAN *et al.*, 2008).

A relação entre os níveis de vitamina B₆ e o desenvolvimento comportamental é percebida pelo efeito significativo desse composto sobre os sistemas GABAérgicos e serotoninérgicos, que podem atuar no controle da ansiedade e da depressão (DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2014). De acordo com Kennedy (2016), deficiências suaves de vitamina B₆ podem afetar a síntese desses neurotransmissores, que resulta em regulação “para baixo” (down-regulation) na síntese do GABA e da serotonina, com consequente inibição da atividade neural pelo GABA e comportamento, função cardiovascular e sono desordenados. A carência da vitamina B₆ também está envolvida em alterações comportamentais, como irritabilidade e uma maior sensibilidade a ruídos, percebidas em crianças que foram alimentadas com uma fórmula deficiente da vitamina no primeiro ano de vida, além de convulsões duradouras (NELSON, 1956).

Devido o seu papel-chave na ontogênese normal e desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), baixas concentrações de PLP no plasma podem estar relacionadas com déficit de cognição (DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2015). Diferentemente, em estudo com animais que receberam doses elevadas (400mg/kg/dia) de PN foram percebidos sinais comportamentais de incômodo,

denotados por expressiva vocalização, agressividade contra outro rato da mesma gaiola e comportamento de instabilidade postural, este último aumentado no decorrer do tratamento (PERRY *et al.*, 2004). Os níveis mais elevados da vitamina B₆ são descritos como benéficos, e a sua suplementação além de preservar e melhorar a estrutura cerebral e cognição pode auxiliar a fluência verbal em idosos com demência (JANNUSCH *et al.*, 2017). A administração de multivitamínico (incluindo vitaminas do complexo B) e a suplementação podem gerar benefícios na inteligência não verbal e em outras medidas comportamentais (KENNEDY, 2016).

Em indivíduos que apresentam deficiência de vários micronutrientes, a suplementação com apenas um único micronutriente pode não afetar o desenvolvimento cognitivo e motor, mas quando realizada com múltiplos micronutrientes pode ter melhores resultados (PRADO e DEWEY, 2014). A PN é mais termorresistente que as outras formas naturais da vitamina B₆ (ROSENBERG, 2012). Por essa razão, é a forma sintética da vitamina mais utilizada na fortificação de alimentos, suplementos dietéticos e no tratamento de transtornos convulsivos em crianças (ERDMAN Jr *et al.*, 2012; ROSENBERG, 2012). Sua ingestão excessiva foi capaz de produzir evidentes déficits comportamentais, eletrofisiológicos e anatômicos, sem morbidades sistêmicas explícitas (PERRY *et al.*, 2004). Embora os estudos sobre o papel da vitamina B₆ no desenvolvimento humano não sejam claros, alguns experimentos com erros inatos (deficiência de PNPO, hipofosfatasia, deficiência da proteína intracelular de ligação a PLP (PLPBP), deficiência de *ALDH7A1* e hiperprolinaemia tipo II) que afetam seus vitâmeros mostram o papel fundamental desse composto no metabolismo de neurotransmissores, e por consequência sobre a formação cerebral (BOWLING, 2011; WILSON *et al.*, 2019).

As intensas modificações que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento infantil também se apresentam no cérebro, nas fases pré e pós-natal, provenientes de diversos fatores (genéticos, nutricionais ou ambientais) (SHEPHERD, 2002). O período crítico de desenvolvimento do SNC tem início, no homem, a partir do terceiro trimestre de gestação e segue até os primeiros dois a quatro anos de idade. No rato esse período compreende o período intra-uterino (a partir do 10º dia de gestação) até a terceira semana de vida pós-natal, que corresponde à fase do aleitamento (MORGANE *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2016).

Nessa fase os processos de neurogênese, gliogênese, sinaptogênese,

mielinização, entre outros, ocorrem em elevada velocidade e podem sofrer alterações de diversos fatores exógenos. Algumas dessas influências no desenvolvimento do SNC podem ser estudadas através do fenômeno eletrofisiológico da depressão alastrante cortical (DAC). Vários estudos têm avaliado os efeitos de variáveis nutricionais (LIMA *et al.*, 2013; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014; MEDEIROS, 2016), hormonais (ACCIOLY *et al.*, 2012; LOPES-DE-MORAIS *et al.*, 2014; ACCIOLY e GUEDES, 2017), ambientais (BATISTA-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2012; SILVA-GONDIM *et al.*, 2017) e farmacológicas (GUEDES *et al.*, 2017) sobre esse fenômeno relacionado à excitabilidade do cérebro. Doenças neurológicas humanas, como por exemplo epilepsias, enxaqueca com aura e isquemia cerebral têm sido alvo de estudos que utilizam a DAC para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos (GUEDES e CAVALHEIRO, 1997; GORJI, 2001; NYE e THADANI, 2015). Tendo em vista as diversas ações biológicas da vitamina B₆ sobre o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso, o presente estudo em ratos utilizará o labirinto em cruz elevado (LCE) como modelo para avaliação de comportamento de ansiedade, e a DAC como modelo eletrofisiológico, para análise dos efeitos da suplementação com piridoxina durante o período de desenvolvimento cerebral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PIRIDOXINA

A vitamina B₆ foi isolada na sua forma cristalina pura pela primeira vez por Samuel Lepkovsky, em 1938, após quatro anos do reconhecimento desse componente do complexo B. O termo piridoxina foi proposto para nomear as formas naturais desse composto: o piridoxal (PL), a piridoxamina (PM) e a forma fosforilada de PL, o piridoxal 5'- fosfato (GYÖRGY, 1956; ROSENBERG, 2012).

A PLP participa como coenzima em quase todos os aspectos da função metabólica e da homeostase celular de forma direta ou indireta em mais de 100 reações (RODWELL *et al.*, 2016). Atua nos processos de interconversão dos aminoácidos, como a homocisteína, através de reações nos ciclos do folato e metionina gerando grupos metilo (como S -adenosilmetionina), e na síntese de cisteína (ERDMAN Jr *et al.*, 2012; DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2015).

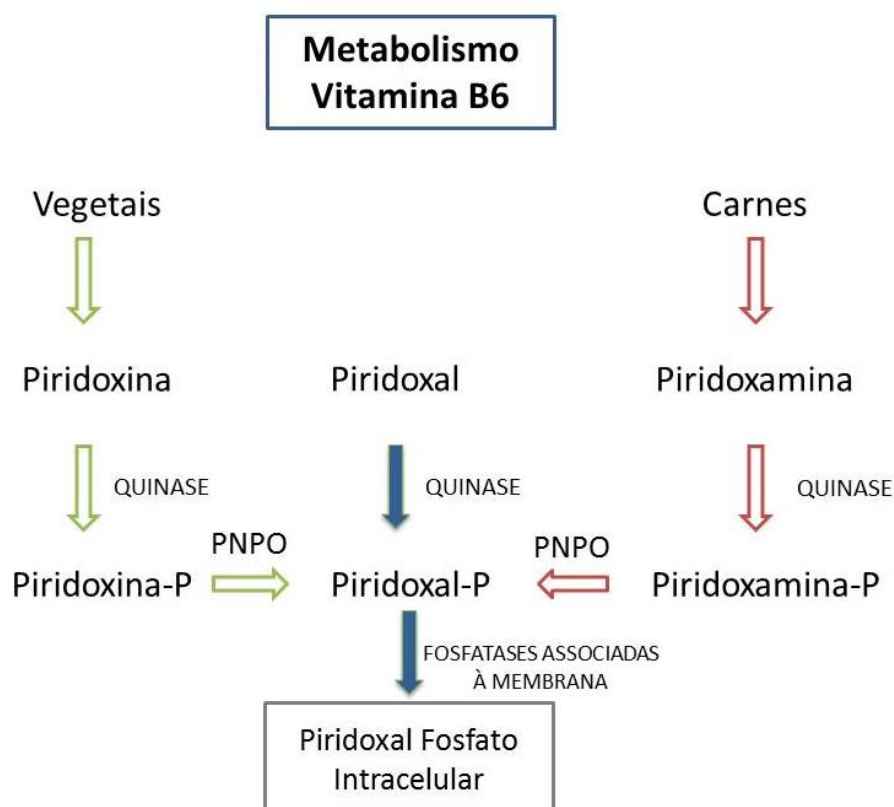
A absorção intestinal da vitamina B₆, a partir de fontes alimentares, ocorre por difusão passiva e insaturável nas formas desfosforiladas (PN, PL e PM), principalmente no jejuno. Além disso, as bactérias da flora intestinal podem produzi-la por meio de hidrólise mediada por fosfatases (HAMM *et al.*, 1979; GHAVANINI e KIMPINSKI, 2014). Segundo Said *et al.* (2008), a vitamina B₆ sintetizada pela microflora no cólon humano e também de ratos pode ser absorvida como fonte exógena secundária.

Embora alguns tecidos possam realizar a fosforilação da PL, PM e PN, é no fígado onde há maior atividade de conversão das várias espécies da vitamina B₆ para a forma fosforilada por ação da enzima piridoxal quinase. O fosfato de piridoxina (PNP) e o fosfato de piridoxamina (PMP) são convertidos em fosfato de piridoxal (PLP) pela ação da enzima piridoxamina 5'- fosfato oxidase (PNPO) (Figura 2), e transportados para órgãos e tecidos através do plasma, ligados à albumina (RODWELL *et al.*, 2016; WHITTAKER, 2016). De acordo com Mills *et al.* (2005), a PLP consegue atravessar a barreira hematoencefálica e a enzima PNPO, também presente no cérebro, parece similar à que se encontra em outros órgãos,

como o fígado e outras células não neurais.

A biodisponibilidade de vitaminas e minerais inclui vários processos ainda não elucidados completamente devido as diferentes estruturas químicas, mecanismos fisiológicos e interações com agentes antivitaminicos (SCHIEFERDECKER *et al.*, 2015). Em uma dieta variada a biodisponibilidade da vitamina B₆ fica em torno de 75%, entretanto uma ingestão inadequada ou deficiências nutricionais podem causar interferências na quantidade de B₆ disponível para os processos metabólicos (BOWLING, 2011). Grande parte está ligada às proteínas ou glicosilada, isso também reduz sua biodisponibilidade em alguns alimentos. Entre os alimentos com maiores concentrações de vitamina B₆ encontram-se as carnes, produtos de grãos integrais, vegetais e nozes (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2012).

Figura 2 - Metabolismo da vitamina B₆



Fonte: Adaptada de GUERRIERO *et al.* (2017).

O requerimento dietético da vitamina B₆ é proporcional à ingestão de fontes proteicas e compreende de 1,1 a 2,0 mg/dia para um ser humano adulto normal

(OTTEN *et al.*, 2006; RODWELL *et al.*, 2016). As necessidades aumentam em torno de 0,6 mg/dia durante a gestação e lactação (Tabela 1). O principal critério usado para estimar os requerimentos de vitamina B₆ é o nível plasmático do piridoxal 5'-fosfato com valores maiores que 20 nmol/L (OTTEN *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Ingestão dietética de referência para vitamina B₆

Grupo Faixa etária	DRI valores (mg/dia)				Critérios para determinar as necessidades de B6		
	EAR ¹		RDA ²			AI ³	UL ⁴
	Homem	Mulher	Homem	Mulher			
Grupo							
Faixa etária							
0 a 6 meses					0.1	ND*	Quantidade no leite humano
7 a 12 meses					0.3	ND	Média aproximada de crianças mais novas e adultos
1-3 anos	0.4	0.4	0.5	0.5		30	Avaliação com base nos níveis de adultos
4-8 anos	0.5	0.5	0.6	0.6		40	
9-13 anos	0.8	0.8	1.0	1.0		60	
14-18 anos	1.1	1.0	1.3	1.2		80	
19-30 anos	1.1	1.1	1.3	1.3		100	Nível de piridoxal 5'-fosfato no plasma
31-50 anos	1.1	1.1	1.3	1.3		100	
51-70 anos	1.4	1.3	1.7	1.5		100	
>70 anos	1.4	1.3	1.7	1.5		100	
Gestação							
≤ 18 anos		1.6		1.9		80	Nível de piridoxal 5'-fosfato no plasma
19-50 anos		1.6		1.9		100	
Lactação							
≤ 18 anos		1.7		2.0		80	Quantidade de vitamina B6 secretada no leite
19-50 anos		1.7		2.0		100	
DRI (Dietary reference intakes): Ingestão Dietética de Referência							
¹ EAR (Estimated Average Requirement): Necessidade Média Estimada							
² RDA (Recommended Dietary Allowance): Ingestão Dietética Recomendada							
³ AI (Adequate Intake): Ingestão Adequada							
⁴ UL (Tolerable Upper Intake Level): Limite Superior Tolerável de Ingestão							
*ND: Não determinado.							
Fonte: Adaptada de OTTEN (2006), traduzida por GONDIM-SILVA(2019).							

Apesar de raros, em casos de deficiência da vitamina B₆ os neurotransmissores: dopamina, serotonina (5-hidroxitriptamina), glicina, d-serina, glutamato, γ -aminobutirato e histamina podem ser afetados e provocar várias desordens neurológicas e não neurológicas. Os sintomas dessa deficiência incluem

dermatite seborreica, anemia microcítica, convulsões, e alterações comportamentais incluindo depressão e confusão mental (DI SALVO *et al.*, 2011; ALBERSEN *et al.*, 2014).

A ingestão de PN na forma de suplemento dietético, em doses de até 2 g/dia, foi descrita por Dalton e Dalton (1987). Segundo esses autores, bem como Di Salvo *et al.* (2011), a ingestão excessiva seria o fator desencadeante da síndrome neurotóxica em humanos que apresentaram sinais de parestesia, fraqueza muscular e dormências nas extremidades. Já Berger *et al.* (1992) observaram casos de neuropatia sensorial quando suplementaram a PN em quantidades maiores que 500 mg/dia. Como forma de evitar intoxicações, o Institute of Medicine/US (1998) definiu a ingestão máxima da vitamina B₆ em 100 mg/dia para adultos. A exemplo temos as fórmulas dos suplementos multivitamínicos de uso comum na população, que fornecem doses seguras em torno de 2 mg/dia (ERDMAN Jr *et al.*, 2012). No entanto, quando há ingestão elevada, o corpo age de forma combinada pela ação de fosfatases e oxidases minimizando ações danosas, tais como neuropatias (ERDMAN Jr *et al.*, 2012).

O papel da vitamina B₆ no desenvolvimento cerebral de humanos ainda não está bem definido. Isso reforça a necessidade de mais pesquisas dada a importância desse nutriente em distúrbios do SNC relacionados às funções da PLP, que afetam o desenvolvimento neurológico e o metabolismo neurotransmissor (hipofosfatase, distúrbios da formação de PLP, deficiência de antiquitina, malformações no desenvolvimento viscerocranial) com consequências diretas na saúde humana (CLAYTON, 2006; BOWLING, 2011).

2.2 PIRIDOXINA E SISTEMA NERVOSO

No sistema nervoso, a piridoxina desempenha um importante papel na síntese de várias moléculas dependentes de PLP tais como a dopamina, norepinefrina, serotonina, ácido gama-aminobutírico, taurina, esfingolipídios e poliaminas (DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2015). A atividade da piridoxal fosfoquinase (enzima responsável pela fosforilação do piridoxal) sobre o tecido nervoso é reconhecida; a mesma pode ser inibida, *in vitro*, por estimulantes do

sistema nervoso central (hidrazida e análogos) (MCCORMICK e SNELL, 1961).

A PN é indispensável para o bom funcionamento cerebral auxiliando, inclusive, na proteção contra os efeitos da excitotoxicidade. Através de sua conversão, a PLP parece reduzir o glutamato intracelular, elevar os níveis do GABA, a atividade de proto-oncogenes e glutamato descarboxilases (GAD) (BÜYÜKOKUROGLU *et al.*, 2007; DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2015). Algumas evidências bioquímicas apontam que o transporte da vitamina B₆ do sangue até o cérebro guarda uma relação direta da piridoxal com o fluido cerebrospinal e plasma, e podem ser associadas ao transporte via barreira hematoencefálica ou plexo coroide, porém ainda não está totalmente elucidado (SPECTOR e JOHANSON, 2007; ALBERSEN *et al.*, 2014).

Estudos iniciais (HUNT *et al.*, 1954; NELSON, 1956) mostraram a associação entre a vitamina B₆ e sua função na produção de neurotransmissores. Hunt e colaboradores (1954) notaram seus efeitos neuroprotetores após utilizarem a PN como forma de tratamento para casos de encefalopatia epiléptica em bebês e na infância. De modo semelhante, lactentes alimentados com uma fórmula deficiente de PN apresentavam quadros de convulsões que cessavam quando essa substância era administrada (NELSON, 1956). No outro sentido, segundo Bilodeau (1965), convulsões induzidas tanto por estimulação elétrica quanto pelo uso do pentilenotetrazol são capazes de reduzir a quantidade de PLP no cérebro de ratos. Depois em pesquisa realizada por Paulose *et al.*, (1988), com animais submetidos a dietas deficientes em vitamina B₆, demonstrou-se a redução dos níveis de neurotransmissores e quando os animais eram tratados com uma dose única de PN (10 mg/kg de peso corporal), os níveis retornavam ao normal.

Em seguida, foram descobertos vários erros inatos do metabolismo (convulsão dependente de piridoxina, condições responsivas a piridoxina e responsiva ao piridoxal-fosfato) relacionados com o metabolismo da vitamina B₆ e seu papel no sistema nervoso (DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2014). Conforme Sreekumaran *et al.* (2003), a administração crônica de PN (8mg/kg de massa corporal por 30 dias), após tratamento com alumínio, reverteu os efeitos nocivos sobre a conectividade dendrítica no hipocampo do rato. A administração de PN em esquilos (350 mg/kg durante 30 a 60 dias), promoveu um aumento na

diferenciação neuroblástica no giro denteado e também induziu a formação de novos neurônios maduros na região CA₁ do hipocampo (YOO *et al.*, 2012).

É importante destacar o estudo da PN como uma opção terapêutica para lesões cerebrais que causem hipóxia-isquêmica (BOWLING, 2011). No tratamento realizado por Kuypers e Hoane (2010), a PN mostrou-se eficaz em ratos quando administrada em 30 minutos e 24 horas, após os animais sofrerem uma lesão de impacto cortical unilateral do córtex sensorio-motor, estimulando a recuperação com efeito dose-dependente (600 ou 300 mg/kg intraperitoneal), que reforça sua capacidade neuroprotetiva. Segundo Dakshinamurti e Dakshinamurti (2015), condições de isquemia cerebral induzida por diversos meios foram atenuadas com administração da PLP isolada ou combinada com um agente trombolítico, ativador do plasminogênio tecidual (TPA), e o efeito neuroprotetor permanecia por até 6 horas após a lesão.

A piridoxina é um nutriente essencial, entretanto em doses elevadas torna-se neurotóxica como qualquer outro composto, e quando associada à restrição alimentar provoca aumento da neurotoxicidade (KULKANTRAKORN, 2014). Com relação à avaliação da toxicidade e da neurotoxicidade da piridoxina, Perry *et al.* (2004) reportam estudos experimentais anteriores com roedores submetidos a aplicações intraperitoneais de PN em regimes de diferentes dosagens (curto prazo/dose elevada 1.200 mg/kg/dia, médio prazo/dose intermediária 600 mg/kg/dia e longo prazo/dose baixa 100-300 mg/kg/dia). Em todos, a neurotoxicidade da PN foi identificada por lesões no sistema nervoso periférico em nível primário (gânglios da raiz dorsal e trigeminal) e degeneração dos axônios das células prejudicadas, posteriormente.

Os mecanismos da neurotoxicidade causada por grandes doses de PN ainda não estão definidos, embora algumas teorias existam (molécula de piridoxina inalterada, os vitâmeros ou a coenzima ativa, intermediários no processo de conversão para coenzima, ou algum derivado não conhecido) (KULKANTRAKORN, 2014). Após administrar por sete dias consecutivos, em ratos (machos e fêmeas), até 200 mg/kg/dia de dicloridrato de piridoxamina por infusão intravenosa, Sullivan Jr *et al.* (2017) verificaram que não há relação entre os achados macro ou microscópicos no sistema nervoso (cérebro, medula espinhal, raízes do nervo

espinhal/gânglios e nervos periféricos) e nos órgãos estudados (fígado, rins, coração, baço, pâncreas e timo) com o tratamento aplicado. Estudos nessa área são importantes tendo em vista a prática terapêutica de uso de altas doses de PN de forma contínua (KULKANTRAKORN, 2014; SULLIVAN Jr *et al.*, 2017).

A vitamina B₆ é fundamental para a produção de serotonina, pois atua como cofator enzimático para reação de conversão do triptofano em serotonina. Quantidades diminuídas de vitamina B₆ desaceleram essa reação (ADAMS, 2015). A serotonina é a substância precursora imediata da melatonina, o hormônio indutor do sono, produzido pela glândula pineal, que regula os ritmos circadianos dos ciclos sono-vigília (KENNEDY, 2016). Em estudo com ratos adultos Sprague-Dawley alimentados com uma dieta deficiente de PN por 8 semanas, não houve modificação do ritmo circadiano da serotonina, mas suas quantidades foram reduzidas significativamente no tronco cerebral dos animais com deficiência desse nutriente (VISWANATHAN *et al.*, 1990).

Mudanças de comportamentos (humor, saciedade, libido) são consequências diretas de alterações nesses ritmos circadianos (SHABBIR *et al.*, 2013). Segundo Parletta *et al.* (2013), os estudos confirmam que a uma nutrição adequada é fundamental para o desenvolvimento cerebral bem como a suplementação nutricional pode auxiliar na melhoria da função cognitiva e da saúde mental, com benefícios para a neurogênese e plasticidade cerebral. De acordo com Adams (2015), estudos com doses elevadas de vitamina B₆ associadas a magnésio têm demonstrado melhorias comportamentais de adultos e crianças autistas em comparação a tratamentos placebos.

A quantidade de vitamina B₆ presente no organismo é essencial para o equilíbrio entre os estados de excitação e inibição neuronal. Na fase crítica de desenvolvimento do sistema nervoso central, em ratos, a deficiência de vitamina B₆ provocou efeitos significativos sobre diferentes variáveis eletrofisiológicas (DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2014). Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas sobre as consequências da suplementação desse nutriente durante o período crítico de desenvolvimento, seja através de variáveis comportamentais ou eletrofisiológicas, com o intuito de prevenir possíveis danos ao desenvolvimento cerebral e cognitivo também em humanos.

2.3 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A Depressão Alastrante Cortical (DAC) é um fenômeno com características eletrofisiológicas bem definidas e que foi inicialmente descrita pelo pesquisador brasileiro Aristides Leão em 1944. Ele observou que estímulos elétricos, químicos ou mecânicos locais (aplicados em um ponto da superfície cortical) são capazes de provocar uma resposta caracterizada por intensa redução (depressão) da sua atividade elétrica espontânea, que se propaga em todas as direções a partir desse ponto (LEÃO, 1944).

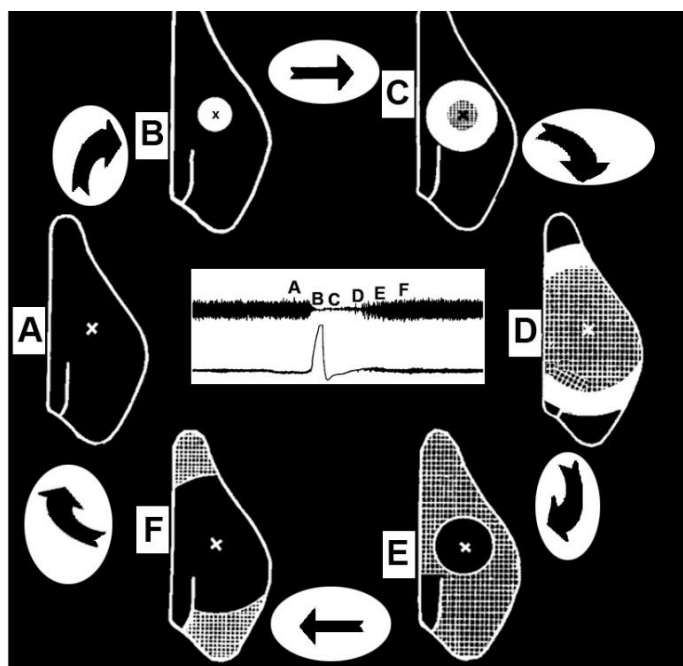
Durante o fenômeno ocorre uma rápida despolarização neuronal com um elevado influxo de água e íons Na^+ , Cl^- e Ca^{++} , e efluxo de K^+ , diminuição da resistência da membrana, aumento do volume celular e diminuição do espaço extracelular (GORJI, 2001; NYE e THADANI, 2015). Outras alterações também podem ser desencadeadas, como dilatação dos vasos sanguíneos da pia-máter (LEÃO, 1944), mudanças nas concentrações de alguns aminoácidos como glutamato e taurina no meio extracelular (SCHELLER *et al.*, 2000).

A redução da atividade elétrica cerebral, tanto a espontânea como a provocada, é seguida pelo surgimento de uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno (LEÃO, 1947), que se propaga de forma concêntrica, a partir do ponto inicialmente estimulado, e atinge regiões cada vez mais afastadas (Figura 3). À medida que o fenômeno se propaga pelo córtex, o ponto de origem da atividade elétrica deprimida começa a se recuperar e em torno de 5 a 10 minutos o tecido recupera-se por completo (LEÃO, 1944).

A sensibilidade do tecido nervoso à DAC pode ser avaliada pela velocidade de propagação do fenômeno ao longo do tecido cortical. Em várias espécies animais (compreendendo, peixes, batráquios, aves e mamíferos, inclusive no homem) a DAC já foi identificada (LAURITZEN e STRONG, 2017). Nos vertebrados já estudados, a velocidade de propagação da DAC é consideravelmente mais baixa (da ordem de 2 a 5 mm/min) quando comparada à velocidade do potencial de ação neuronal, da ordem de metros por segundo (GUEDES, 2005).

De acordo com Guedes (2011), os aspectos-chave que representam o fenômeno da DAC podem ser descritos como: (1) é um fenômeno cooperativo, pois necessita de uma população mínima de corpos celulares para ser gerado; (2) necessita de algum tipo – qualquer tipo - de variação de energia (estímulo) para ser deflagrado; (3) é completamente reversível; (4) propaga-se uniformemente de uma área sensorial para uma motora e vice-versa; (5) manifesta-se em todas as espécies de vertebrados até hoje estudadas, desde peixes até o homem; (6) de propagação lenta em um tecido no qual o potencial de ação se alastra rapidamente; (7) propaga-se mais facilmente em cérebros lisencéfalos do que em girencéfalos; e (8) não se sabe se é um fenômeno essencialmente fisiológico ou se também pode ser patológico, visto que algumas evidências sugerem que doenças neurológicas têm em comum alguns mecanismos subjacentes à DAC.

Figura 3 - Esquema de eventos da DAC



Fonte: Adaptado de GUEDES (2011). Esquema da sequência temporal cíclica de DAC. Em “A”, um córtex normal e nele o ponto estimulado (x), iniciando a DAC. Na sequência, indicada pelas setas, “B” a “D”, a propagação concêntrica do fenômeno da DAC está ilustrada. As áreas em branco representam porções do tecido cortical invadidas pelo fenômeno em tempos sucessivos. As áreas quadriculadas, “C” a “F” indicam regiões que já sofreram a DAC e agora estão se recuperando (áreas refratárias a uma nova estimulação). De “B” a “F”, observa-se que propagação (área branca) e recuperação (área escura) dão-se de forma concêntrica, sendo o ponto inicialmente estimulado o primeiro a se recuperar totalmente. Finalmente, todo o tecido se mostra completamente recuperado, retornando à condição inicial (A). No centro da figura, um par de traçados de registro demonstrando o eletrocorticograma (ECoG; traçado superior) e a variação lenta de voltagem (VLV; traçado inferior), a qual sempre aparece durante a DAC, no momento em que o ECoG diminui sua amplitude. As letras “A” a “F” no ECoG correspondem a sequência das etapas representadas nos desenhos externos.

Evidências clínicas e experimentais demonstram a relação do fenômeno com diversas doenças neurológicas. Entre elas estão a enxaqueca (VIGGIANO *et al.*, 2016, ILJAZI *et al.*, 2018), os traumatismos cranianos (TORRENTE *et al.*, 2014), a isquemia cerebral (ANDALUZ *et al.*, 2011), a epilepsia (GUEDES *et al.*, 2009), e a esclerose múltipla (PUSIC *et al.*, 2015). A descoberta da DAC também possibilitou uma melhor compreensão da lesão secundária após insultos neuronais diversos, consequência direta por exemplo de uma lesão cerebral traumática, uma vez que esse fenômeno permite a investigação de forma monitorada e interventiva (KRAMER *et al.*, 2016).

O fenômeno da DAC tem sido estudado pelo Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), como modelo experimental para avaliar o bom funcionamento do tecido neural em condições que influenciam a suscetibilidade cortical dificultando ou facilitando a propagação do fenômeno. Nas tabelas 2 e 3 estão descritas algumas das condições, disponíveis na literatura, envolvidas na alteração da susceptibilidade cortical à DAC, as quais facilitam ou dificultam a sua propagação. Frente ao exposto, o presente trabalho se propôs a estudar os efeitos da administração de piridoxina, em ratos, sobre respostas comportamentais sugestivas de ansiedade e sobre a DAC e suas características eletrofisiológicas.

Tabela 2 – Condições que facilitam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Redução do cloreto extracelular	GUEDES e DO CARMO, 1980
Diazepam	GUEDES e BARRETO, 1992
Deficiência nutricional pela DBR-Dieta Básica Regional	ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997
Hipoglicemia	COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001
Privação do sono paradoxal	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2004
Condição desfavorável de lactação	ROCHA-DE-MELO <i>et al.</i> , 2006
Etanol (crônico)	ABADIE-GUEDES <i>et al.</i> , 2008
Arginina durante o desenvolvimento	MAIA <i>et al.</i> , 2009
Hipertermia ambiental	FARIAS-SANTOS <i>et al.</i> , 2009
Uso de dipirona no início da vida	AMARAL <i>et al.</i> , 2009
*Trat. crônico com ácido ascórbico (60 ou 120 mg/kg/d)	MENDES-DA-SILVA <i>et al.</i> , 2014
Trat. com o antagonista serotoninérgico Tianeptina	AMANCIO-DOS-SANTOS <i>et al.</i> , 2013
Trat. sistêmico com glutamato monossódico	LIMA <i>et al.</i> , 2013
Trat. com o hormônio corticoide dexametasona	LOPES-DE-MORAIS <i>et al.</i> , 2014
Trat. neonatal L- glutamina	DE LIMA <i>et al.</i> , 2016
Trat. com ác. siálico e oligossacarídeos do leite caprino.	MEDEIROS <i>et al.</i> , 2016
Trat. com hormônios ovarianos	ACCIOLY e GUEDES, 2017
Trat. sistêmico e tópico com cafeína	CHAGAS <i>et al.</i> , 2018
Trat. com lectina da <i>Canavalia ensiformis</i> + ác.ascórbico	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2018

Tabela 3 – Condições que dificultam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Tratamento dietético com lítio	GUEDES <i>et al.</i> , 1989
Hiperglicemia	XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ <i>et al.</i> , 2006
Anestésicos	GUEDES E BARRETO, 1992
Hipotireoidismo	GUEDES e PEREIRA-DA-SILVA, 1993
Envelhecimento	GUEDES <i>et al.</i> , 1996
Epilepsia crônica provocada pela pilocarpina	COSTA-CRUZ <i>et al.</i> , 2006
Estimulação ambiental	SANTOS-MONTEIRO <i>et al.</i> , 2000
Ativação do sistema serotoninérgico	AMÂNCIO-DOS-SANTOS <i>et al.</i> , 2006
Condições favoráveis de aleitamento	ROCHA-DE-MELO <i>et al.</i> , 2006
Pilocarpina (doses subconvulsivantes)	GUEDES e VASCONCELOS, 2008
Trat. de ratos adultos com triptofano	TRINDADE-FILHO <i>et al.</i> , 2009
Deficiência, na dieta, de ácidos graxos essenciais	BORBA <i>et al.</i> , 2010
Abolição da função ovariana (castração) pós-natal	ACCIOLY <i>et al.</i> , 2012
Dieta hiperlipídica	GERMANO <i>et al.</i> , 2013
Trat. com o antagonista de opioides Naloxona	GUEDES <i>et al.</i> , 2013
Trat. crônico com 30mg/kg/d de ácido ascórbico	MENDES-DA-SILVA <i>et al.</i> , 2014
Trat. crônico com lectina da <i>Canavalia ensiformis</i>	SOARES <i>et al.</i> , 2014
Trat. neonatal com taurina e alanina	FRANCISCO e GUEDES, 2015
Trat. tópico com glutamato monossódico	VITOR-DE-LIMA <i>et al.</i> , 2017

*Trat. = tratamento

3 HIPÓTESE

O tratamento crônico com piridoxina durante o período crítico de desenvolvimento do SNC causa alterações na propagação da DAC e no comportamento animal, ambos de maneira dose-dependentes.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos eletrofisiológicos e comportamentais da administração oral de diferentes doses de piridoxina durante período crítico de desenvolvimento cerebral, em ratos albinos, utilizando o modelo da depressão alastrante cortical e o teste do labirinto em cruz elevado.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a evolução ponderal dos animais, como indicador dos efeitos do tratamento com piridoxina sobre o desenvolvimento corporal;
- Identificar alterações decorrentes do tratamento crônico com diferentes doses de piridoxina nos parâmetros comportamentais (respostas sugestivas de ansiedade) e eletrofisiológicos (velocidade de propagação, amplitude e duração da DAC);
- Avaliar a relação dose-efeito, nos tratamentos empregados, com relação aos parâmetros estudados.

5 MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram executados no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT). Os animais utilizados provieram do Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Durante a lactação, a mãe e os filhotes (machos e fêmeas; número de filhotes machos por ninhada entre 5 e 7) foram mantidos nas condições padrão do biotério: temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; ciclo artificial claro-escuro a cada 12 horas (fase clara iniciando-se às 6:00 horas), com livre acesso a água e comida (ração comercial PRESENCE-Purina do Brasil Ltda; com 23% de proteína). As condições descritas acima permaneceram até o final do experimento. Os procedimentos experimentais foram submetidos à avaliação e aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais, do CB/UFPE (Processo nº 23076.044817/2017-68 – ANEXO A). O tratamento foi realizado apenas nos filhotes machos entre o sétimo e o vigésimo-sétimo (P7-P27) dia de vida pós-natal, diariamente, com solução salina (grupo veículo) ou cloridrato de piridoxina ([®]Sigma-Aldrich $\geq 98\%$) em três diferentes doses (1, 5 e 10mg/kg/dia) pela técnica de gavagem. Os filhotes constituíram cinco grupos experimentais:

- (1) Grupo Naïve (sem tratamento) n= 10;
- (2) Grupo Veículo (solução salina) n= 11;
- (3) Grupo PN1- Piridoxina de 1mg/kg n= 11;
- (4) Grupo PN5- Piridoxina de 5mg/kg n= 11;
- (5) Grupo PN10- Piridoxina de 10mg/kg n= 11.

A gavagem consiste na administração da substância diretamente no estômago através de uma sonda orogástrica. As dosagens foram estimadas com base nos valores da DRI para vitamina B₆ (Tabela 1), e segundo estudos em ratos, que utilizaram suplementação com PN em doses similares às do presente trabalho (NWEZE *et al.*, 2012; KOBAYASHI *et al.*, 2015). A PN foi preparada diariamente, com base no peso diário dos animais e dissolvida em solução salina a 0,9%, em

seguida foi administrada em volumes de 0,5ml na primeira semana e 1ml na segunda e terceira semanas de vida. O desmame ocorreu aos 21 dias de vida. Os pesos corporais foram aferidos com auxílio de uma balança eletrônica ([®]Filizola - capacidade de 3,0 kg e escala em divisão de 0,5 g). Os animais tiveram os pesos registrados diariamente durante o período de tratamento e no P34, P48 e P62. Quando atingiram a idade entre P60 e P70 dias todos os grupos passaram pela avaliação comportamental e, posteriormente, foi realizado o registro da DAC (P71-P80), como ilustrado abaixo na Figura 4.

Figura 4 - Diagrama temporal dos procedimentos experimentais



5.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL: LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O labirinto em cruz elevado é um teste comportamental utilizado para avaliar comportamentos sugestivos de ansiedade. Quando os animais atingiram 60-70 dias de vida foram colocados em um aparato elevado (55 cm acima do chão) em forma de cruz com dois braços abertos (sem proteção lateral) e dois braços fechados (com proteção lateral), como mostra a Figura 5. Cada braço do labirinto mede 49 cm de comprimento x 10 cm de largura.

Após aclimação com a sala de experimentos (mínimo de 30 min), o animal foi posicionado no quadrado central do labirinto (10 cm x 10 cm) com a cabeça voltada para um braço aberto. O procedimento foi realizado sempre entre as 8:00 h e 10:00 h. Cada rato explorou livremente o aparato por 5 minutos. Após cada teste, os braços e a plataforma central eram limpos com uma solução de etanol 70% (dissolvido em água destilada).

Figura 5 - Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: Autor (GONDIM-SILVA, 2019)

À esquerda, uma vista de cima, mostrando os 4 braços, perpendiculares dois a dois. À direita, em maior ampliação, vê-se um rato saindo de um braço fechado e olhando em direção a um braço aberto do LCE.

Uma câmera de vídeo instalada no teto da sala de testes registrou a atividade comportamental dos animais. Os vídeos armazenados foram analisados posteriormente pelo programa ANY-MAZE® (versão 4.99m). Os seguintes parâmetros foram avaliados como indicadores comportamentais: número de bolos fecais expelidos, frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, distância total percorrida e tempo total de imobilidade.

5.3 REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

O registro da DAC ocorreu quando os animais atingiram a idade de 71 a 80 dias. No dia do registro, os animais foram anestesiados, intraperitonealmente, com uma solução de 1g/kg de Uretana adicionada de 40mg/kg de Cloralose na dose de 10ml/kg de peso corporal. O animal foi colocado em decúbito ventral sobre um aquecedor elétrico regulável para monitoramento da temperatura retal que foi mantida em $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o registro. A cabeça do animal foi fixada a um aparelho estereotáxico (David Kopf, USA); em seguida foi aberta a pele da cabeça ao nível da linha média e foi exposta a calota craniana, seguindo-se a trepanação de três orifícios na porção direita do crânio. Os orifícios foram alinhados na direção antero-posterior, paralelos à linha média do crânio e tinham um diâmetro de 2 a 4 mm. O

primeiro orifício, situado no osso frontal, foi utilizado para estimulação e deflagração da DAC que, ao se propagar, era registrada por eletrodos colocados nos outros dois orifícios, localizados no osso parietal. A duração média do registro foi de 4 horas, em cada animal. A deflagração da DAC ocorreu a cada 20 minutos por meio da aplicação no orifício frontal, por 1 minuto, de uma pelota de algodão (1-2 mm de diâmetro) embebida em KCl a 2% (aproximadamente 270 mMol/L).

A DAC foi registrada em dois pontos da superfície cortical parietal, através de eletrodos impolarizáveis do tipo “Ag-AgCl”. Os eletrodos, de registro da DAC e de referência comum localizado no osso nasal, estavam conectados a um sistema digital (EMG system, São Paulo, Brasil) que possibilita a visualização do registro da variação lenta de voltagem (VLV) e permite o acompanhamento do fenômeno em um monitor, e o armazenamento dos dados no computador. Os eletrodos consistem de pipetas de plástico em forma de cone (5 cm de comprimento, 5 mm de diâmetro na abertura superior e 0,5 mm de diâmetro interno na ponta) preenchidas com solução de Ringer solidificada com adição de ágar a 0,5%. As pipetas são fixadas entre si e com distância já conhecida entre as suas pontas (variando entre 4 e 6 mm).

A partir do registro da DAC pelo programa Windaq (versão 2.94) foi calculada a velocidade de propagação da DAC com base no tempo gasto pelo fenômeno para percorrer a distância entre os dois eletrodos registradores, posicionados suavemente sobre a dura-máter. Após o término da sessão de registro, o animal foi sacrificado por administração de dose excessiva de anestésico que induziu a parada cardiorrespiratória.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Através do programa “Sigmastat”, versão 3.5, as diferenças inter-grupos foram analisadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida, quando necessário, pelo teste *post hoc* “Holm Sidak”. As diferenças foram consideradas como significantes quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 PESOS CORPORAIS

Os animais controles e tratados com PN mantiveram o crescimento ponderal semelhante (Gráfico 1). As médias dos pesos foram obtidas ao longo do período de tratamento e nos dias 34, 48 e 62. Não foram notadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Igualmente, não foram observadas alterações sugestivas de toxicidade, relacionadas ao tratamento, tais como dificuldade de deambulação e sinais macroscópicos de neuropatia periférica, nos animais que receberam diferentes doses de PN (1, 5 e 10mg/kg de peso corporal) durante o período de desenvolvimento cerebral.

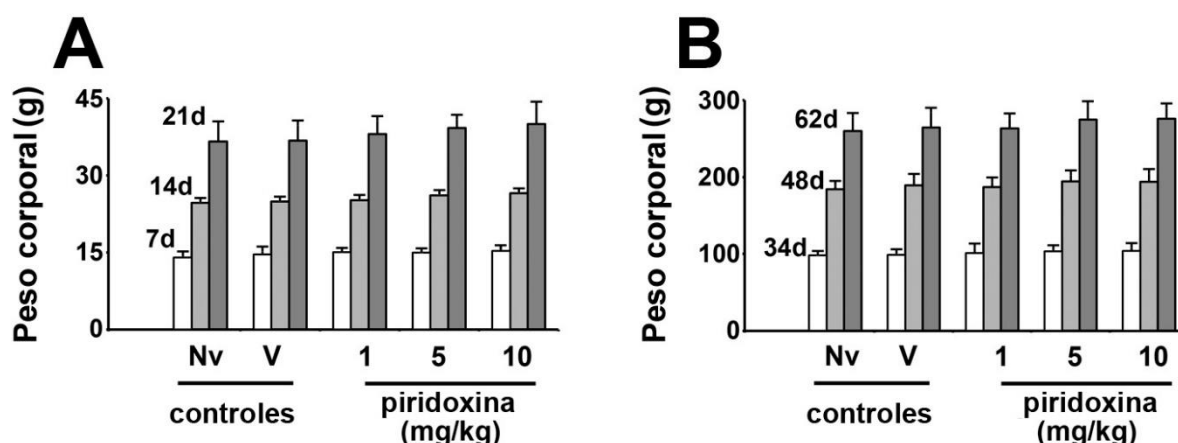


Gráfico 1 - Pesos corporais de ratos controles (Naïve e Veículo) e tratados com PN (1, 5 e 10mg/kg/dia). Parte A representa os dias pós-natais 7, 14, 21 de tratamento e a parte B, o peso dos grupos na fase jovem-adulta dias 34, 48 e 62. Os dados acima são as médias $\pm$ desvios-padrão. O tratamento com piridoxina não influenciou o peso corporal. O teste estatístico não indicou diferenças significativas entre os grupos estudados ($p > 0,05$).

6.2 TESTE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Os animais suplementados com PN no período crítico de desenvolvimento não apresentaram mudanças comportamentais (irritabilidade, agitação, agressividade) durante ou após o tratamento. O Gráfico 2 apresenta os parâmetros avaliados no teste do labirinto em cruz elevado, que indicou comportamentos sugestivos de ansiedade nos grupos tratados com a PN. Embora a ANOVA não tenha mostrado diferenças significativas entre os grupos, é possível notar uma

tendência não significativa de comportamentos ansiogênicos (menor número de entradas e tempo nos braços abertos), com efeito dependente da dose, dos animais que receberam a PN durante o período crítico de desenvolvimento.

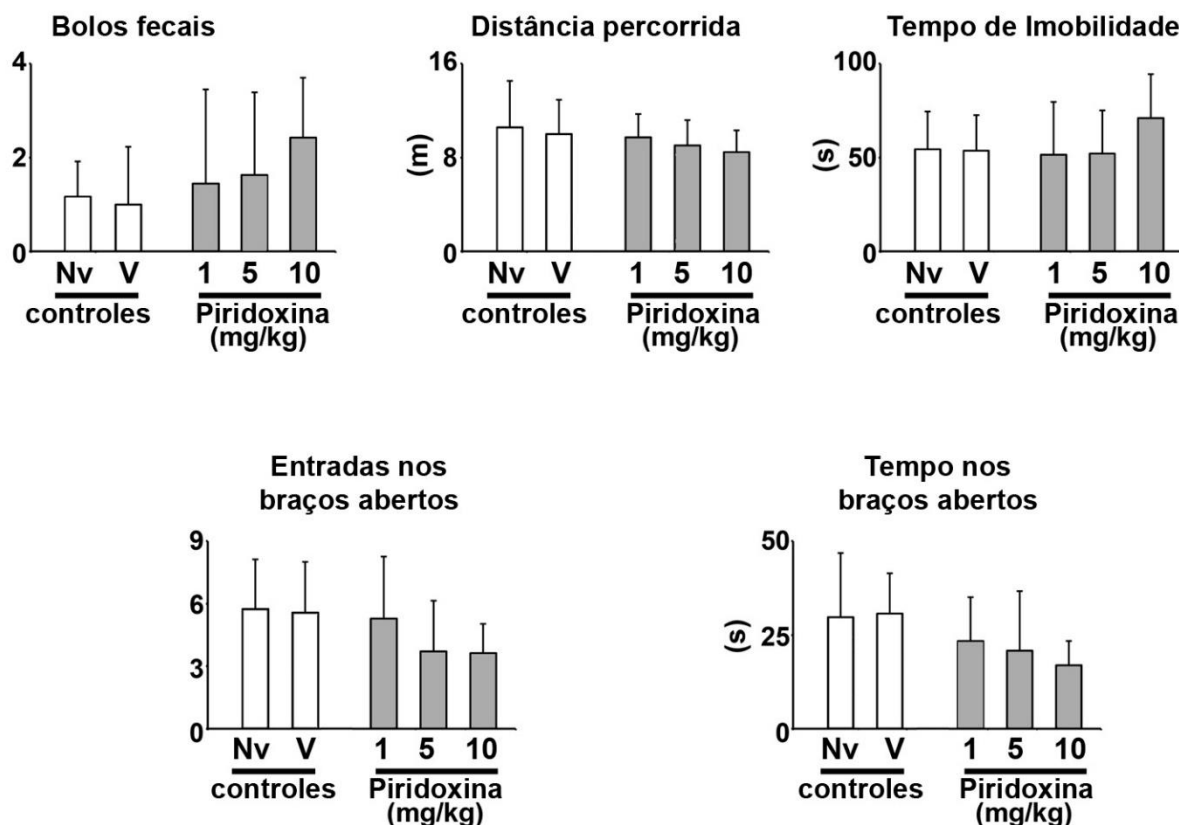


Gráfico 2 - LCE em ratos com 60 a 70 dias de idade. Os dados acima representam as médias ± desvios-padrão. Os testes estatísticos não indicaram valores significativamente diferentes entre os grupos controles e tratados com PN ($p > 0,05$).

6.3 REGISTRO DA DAC

Os registros eletrofisiológicos típicos da DAC, em cinco animais, representativos dos cinco grupos deste estudo (variação lenta do potencial “DC” [*“direct current”*]), estão representados na Figura 6. Conforme vastamente demonstrado em nosso laboratório (VITOR-DE-LIMA *et al.*, 2017; CHAGAS *et al.*, 2018; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2018), a estimulação por 1 minuto com KCl a 2% em um ponto do córtex frontal direito provocou uma onda única que se propagou sem interrupção e foi registrada pelos dois eletrodos localizados na superfície do

córtex parietal. Durante a sessão de registro de 4 horas, o aparecimento da variação lenta de potencial após a aplicação do KCl confirmou a presença da DAC. As alterações eletroencefalográficas causadas pela DAC, após alguns minutos se recuperaram. Um intervalo de 20 minutos foi mantido entre as estimulações posteriores com KCl.

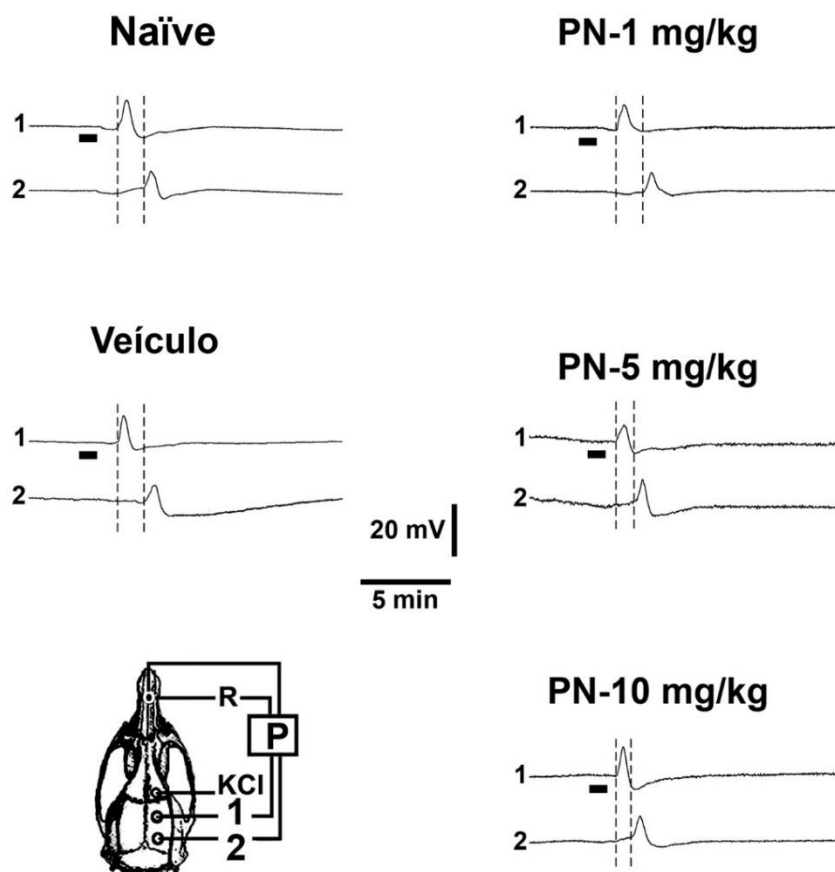


Figura 6 - Registros eletrofisiológicos (variações lentas de potencial; P) da DAC representativos dos cinco grupos de tratamento. A barra escura da escala vertical indica 20 mV para P (negativo para cima). A barra da escala horizontal indica 5 minutos. As linhas tracejadas verticais indicam a latência para a onda de DAC percorrer a distância entre os 2 eletrodos registradores. Nos grupos tratados com piridoxina essa latência foi menor quando comparados com os grupos controle ($PN10 < PN5 < PN1 = \text{Controles}$).

6.4 PARÂMETROS DA DAC

A velocidade da DAC (média $\pm$ desvio-padrão em mm/min) nos grupos controles naïve e salina foram $3,38 \pm 0,05$ e $3,38 \pm 0,11$ mm/min, respectivamente. Nos grupos tratados com PN, as velocidades de propagação da DAC eram maiores (PN1, $3,51 \pm 0,15$; PN5, $3,91 \pm 0,12$ e PN10, $4,82 \pm 0,24$ mm/min).

A ANOVA indicou diferenças na velocidade de propagação entre os grupos tratados com PN (Gráfico 3). Comparações *post-hoc* mostraram diferenças significativas dos grupos PN5 e PN10 mg/kg em comparação com os animais controles (naïve e salina) e o grupo PN1 mg/kg ($p \leq 0,05$).

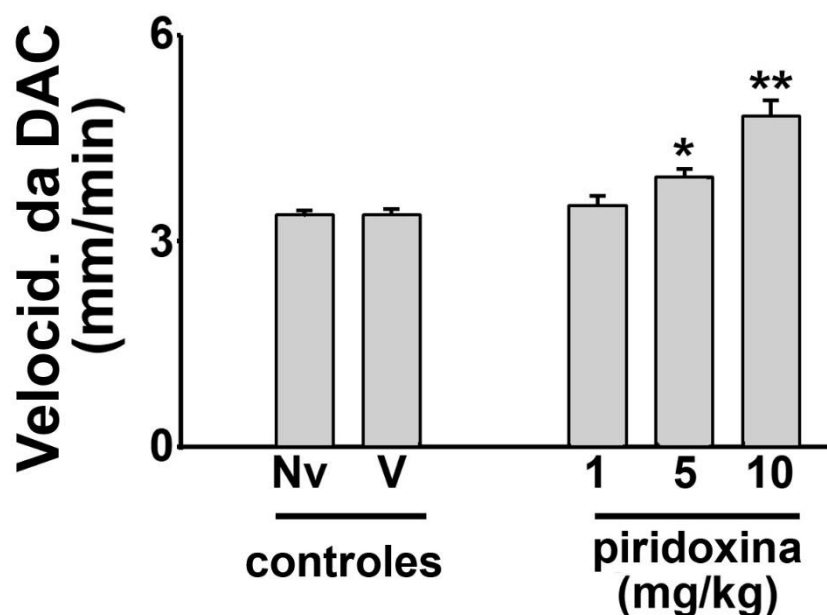


Gráfico 3 - Velocidades da DAC em ratos com 71 a 80 dias de idade. Os dados acima são as médias $\pm$ desvios-padrão. * = significativamente diferente dos 2 grupos controle; ** = significativamente diferente de todos os outros grupos ($p \leq 0,05$; ANOVA seguida do teste de Holm-Sidak).

As durações e amplitudes da variação lenta de potencial negativo, que é marca registrada da DAC, são mostradas no Gráfico 4. A média de duração nos grupos controles (naïve e veículo) foi de $65,7 \pm 6,6$ e $65,4 \pm 7,3$ segundos. Os grupos que receberam a PN tiveram durações menores (PN1, $61,7 \pm 4,5$; PN5, $55,7 \pm 6,0$ e PN10, $51,1 \pm 6,4$ segundos) comparados aos grupos controles.

A amplitude média e desvio padrão dos grupos controles foram de $6,9 \pm 2,2$ mV e $6,8 \pm 1,7$ mV (naïve e veículo). Os animais suplementados com PN tiveram amplitudes maiores (PN1, $8,3 \pm 1,7$ mV; PN5, $9,6 \pm 2,4$ mV e PN10, $9,9 \pm 2,4$ mV). O teste estatístico mostrou diferenças significativas em ambos os parâmetros (duração e amplitude) para os grupos PN5 e PN10 mg/kg ($p \leq 0,05$).

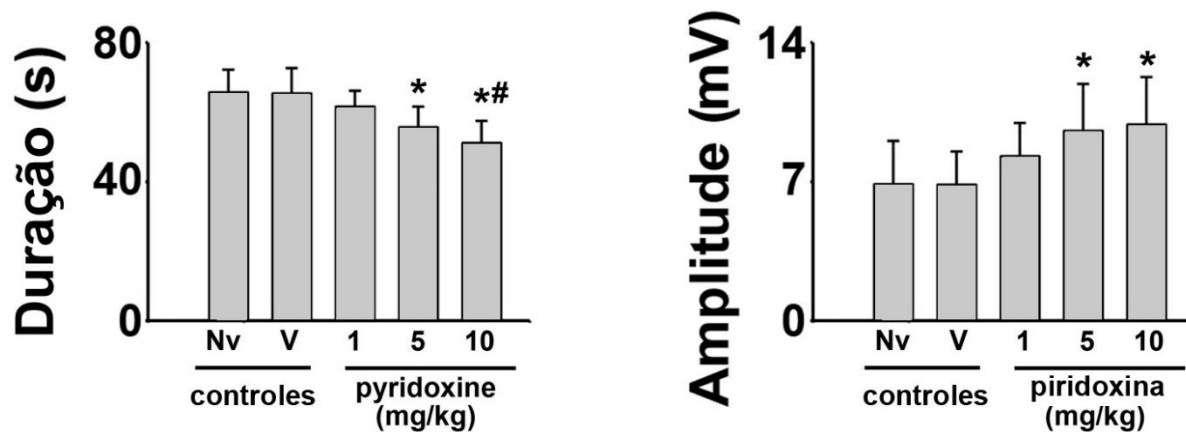


Gráfico 4 - Durações e amplitudes da DAC em ratos com 71 a 80 dias de idade. Os dados acima são as médias $\pm$ desvios-padrão. *= significativamente diferente dos 2 grupos controle; # = significativamente diferente em comparação com o grupo 1mg/kg, ($p \leq 0,05$; ANOVA seguida do teste de Holm-Sidak).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo deixa claro que alterações observadas nos parâmetros eletrofisiológicos (velocidade, amplitude e duração) da DAC tiveram efeitos em longo prazo. Como se sabe, a DAC é um fenômeno reconhecido por atuar na atividade elétrica cortical após injúrias (KRAMER *et al.*, 2016). Nos ratos suplementados com PN, o efeito se fez de modo dose-dependente. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento crônico com PN, via gavagem, aumentou a velocidade de propagação da DAC e a amplitude da sua onda negativa de variação lenta de potencial, reduzindo a sua duração. As alterações observadas não têm relação com o estresse pelo uso da sonda, pois o grupo que recebeu apenas solução salina apresentou velocidade semelhante ao grupo ingênuo (não tratado).

O tratamento com PN não alterou o crescimento ponderal. Os pesos dos animais tratados foram semelhantes aos grupos controles. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Sullivan Jr *et al.* (2017), no qual as doses de 50, 100 e 200 mg/kg/dia de dihidroclorato de piridoxamina via intraperitoneal não causaram modificações no peso dos animais e no sistema nervoso. Entretanto doses maiores descritas por Perry *et al.* (2004), causaram a redução de 20% do peso corporal, após duas semanas de injeções intraperitoneais de PN (400 mg/kg).

Nos animais tratados com PN não foram percebidas mudanças comportamentais (irritabilidade, agitação, agressividade) durante ou após o tratamento. Os resultados dos testes no LCE indicaram apenas uma tendência de comportamentos ansiogênicos, mas que não atingiu significância estatística. Abraham *et al.* (2010), em estudos comportamentais utilizando o LCE, de forma similar a este estudo mostraram, em ratos tornados diabéticos pela estreptozotocina, que as alterações no sistema de transmissão serotoninérgica modulam diretamente a suscetibilidade ao estresse tornando os animais ansiosos e com perfil depressivo. Esses comportamentos eram corrigidos pela terapia com PN (100 mg/kg), seja quando administrada isolada ou em combinação com insulina e *Aegle marmelose*, desempenhando assim um papel funcional através da regulação dos receptores serotoninérgicos no hipocampo. Contrariamente, aplicações intraperitoneais de doses tóxicas (400mg/kg/dia) de PN em ratos provocaram alterações comportamentais evidenciadas por aumento na instabilidade postural, vocalização e

agressividade com os animais que compartilhavam a mesma gaiola (PERRY *et al.*, 2004).

No presente trabalho, a suplementação com PN foi realizada nos animais durante o período crítico de desenvolvimento cerebral. Conforme observado através dos experimentos realizados, pode-se sugerir que os efeitos eletrofisiológicos da PN sobre o cérebro em desenvolvimento tenham sido mantidos até a fase adulta. Como o teste de ansiedade não revelou diferenças significativas de comportamentos ansiogênicos nos animais tratados, pode-se postular um efeito neuroprotetor da PN (doses <10 mg/kg/dia) sobre o desenvolvimento comportamental de ratos que precisa ser melhor avaliado. Com relação ao desempenho cognitivo a PN melhora significativamente o reconhecimento de novos objetos e a neurogênese hipocampal em ratos adultos jovens e idosos (YOO *et al.*, 2011), reduzindo a expressão de CRIP1a no hipocampo (JUNG *et al.*, 2017). Em humanos, os dados da literatura apresentam controvérsia. De acordo com Jannusch *et al.* (2017), estudos anteriores em populações de idosos observaram os efeitos da vitamina B₆ sobre a cognição e identificaram que a suplementação foi capaz de preservar a substância cinzenta de pacientes com comprometimento cognitivo leve e Doença de Alzheimer. No entanto, conforme metanálises, a suplementação de vitaminas do complexo B (ácido fólico, B₆ e B₁₂) em pessoas idosas não teria impacto positivo sobre a função cognitiva global ou no envelhecimento cognitivo (FORBES *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017).

Estudos têm relacionado a suplementação de PN com sintomas comportamentais. Segundo Yarlagadda e Clayton (2007), suplementos vitamínicos de PN, em doses equivalentes ou superiores as recomendações conhecidas, manteriam os níveis adequados de cofatores podendo prevenir, retardar ou atenuar o início ou a gravidade de sintomas psiquiátricos. A suplementação em altas doses de PN, isolada ou combinada com sais de magnésio, são utilizadas desde a década de 1950 de modo experimental no tratamento do autismo (BENDER, 2011). Em conformidade com o exposto e após pesquisas, Adams (2015) desenvolveu um suplemento vitamínico/mineral, chamado ANRC Essentials, que é distribuído para indivíduos com autismo e contém mais de 30 ingredientes em doses acima da dose diária recomendada de vitaminas do complexo B, com destaque para PN (20mg), biotina, folato, C, D e K, que tem efeitos significativos na melhoria de muitos problemas nutricionais e metabólicos.

Em mulheres são utilizadas terapias com suplementação de vitamina B₆ durante a fase menstrual para alívio dos sintomas da TPM (enxaqueca e alterações de humor) desencadeados pela diminuição dos níveis de estrogênio. A suplementação diária, a longo prazo e em altas doses, com ácido fólico (2,5 mg/dia), vitamina B₆ (50 mg/dia) e vitamina B₁₂ (1 mg/dia) não reduziu o risco global de depressão em mulheres idosas (OKEREKE *et al.*, 2015). Segundo Miya Shaik *et al.* (2014), a PLP em altas concentrações intracelulares pode reduzir os efeitos biológicos do estrogênio através da diminuição significativa na resposta de transcrição do gene quando o estrogênio se liga ao seu receptor. A relação entre as enxaquecas menstruais e nutrientes relacionados à sua modulação é uma interessante área de investigação, tendo em vista que o estrogênio é capaz de diminuir a resposta contrátil vascular cerebral à serotonina, através da inibição do influxo de cálcio por meio de canais de cálcio dependentes de voltagem (MIYA SHAIK *et al.*, 2014).

O nível de vitamina B₆ no SN contribui fundamentalmente para o equilíbrio entre os seus estados excitatórios e inibitórios (DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2015). Embora os níveis cerebrais de PN não tenham sido monitorados no presente estudo, consideramos plausível a hipótese de que o tratamento crônico, realizado durante 21 dias, pode ter causado um aumento das concentrações de piridoxina, em longo prazo, em algumas áreas do cérebro. A suplementação com PN associada ao ácido fólico em portadores de enxaqueca com aura, doença com mecanismos similares à DAC, alterou as características dos ataques de enxaqueca (ASKARI *et al.*, 2017). Esses autores atribuíram à ingestão de PN (80mg/d) e do ácido fólico (5mg/d) a diminuição significativa na gravidade da dor de cabeça, frequência de ataque, e sua duração. A ação neuroprotetora da PN é fundamentada pela sua função como cofator para diversos neurotransmissores, a exemplo da síntese do GABA e serotonina. A piridoxina age sobre os níveis das enzimas ácido glutâmico descarboxilase 65 (GAD) e L- aminoácido aromático descarboxilase (5-HTP descarboxilase), e na forma PLP parece reduzir o glutamato intracelular (DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2015).

Considerando que em roedores os processos de neurogênese, gliogênese, sinaptogênese e mielinização iniciam no período embrionário, por volta do dia 10, e se estende até a terceira semana pós-natal (KHALAF-NAZZAL e FRANCIS, 2013),

acreditamos que, neste estudo, após a suplementação com PN ocorreram mudanças no desenvolvimento cerebral dos ratos *Wistar* e que estas têm relação direta com a modulação da propagação da DAC. Esse efeito facilitador da PN sobre a DAC é similar ao encontrado por Vitor-de-Lima *et al.* (2017), em estudo eletrofisiológico com administração neonatal em ratos de glutamato monossódico por gavagem. Esse tratamento produziu alterações na atividade neural facilitando a propagação da DAC. A partir de um estímulo nocivo ou patológico, o glutamato, quando em excesso, ativa canais de cálcio e sódio, com destaque para o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), criando entradas para o influxo de grandes cátions, e consequentemente a perda do potencial da membrana neuronal (KRAMER *et al.*, 2016).

De acordo com Yang e Wang (2009), a piridoxina tem efeitos protetores contra a excitotoxicidade induzida pelos altos níveis de glutamato a nível pré-sináptico decorrentes de processos neuropatológicos agudos (acidente vascular cerebral, convulsões epiléticas, lesões traumáticas no cérebro e na medula espinhal) e desordens cerebrais crônicas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, e esclerose lateral amiotrófica). Os referidos autores avaliaram com um modelo de sinaptossomas o mecanismo de inibição da liberação do glutamato induzida por 4-aminopiridina (4-AP) atribuída ao tratamento com PN. Eles demonstraram que a liberação do glutamato foi inibida através da redução do influxo de Ca^{2+} , que também foi observado no influxo de Ca^{2+} induzido pelo KCl (YANG e WANG, 2009). A atividade neuroprotetora da piridoxina é significativa, Dakshinamurti e Dakshinamurti (2015) corroboram a hipótese acima descrita, sobre o efeito inibitório da PLP no transporte de cálcio e afirmam que esse composto tem ação em ambos os canais agindo como um antagonista do canal de Ca^{2+} -tipo-L mediado por voltagem, e do influxo de Ca^{2+} intracelular mediado pelo receptor purinérgico via ATP.

Com base nas análises eletrofisiológicas realizadas observamos mudanças nos parâmetros (velocidade, amplitude e duração) da DAC. Logo, podemos supor que o efeito neuroprotetor do tratamento com a PN, associado a algumas patologias cerebrais, não ocorreu na idade adulta com relação ao fenômeno da DAC. Esses achados nos sugerem que o mecanismo de ação da piridoxina sobre os fenômenos cerebrais dependentes de excitabilidade pode ser proveniente de outras vias. A vitamina B₆ e seus vitâmeros contêm propriedades antioxidantes similares às da

vitamina C e dos tocoferóis, especialmente a PN que apresenta um elevado nível de neutralização de radicais hidroxila (EHRENSHAFT *et al.*, 1999; DAKSHINAMURTI e DAKSHINAMURTI, 2015). Estudo *in vitro* mostrou que a suplementação de PN e PM inibiu, em células vermelhas, a produção de radicais superóxidos, a peroxidação lipídica e glicosilação de proteínas e aumento da atividade (Na^+ e K^+) -ATPase induzida pela hiperglicemia (EHRENSHAFT *et al.*, 1999; JAIN e LIM, 2001).

A piridoxina é um nutriente neuroprotetor, pois participa da síntese do principal neurotransmissor inibitório, o GABA. No entanto, em contraposição a essa ideia, postulamos que a administração inicial da PN em doses elevadas (5 e 10 mg/kg/d) provocou, no cérebro em desenvolvimento, um efeito pró-oxidante duradouro com relação à propagação da DAC. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pode resultar na deflagração da DAC *in vivo* (EL-BACHÁ *et al.*, 1998). Nossos dados estão em consonância com os de Mendes-da-Silva e colaboradores (2014), que após administrar altas doses de ácido ascórbico (60 mg/kg/dia e 120 mg/kg/dia) em ratos nutridos e desnutridos observou um efeito pró-oxidante expresso por uma maior velocidade da DAC e pelos níveis aumentados de malondialdeído em comparação com os grupos controles correspondentes. No presente estudo, as doses de PN não promoveram sinais de toxicidade, não observamos dificuldade de deambulação e nem sinais macroscópicos de neuropatia periférica nos animais. No entanto, as nossas análises eletrofisiológicas suportam nossa sugestão de que a PN foi capaz de causar alterações no sistema nervoso, até a fase adulta.

Concentrações elevadas da vitamina B₆ aplicadas no cérebro de ratos desencadeiam crises convulsivas (VEREŠOVÁ *et al.*, 1998), que podem ser acompanhadas de alterações eletrofisiológicas e mecanismos similares ao fenômeno da DAC (KRAMER *et al.*, 2016). De acordo com Ebadi (1981), as concentrações da PLP em estado de equilíbrio são essenciais para a manutenção da integridade da atividade elétrica cerebral e podem ser modificadas em condições de deficiência ou excesso de vitamina B₆. Tendo em vista que a PLP controla a atividade da glutamato descarboxilase (GAD), e esta através da síntese de GABA influencia excitabilidade do SNC, este autor investigou seus efeitos sobre o neurotransmissor GABA após injeção intra-cerebroventricular de PLP (0,125 µmol/rato), que desencadeou ataques epiléticos. Doses maiores (25 µmol/rato)

produziram convulsões mais rápidas e longas, enquanto as doses menores e os derivados da vitamina B₆ (PN, PNP, PM, PMP e ácido piridóxico) não causaram convulsões (EBADI, 1981). Os mecanismos pelos quais a PLP induziu as convulsões podem resultar de alterações na síntese e metabolismo do GABA, captação pelos terminais nervosos e ligação do GABA aos seus sítios de reconhecimento (COBURN, 2015). Estudo *in vitro* indicou que a toxicidade da PN é causada pela competição com a PLP resultando na inibição de enzimas dependentes da vitamina B₆ (VROLIJK *et al.*, 2017).

A suplementação com PN é utilizada no tratamento de convulsões infantis para atenuar crises em casos de epilepsia induzida por isoniazida, mutação no gene *ALDH7A1* ou epilepsia dependente de piridoxina (PDE), condição esta que representa um distúrbio neurometabólico raro com herança autossômica recessiva caracterizado por uma combinação de vários tipos de convulsões. Essas doenças não respondem a terapia anticonvulsivante convencional, e o tratamento consiste em monoterapia com PN, principal cofator para a conversão enzimática do neurotransmissor glutamato em GABA (HAIDAR *et al.*, 2018).

De acordo com Prado e Dewey (2014), os efeitos da suplementação de nutrientes sobre o desenvolvimento cerebral dependem do estado nutricional inicial. Acreditamos que os animais do presente estudo possuíam altos níveis da vitamina B₆, pois além de terem recebido suplementação de PN via gavagem, suas mães recebiam uma dieta-padrão com quantidades adequadas desse nutriente, conforme preconizado pelo American Institute of Nutrition (AIN-1997). Estudos observacionais demonstraram associações entre o desenvolvimento infantil e a ingestão materna de vitamina B₆ durante a gravidez e a lactação (MCCULLOUGH *et al.*, 2016, ALMEIDA *et al.*, 2016).

A utilização de suplementos com altas dosagens de PN prontamente acessíveis à população pode oferecer riscos à saúde, principalmente em crianças. A elevação dos níveis sanguíneos de B₆ pela ingestão de suplementos em altas doses (>50 mg/dia) e de uso prolongado pode causar neuropatias e alterações no funcionamento do SN, apesar de na literatura também existirem casos em que os pacientes submetidos a suplementação crônica de vitamina B₆ não desenvolveram neuropatia (VAN HUNSEL *et al.*, 2018). No presente estudo, administramos três diferentes doses de PN, por via oral, sendo sua absorção pelo trato digestivo mais

fisiológica. Nesse aspecto, este trabalho difere dos estudos já descritos na literatura, que utilizaram doses únicas bem maiores e outras vias de administração. Em humanos, uma revisão recente sobre estudos com PN não encontrou nenhum relato da administração de PN diretamente em neonatos (FALSAPERLA *et al.*, 2017).

Os resultados da literatura ilustram a importância de investigações que permitam a compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem os nutrientes, seus efeitos sobre a neurogênese e a plasticidade cerebral para uma adequada aplicação, seja em condições de saúde ou doença (PARLETTA *et al.*, 2013). Assim, consideramos que uma nutrição adequada é indispensável para a formação e desenvolvimento do cérebro durante o período crítico, e que a suplementação nutricional pode afetar de modo positivo também o desenvolvimento das habilidades cognitivas e motoras ao longo da infância e na idade adulta (PRADO e DEWEY, 2014). A suplementação com PN é considerada benéfica, pois é capaz de tratar vários distúrbios do sistema nervoso periférico. Contudo, a ingestão excessiva de PN pode ter efeitos tóxicos que dependem tanto da dose como da duração da ingestão (GHAVANINI e KIMPINSKI, 2014).

8 CONCLUSÃO

Considerando que o tratamento com piridoxina facilitou a DAC, sugerimos que essa vitamina, nas doses em que foi utilizada e quando administrada por longo tempo durante a fase de desenvolvimento cerebral, poderia ter uma ação pró-oxidante, à semelhança com o que observamos em ratos tratados com doses elevadas de vitamina C (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014). Não sabemos se, e como, esse efeito pode ser extrapolado do rato para o cérebro humano. Recentemente, tem sido descritas evidências, em seres humanos, em favor da nossa sugestão (VAN HUNSEL *et al.*, 2018). Essas evidências demonstram a necessidade de cautela com relação às doses de PN usadas para fins terapêuticos em organismos em desenvolvimento. Inexistem dados na literatura sobre a relação da PN e a DAC, o que torna o presente trabalho pioneiro. É importante que mais estudos sejam realizados para melhor entendimento da relação entre a vitamina B₆ e os processos de neurodesenvolvimento, bem como os processos associados ao bom funcionamento eletrofisiológico do cérebro.

8.1 PERSPECTIVAS

Para a continuação desta linha de pesquisa, sugere-se, como perspectivas:

- 1- Analisar outros parâmetros comportamentais envolvendo aprendizagem e memória;
- 2- Avaliar a função antioxidante da piridoxina;
- 3- Avaliar os correlatos estruturais do tratamento com piridoxina, analisando o padrão histológico/imunohistoquímico cerebral.

REFERÊNCIAS

ABADIE-GUEDES, R.; SANTOS S.D.; CAHÚ T.B.; GUEDES R.C.A.; BEZERRA R.S. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, n. 8, p. 1417-1421, 2008.

ABRAHAM, P. M.; KURUVILLA, K. P.; MATHEW, J.; MALAT, A.; JOY, S.; PAULOSE, C. S. Alterations in hippocampal serotonergic and INSR function in streptozotocin induced diabetic rats exposed to stress: neuroprotective role of pyridoxine and Aegle marmelose. **Journal of biomedical science**, v. 17, n. 1, p. 78, 2010.

ACCIOLY, N. E.; BENEVIDES, R. D. D. L.; DA COSTA, B.L.S.A.; GUEDES, R. C. A. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 405-410, 2012.

ACCIOLY, N. E.; GUEDES, R. C. A. Neonatal treatment with ovarian hormones and suckling among distinct litter sizes: Differential effects on recognition memory and spreading depression at adulthood. **Nutritional neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 174-184, 2017.

ADAMS, J. Vitamin/mineral supplements for children and adults with autism. **Vitamins & Minerals**, v. 3, n. 127, p. 2376-1318, 2015.

ALBERSEN, M.; BOSMA, M.; LUYKX, J.J.; JANS, J.J.M; BAKKER, S.C.; STRENGMAN, E.; BORGDORFF, P.J.; KEIJZERS, P.J.M.; VAN DONGEN E.P.; BRUINS, P.; DE SAIN-VAN DER VELDEN, M.G.; VISSER, G.; KNOERS, N.V.; OPHOFF, R.A.; VERHOEVEN-DUIF, N.M. Vitamin B-6 vitamers in human plasma and cerebrospinal fluid-. **The American journal of clinical nutrition**, v. 100, n. 2, p. 587-592, 2014.

ALMEIDA, M. R.; MABASA, L.; CRANE, C.; PARK, C.S.; VENÂNCIO, V.P. et al. Maternal vitamin B6 deficient or supplemented diets on expression of genes related to GABAergic, serotonergic, or glutamatergic pathways in hippocampus of rat dams and their offspring. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 7, p. 1615-1624, 2016.

AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; MAIA, L.M.S.S.; GERMANO, P.C.P.S.; NEGRÃO, Y.D.S.; GUEDES, R.C.A. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European journal of pharmacology**, v. 706, n. 1-3, p. 70-75, 2013.

AMÂNCIO-DOS-SANTOS, Â.; PINHEIRO, P. C. F.; LIMA, D. S. C.; OZIAS, M. G.; OLIVEIRA, M. B.; GUIMARÃES, N. X.; GUEDES, R. C. A. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental neurology**, v. 200, n. 2, p. 275-282, 2006.

AMARAL, A. P. B.; BARBOSA, M.S.S., SOUZA, V.C., RAMOS, I.L.T., GUEDES, R.C.A. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. **Experimental neurology**, v. 219, n. 2, p. 492-498, 2009.

ANDALUZ, N.; HARTINGS, J.A.; DREIER, J.P.; ZUCCARELLO, M. Depressão alastrante cortical e seu possível papel na lesão neuronal subsequente à hemorragia subaracnóide aneurismática. **Jornal brasileiro de neurocirurgia**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 2011.

ASKARI, G.; M.; MOZAFFARI-KHOSRAVI, H.; REZAIE, M.; BAGHERI-BIDAKHAVIDI, M.; SADEGHI, O. The effects of folic acid and pyridoxine supplementation on characteristics of migraine attacks in migraine patients with aura: A double-blind, randomized placebo-controlled, clinical trial. **Nutrition**, v. 38, p. 74-79, 2017.

BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A.A.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; GUEDES, R.C. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Experimental gerontology**, v.47, n.6, p.452-457, 2012.

BENDER, D. A. Vitamin B6: beyond adequacy. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 29-39, 2011.

BERGER, A. R.; SCHAUMBURG, H.H.; SCHROEDER, C.; APFEL, S.; REYNOLDS, H. Dose response, coasting, and differential fiber vulnerability in human toxic neuropathy: a prospective study of pyridoxine neurotoxicity. **Neurology**, v. 42, n. 7, p. 1367-1367, 1992.

BILODEAU, F. Effects of stimulants of the central nervous system on the pyridoxal phosphate content of the rat brain. **Journal of neurochemistry**, v. 12, n. 7, p. 671-678, 1965.

BORBA, J. M. C.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; DOS SANTOS, Â. A.; ANDRADE DA COSTA, B. L. D. S.; DA SILVA, R. P.; PASSOS, P. P.; GUEDES, R. C. A. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-

generation study. **Nutritional neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 144-150, 2010.

BOWLING, F. G. Pyridoxine supply in human development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 6, p. 611-618, 2011.

BÜYÜKOKUROGLU, M.E.; GEPIREMEN, A.; TASTESKIN; O.R.S. Pyridoxine may protect the cerebellar granular cells against glutamate-induced toxicity. **International journal for vitamin and nutrition research**, v.77, n.5, p.336-340, 2007.

CAVALCANTI, L. C.; SOARES, G. S. F.; DE CASTRO, C. B. L.; GUEDES, R. C. A.. EFEITO ELETROFISIOLÓGICO CEREBRAL DA LECTINA DA CANAVALLIA ENSIFORMIS (ConA): INTERAÇÃO COM O ÁCIDO ASCÓRBICO EM RATOS. **Revista Expressão Católica Saúde**, v. 3, n. 1, p. 28-34, 2018.

CHAGAS, C. L.; BENEVIDES, R. D. D. L.; BEZERRA, C. M.; ABADIE-GUEDES, R.; GUEDES, R. C.A. Ponderal, Behavioral, and Brain Electrophysiological Effects of Caffeine on the Immature Rat. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**, v. 8, n. 4, p. 153-161, 2018.

CLAYTON, P. T. B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 29, n. 2-3, p. 317-326, 2006.

COBURN, S. P. Vitamin B-6 metabolism and interactions with TNAP. In: (Ed.). **Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP)**: Springer, 2015. p.207-238.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, Â.; GUEDES, R. C. A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. **Neuroscience letters**, v.401, n.3, p.271-275, 2006.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; GUEDES, R. C. A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience letters**, v. 303, n.3, p.177-180, 2001.

DAKSHINAMURTI, K.; DAKSHINAMURTI, S. Neonatal epileptic encephalopathy: role of vitamin B-6 vitamers in diagnosis and therapy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.100, n.2, p. 505-506, 2014.

DAKSHINAMURTI, S.; DAKSHINAMURTI, K. Antihypertensive and neuroprotective actions of pyridoxine and its derivatives. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.93, n.12, p.1083-1090, 2015.

DALTON, K.; DALTON, M. J. T. Characteristics of pyridoxine overdose neuropathy syndrome. **Acta neurologica scandinavica**, v.76, n.1, p.8-11, 1987.

DE LIMA, D.S. C. ; FRANCISCO, E.S.; LIMA, C. B.;Guedes, R. C. A. Neonatal l-glutamine modulates anxiety-like behavior, cortical spreading depression, and microglial immunoreactivity: analysis in developing rats suckled on normal size- and large size litters. **Amino Acids**, v. 49, p. 337-346, 2016.

DI SALVO, M. L.; CONTESTABILE, R.; SAFO, M. K. Vitamin B6 salvage enzymes: mechanism, structure and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v.1814, n.11, p.1597-1608, 2011.

EBADI, M. Regulation and function of pyridoxal phosphate in CNS. **Neurochemistry international**, v.3, n.3-4, p.181, 1981.

EGGERSDORFER, M.; LAUDERT, D.; LÉTINOIS, U.; MCCLYMONT, T.; MEDLOCK, J.; NETSCHER, T.; BONRATH, W. One hundred years of vitamins-a success story of the natural sciences. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 52, p. 12960-12990, 2012.

EHRENSHAFT, M.; BILSKI, P.; LI, M. Y.; CHIGNELL, C. F.; DAUB, M. E. A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 16, p. 9374-9378, 1999.

EL-BACHÁ, R. D. S.; DE-LIMA-FILHO, J.; GUEDES, R. C.A. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photoactivated riboflavin. **Nutritional neuroscience**, v.1, n.3, p.205-212, 1998.

ERDMAN JR, J. W.; MACDONALD, I. A.; ZEISEL, S. H. **Present knowledge in nutrition**. 10th ed. John Wiley & Sons, 2012. p. 307-320.

FALSAPERLA, R.; SAPORITO, M.A.N.;DI STEFANO, V.; MAUCERI, L.; QUATTROCCHI, E.; MUSOLINO, A.; CORSELLO, G. Pyridoxine supplementation during pregnancy, lactation and the first months of life: A review of the literature. **Current Pediatric Research**, v. 21, n. 4, p. 613-619, 2017.

FARIAS-SANTOS, R. C.; LIRA, M.C.A.; PEREIRA, D.E.; SÁ, I.R.; PIMENTEL, M.R.F.; ARAÚJO, L.L.; GUEDES, R.C.A.. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. **Neuroscience letters**, v. 454, n. 3, p. 218-222, 2009.

FORBES, S. C.; HOLROYD-LEDUC, J. M.; POULIN, M. J.; HOGAN, D. B. Effect of nutrients, dietary supplements and vitamins on cognition: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Canadian Geriatrics Journal**, v. 18, n. 4, p. 231, 2015.

FRANCISCO, E. D. S.; GUEDES, R. C. A. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids**, v.47, n.11, p.2437-2445, 2015.

GERMANO, P. C. P. D. S.; SILVA, D.L.; SOARES, G.S.F.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 275-281, 2013.

GHAVANINI, A. A.; KIMPINSKI, K. Revisiting the evidence for neuropathy caused by pyridoxine deficiency and excess. **Journal of clinical neuromuscular disease**, v.16, n.1, p.25-31, 2014.

GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. **Brain Research Reviews**, v.38, n.1-2, p.33-60, 2001.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; MEDEIROS, M.C.; SILVA, A.T.; TEODÓSIO, N.R. Effect of dietary lithium on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 7, p. 923-925, 1989.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.; TEODÓSIO, N. Effect of aging on cortical spreading depression. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v.29, n.10, p.1407-1412, 1996.

GUEDES, R.C.A.; BARRETO, J. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.25, n.4, p.393-397, 1992.

GUEDES, R.C.A.; PEREIRA-DA-SILVA, M. Effect of pre-and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 10, p.

1123-1128, 1993.

GUEDES, R.C.A. Electrophysiological methods: application in nutritional neuroscience. In: H. Liebermann, R. Kanarek, C. Prasad (Eds.), **Nutritional Neurosciences: Overview of an Emerging Field**, New York: CRC Press, 2005. p. 39-54.

_____. Cortical spreading depression: a model for studying brain consequences of malnutrition. In: (Ed.). **Handbook of behavior, food and nutrition**: Springer, p.2343-2355, 2011.

GUEDES, R. C. A.; CAVALHEIRO, E. A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy research**, v.27, n.1, p.33-40, 1997.

GUEDES, R. C. A.; DE ARAÚJO, M. D. G. R.; VERÇOSA, T. C.; BION, F. M.; DE SÁ, A. L.; PEREIRA JR, A.; ABADIE-GUEDES, R. Evidence of an inverse correlation between serotonergic activity and spreading depression propagation in the rat cortex. **Brain research**, v. 1672, p. 29-34, 2017.

GUEDES, R. C. A.; DE OLIVEIRA, J. A. C.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, Â.; GARCÍA-CAIRASCO, N. Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). **Epilepsy research**, v. 83, n. 2-3, p. 207-214, 2009.

GUEDES, R. C. A.; DO CARMO, R. J. Influence of ionic disturbances produced by gastric washing on cortical spreading depression. **Experimental brain research**, v.39, n.3, p.341-349, 1980.

GUEDES, R. C. A.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; DE LIMA, K. R.; DE ALBUQUERQUE, J. D. M. S.; FRANCISCO, E. D. S. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutritional neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 142-146, 2013.

GUEDES, R. C. A.; VASCONCELOS, C. A. C. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: A dose-response study. **Neuroscience letters**, v. 442, n. 2, p. 118-122, 2008.

GUERRIERO, R. M.; PATEL, A. A.; WALSH, B.; BAUMER, F. M.; SHAH, A. S.; PETERS, J. M. et al. Systemic Manifestations in Pyridox (am) ine 5'-Phosphate Oxidase Deficiency. **Pediatric neurology**, v. 76, p. 47-53, 2017.

GYÖRGY, P. The history of vitamin B6. **The American journal of clinical nutrition**, v. 4, n. 4, p. 313-317, 1956.

HAIDAR, Z.; JALKH, N.; CORBANI, S.; FAWAZ, A.; CHOUERY, E.; MÉGARBANÉ, A. Atypical pyridoxine dependent epilepsy resulting from a new homozygous missense mutation, in ALDH7A1. **Seizure**, v. 57, p. 32-33, 2018.

HAMM, M. W.; MEHANSHO, H.; HENDERSON, L. M. Transport and metabolism of pyridoxamine and pyridoxamine phosphate in the small intestine of the rat. **The Journal of nutrition**, v. 109, n. 9, p. 1552-1559, 1979.

HAN, Q.; ROBINSON, H.; LI, J. Crystal structure of human kynurenine aminotransferase II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3567-73, 2008.

HANSEN, C. M.; LEKLEM, J. E.; MILLER, L. T. Vitamin B-6 status of women with a constant intake of vitamin B-6 changes with three levels of dietary protein. **The Journal of nutrition**, v. 126, n. 7, p. 1891-1901, 1996.

HUNT, A. D.; A.D.; STOKES, J.; MCCRORY, W.W.; STROUD, H.H. Pyridoxine dependency: report of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. **Pediatrics**, v. 13, n. 2, p. 140-145, 1954.

INSTITUTE OF MEDICINE (US) STANDING COMMITTEE ON THE SCIENTIFIC EVALUATION OF DIETARY REFERENCE INTAKES. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline**. National Academies Press (US), 1998.

ILJAZI, A.; AYATA, C.; ASHINA, M.; HOUGAARD, A. The Role of Endothelin in the Pathophysiology of Migraine—a Systematic Review. **Current pain and headache reports**, v. 22, n. 4, p. 27, 2018.

JAIN, S. K.; LIM, G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 3, p. 232-237, 2001.

JANNUSCH, K.; JOCKWITZ, C.; BIDMON, H. J.; MOEBUS, S.; AMUNTS, K.; CASPERS, S. A Complex Interplay of Vitamin B1 and B6 Metabolism with Cognition, Brain Structure, and Functional Connectivity in Older Adults. **Frontiers in neuroscience**, v. 11, p. 596, 2017.

JUNG, H. Y.; KIM, D. W.; NAM, S. M.; KIM, J. W.; CHUNG, J. Y.; WON, M. H. et al. Pyridoxine improves hippocampal cognitive function via increases of serotonin turnover and tyrosine hydroxylase, and its association with CB1 cannabinoid receptor-interacting protein and the CB1 cannabinoid receptor pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 12, p. 3142-3153, 2017.

KENNEDY, D. B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—A review. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 68, 2016.

KHALAF-NAZZAL, R.; FRANCIS, F. Hippocampal development—Old and new findings. **Neuroscience**, v. 248, p. 225-242, 2013.

KOBAYASHI, D.; YOSHIMURA, T.; JOHNO, A.; ISHIKAWA, M.; SASAKI, K.; WADA, K. Decrease in pyridoxal-5'-phosphate concentration and increase in pyridoxal concentration in rat plasma by 4'-O-methylpyridoxine administration. **Nutrition Research**, v. 35, n. 7, p. 637-642, 2015.

KRAEMER, K.; SEMBA, R. D.; EGGERSDORFER, M.; SCHAUMBERG, D. A. Introduction: the diverse and essential biological functions of vitamins. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 61, n. 3, p. 185-191, 2012.

KRAMER, D. R.; FUJII, T.; OHIORHENUAN, I.; LIU, C.Y. Cortical spreading depolarization: pathophysiology, implications, and future directions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 24, p. 22-27, 2016.

KULKANTRAKORN, K. Pyridoxine-induced sensory ataxic neuropathy and neuropathy: revisited. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 11, p. 1827-1830, 2014.

KUYPERS, N. J.; HOANE, M. R. Pyridoxine administration improves behavioral and anatomical outcome after unilateral contusion injury in the rat. **Journal of neurotrauma**, v. 27, n. 7, p. 1275-1282, 2010.

LAURITZEN, M.; STRONG, A. J. 'Spreading depression of Leão' and its emerging relevance to acute brain injury in humans. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 37, n. 5, p. 1553-1570, 2017.

LEÃO, A. A. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of neurophysiology**, v. 7, n. 6, p. 359-390, 1944.

_____. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral

cortex. **Journal of neurophysiology**, v. 10, n. 6, p. 409-414, 1947.

LIMA, C. B.; SOARES, G.D.S.F.; VITOR, S.M.; CASTELLANO, B.; GUEDES, R.C.A. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. **Life sciences**, v. 93, n. 9-11, p. 388-392, 2013.

LOPES-DE-MORAIS, A. A. C.; MENDES-DA-SILVA, R. F.; DOS-SANTOS, E. M.; GUEDES, R.C.A. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. **Brain research**, v. 1591, p. 93-101, 2014.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **KRAUSE ALIMENTOS, Nutrição. Dietoterapia**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Livraria Roca Ltda, 2012. p. 89-99.

MAIA, L. M. S. S.; AMANCIO-DOS-SANTOS A; DUDA-DE-OLIVEIRA, D; ANGELIM, M. K. C; GERMANO, P. C. P; SANTOS, S. F; GUEDES, R. C. A. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose-and nutrition-dependent effect. **Nutritional neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 73-80, 2009.

MCCORMICK, D. B.; SNELL, E. E. Pyridoxal phosphokinases. 2. Effects of inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 236, p. 2085-2088, 1961.

MCCULLOUGH, L. E.; MILLER, E. E.; MENDEZ, M. A.; MURTHA, A. P.; MURPHY, S. K.; HOYO, C. Maternal B vitamins: effects on offspring weight and DNA methylation at genomically imprinted domains. **Clinical epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 8, 2016.

MEDEIROS, L. B.; VITOR-DE-LIMA, S. M.; BENEVIDES, R. D. L.; QUEIROGA, R. C. R. D. E.; GUEDES, R. C. A. Neonatal administration of goat whey modulates memory and cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes: Possible role of sialic acid. **Nutritional neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 108-115, 2016.

MENDES-DA-SILVA, R. F.; LOPES-DE-MORAIS, A.A.C.; BANDIM-DA-SILVA, M.E.; DE ARAUJO CAVALCANTI, G.; RODRIGUES, A.R.O.; DA SILVEIRA ANDRADE-DA, B.L.; GUEDES, R.C.A. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 155-160, 2014.

MENDES-DA-SILVA, R. F.; DA SILVA FRANCISCO, E.; GUEDES, R. C. A.

Pilocarpine/ascorbic acid interaction in the immature brain: Electrophysiological and oxidative effects in well-nourished and malnourished rats. **Brain research bulletin**, v. 142, p. 414-421, 2018.

MILLS, P. B.; SURTEES, R.A.; CHAMPION, M.P.; BEESLEY, C.E.; DALTON, N.; SCRAMBLER, P.J.; HEALES, S.J.R.; BRIDDON A.; SCHEIMBERG, I.; HOFFMANN, G.F.; ZSCHOCKE, J.; CLAYTON, P.T. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox (am) ine 5'-phosphate oxidase. **Human molecular genetics**, v. 14, n. 8, p. 1077-1086, 2005.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.

MURRAY, R. K.; GRANNER D, MAYES P, RODWELL V. **Harper's illustrated biochemistry**. McGraw-Hill: New York, 2009.

MIYA SHAIK, M.; LIN TAN, H.; A KAMAL, M.; HUA GAN, S. Do folate, vitamins B6 and B12 play a role in the pathogenesis of migraine? The role of pharmacoepigenomics. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 13, n. 5, p. 828-835, 2014.

NELSON, E. Association of vitamin B6 deficiency with convulsions in infants. **Public Health Reports**, v. 71, n. 5, p. 445, 1956.

NYE, B. L.; THADANI, V. M. Migraine and epilepsy: review of the literature. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 55, n. 3, p. 359-380, 2015.

NWEZE, C. C.; YAKO, A. B.; AREMU, S. O. Biochemical effect of vitamin b6 deficiency on blood and liver of adult male albino rats. **Transnational Journal of Science and Technology**. v.2, n.8, p. 88-98, 2012.

OKEREKE, O. I.; COOK, N. R.; ALBERT, C. M.; VAN DENBURGH, M.; BURING, J. E.; MANSON, J. E. Effect of long-term supplementation with folic acid and B vitamins on risk of depression in older women. **The British Journal of Psychiatry**, v. 206, n. 4, p. 324-331, 2015.

ORAÇÃO DE SÃO FRANCISCO. Disponível em: <https://www.oracaoefe.com.br/sao-francisco-de-assis/>. Acesso em: 28 de março de 2019.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**. National Academies Press, 2006.

PARLETTA, N.; MILTE, C. M.; MEYER, B. J. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 725-743, 2013.

PAULOSE, C. S.; DAKSHINAMURTI, K.; PACKER, S.; STEPHENS, N.L. Sympathetic stimulation and hypertension in the pyridoxine-deficient adult rat. **Hypertension**, v. 11, n. 4, p. 387-391, 1988.

PERRY, T. A. WEERASURIYA, A.; MOUTON, P.R.; HOLLOWAY, H.W.; GREIG, N.H. Pyridoxine-induced toxicity in rats: a stereological quantification of the sensory neuropathy. **Experimental neurology**, v. 190, n. 1, p. 133-144, 2004.

PRADO, E. L.; DEWEY, K. G. Nutrition and brain development in early life. **Nutrition reviews**, v. 72, n. 4, p. 267-284, 2014.

PUSIC, A. D.; MITCHELL, H. M.; KUNKLER, P. E.; KLAUER, N.; KRAIG, R. P. Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling. **Experimental neurology**, v. 264, p. 43-54, 2015.

ROCHA-DE-MELO, A.; GUEDES, R. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 5, p. 663-669, 1997.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; CAVALCANTI, J. B; BARROS, A. S; GUEDES, R. C. A.. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional neuroscience**, v. 9, n. 3-4, p. 155-160, 2006.

RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. McGraw Hill Brasil, 30. ed., 2016, p-557.

ROSENBERG, I. H. A history of the isolation and identification of vitamin B6. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 3, p. 236-238, 2012.

SAID, Z. M; SUBRAMANIAN, V.S.; VAZIRI, N.D.; SAID, H.M. Pyridoxine uptake by colonocytes: a specific and regulated carrier-mediated process. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 294, n. 5, p. C1192-C1197, 2008.

SANTOS-MONTEIRO, J.; TEODÓSIO, N.; GUEDES, R. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. **Nutritional neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 29-40, 2000.

SCHELLER, D.; SZATHMARY, S.; KOLB, J.; TEGTMEIER, F. Observations on the relationship between the extracellular changes of taurine and glutamate during cortical spreading depression, during ischemia, and within the area surrounding a thrombotic infarct. **Amino Acids**, v. 19, n. 3-4, p. 571-583, 2000.

SCHIEFERDECKER, M. E. M.; THIEME, R. D.; HAUSCHILD, D. B. **Vitaminas, Minerais e Eletrólitos: Aspectos Fisiológicos, Nutricionais e Dietéticos**. Rubio: Rio de Janeiro, 2015. p. 281.

SHABBIR, F., PATEL, A.; MATTISON, C.; BOSE, S.; KRISHNAMOHAN, R.; SWEENEY, E. et al. Effect of diet on serotonergic neurotransmission in depression. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 3, p. 324-329, 2013.

SHEPHERD, R. Paralisia cerebral. **Fisioterapia em pediatria**, 3. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora, 2002. p.110-144.

SILVA-GONDIM, M. B.; DE SOUZA, T. K. M.; RODRIGUES, M. C. A.; GUEDES, R. C. A. Suckling in litters with different sizes, and early and late swimming exercise differentially modulates anxiety-like behavior, memory and electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats. **Nutritional neuroscience**, v. 20, p. 1-10, 2017.

SOARES, G. D. S. F.; LIMA, C. B.; CAVALCANTI, L. C.; VILLACAMPA, N.; CASTELLANO, B.; GUEDES, R. C. A. Brain effects of the lectin from *Canavalia ensiformis* in adult rats previously suckled in favorable and unfavorable conditions: A spreading depression and microglia immunolabeling study. **Nutritional neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 307-315, 2014.

SPECTOR, R.; JOHANSON, C. E. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E. **Journal of neurochemistry**, v. 103, n. 2, p. 425-438, 2007.

SREEKUMARAN, E.; RAMAKRISHNA, T.; MADHAV, T.R.; ANANDH, D.; PRABHU, B.M.; SULEKHA, S.; BINDU, P.N.; RAJU, T.R. Loss of dendritic connectivity in CA1, CA2, and CA3 neurons in hippocampus in rat under aluminum toxicity: antidotal effect of pyridoxine. **Brain research bulletin**, v. 59, n. 6, p. 421-427, 2003.

SULLIVAN JR, D.; PETERSON, R.C.; MUJER, C.V.; GAD, S.C. A 7-day intravenous toxicity study and neurotoxicity assessment of pyridorin in Sprague-Dawley rats. **Human & experimental toxicology**, v. 36, n. 7, p. 718-726, 2017.

TORRENTE, D.; CABEZAS, R.; AVILA, M. F.; GARCÍA-SEGURA, L.M.; BARRETO, G.E.; GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: Is there a role for astrocytes? **Neuroscience letters**, v. 565, p. 2-6, 2014.

TRINDADE-FILHO, E. M.; VASCONCELOS, C. A. C. D.; GUEDES, R. C. A. Acute tryptophan administration impairs cortical spreading depression propagation in REM sleep deprived and non-deprived adult rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 235, 2009.

VAN HUNSEL, F.; VAN DE KOPPEL, S.; VAN PUIJENBROEK, E.; KANT, A. Vitamin B6 in Health Supplements and Neuropathy: Case Series Assessment of Spontaneously Reported Cases. **Drug safety**, v. 41, n. 9, p. 859-869, 2018.

VASCONCELOS, C. A. C. D.; DE OLIVEIRA, J.A.F.; DE OLIVEIRA COSTA L.A.; GUEDES, R.C.A. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 163-170, 2004.

VEREŠOVÁ, S.; KÁBOVÁ, R.; VELÍŠEK, L. Proconvulsant effects induced by pyridoxine in young rats. **Epilepsy research**, v. 29, n. 3, p. 259-264, 1998.

VIGGIANO, E.; MONDA, V.; MESSINA, A.; MOSCATELLI, F.; VALENZANO, A.; TAFURI, D.; CIBELLI G.; DE LUCA, B.; MESSINA, G.; MONDA, M. Cortical spreading depression produces a neuroprotective effect activating mitochondrial uncoupling protein-5. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 12, p. 1705-1710, 2016.

VISWANATHAN, M.; PAULOSE, C. S.; LAL, K. J.; SHARMA, S. K.; DAKSHINAMURTI, K. Alterations in brainstem $\alpha 2$ adrenoreceptor activity in pyridoxine-deficient rat model of hypertension. **Neuroscience letters**, v. 111, n. 1-2, p. 201-205, 1990.

VITOR-DE-LIMA, S. M.; MEDEIROS, L. D. B.; BENEVIDES, R. D. D. L.; DOS SANTOS, C. N.; LIMA DA SILVA, N. O.; GUEDES, R. C. A. Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. **Nutritional neuroscience**, v. 20, p. 1-9, 2017.

VROLIJK, M. F.; OPPERHUIZEN, A.; JANSSEN, E. H.; HAGEMAN, G. J.; BAST, A.;

HAENEN, G. R. The vitamin B6 paradox: supplementation with high concentrations of pyridoxine leads to decreased vitamin B6 function. **Toxicology in Vitro**, v. 44, p. 206-212, 2017.

WHITTAKER, J. W. Intracellular trafficking of the pyridoxal cofactor. Implications for health and metabolic disease. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 592, p. 20-6, 2016.

WILSON, M. P.; PLECKO, B.; MILLS, P. B.; CLAYTON, P. T. Disorders Affecting Vitamin B6 metabolism. **Journal of inherited metabolic disease**, p.1-18, 2019.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 12, p. 1277-1281, 1991.

YANG, T.-T.; WANG, S.-J. Pyridoxine inhibits depolarization-evoked glutamate release in nerve terminals from rat cerebral cortex: a possible neuroprotective mechanism? **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 331, n. 1, p. 244-254, 2009.

YARLAGADDA, A.; CLAYTON, A. H. Blood brain barrier: the role of pyridoxine. **Psychiatry (Edgmont)**, v. 4, n. 8, p. 58, 2007.

YOO, D. Y.; KIM, W.; KIM, D. W.; YOO, K. Y.; CHUNG, J. Y.; YOUN, H. Y. et al. Pyridoxine enhances cell proliferation and neuroblast differentiation by upregulating the GABAergic system in the mouse dentate gyrus. **Neurochemical research**, v. 36, n. 5, p. 713-721, 2011.

YOO, D. Y.; KIM, W.; NAM, S.M.; CHUNG, J.Y.; CHOI, J.H.; YOON, Y.S.; WON M.H.; HWANG I.K. Chronic effects of pyridoxine in the gerbil hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. **Neurochemical research**, v. 37, n. 5, p. 1011-1018, 2012.

ZHANG, D.-M.; YE, J. X.; MU, J. S.; CUI, X. P. Efficacy of vitamin B supplementation on cognition in elderly patients with cognitive-related diseases: a systematic review and meta-analysis. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 30, n. 1, p. 50-59, 2017.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55-81) 2126 8840 | 2126 8351

fax: 2126 8350
www.ccbio.ufpe.br

Ofício nº123/17

Recife, 11 de dezembro de 2017

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.º Rubem Carlos Araujo Guedes
Departamento de Nutrição
Centro da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.044817/2017-68

Certificamos que a proposta intitulada "**Suplementação com peredoxina e desenvolvimento cerebral em ratos albinos: análise eletrofisiológica**" registrada com o nº23076. 044817/2017-68 sob a responsabilidade de Prof.º **Rubem Carlos Araujo Guedes** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle de experimentação animal (concea), e foi aprovada pela comissão de ética no uso de animais (ceua) da universidade federal de pernambuco (UFPE), em reunião de 06/12/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/01/2018 a 27/02/2019
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos / Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	100-200g/ 40-50 dias
Sexo	Macho
Origem	Bioterio do Departamento de Nutrição da UFPE

Atenciosamente

Pedro V. Caralli
Prof. Dr. Pedro V. Caralli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1901584