

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Iohanna Deckmann

**AVALIAÇÃO DE RATAS SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS DE
SUPLEMENTAÇÃO COM FOLATO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL**

Porto Alegre

2015

Iohanna Deckmann

**AVALIAÇÃO DE RATAS SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS DE
SUPLEMENTAÇÃO COM FOLATO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Fisiologia Geral

Orientador: Prof^a. Dr^a Lenir Orlandi Pereira Silva

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Deckmann, Iohanna

AVALIAÇÃO DE RATAS SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO COM FOLATO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL / Iohanna Deckmann. -- 2015.
64 f.

Orientadora: Lenir Orlandi Pereira Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Ácido fólico. 2. Gestação. 3. Cognição. 4. Aprendizado. I. Orlandi Pereira Silva, Lenir, orient. II. Título.

Iohanna Deckmann

**AVALIAÇÃO DE RATAS SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS DE
SUPLEMENTAÇÃO COM FOLATO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Cibele Canal Castro – Doutorado em Bioquímica - UFRGS

Cristiane Matté – Doutorado em Bioquímica - UFRGS

Lenir Orlandi Pereira Silva - Doutorado em Neurociências - UFRGS

Dedico esse trabalho às mulheres que me ensinaram a seguir em frente,
lutar pelos meus objetivos e vencer os obstáculos da vida...
Pra elas, que são mulheres fortes e, ao mesmo tempo, doces:
minhas avós Elzília (*in memoriam*) e Ivonir,
e minha mãe Rita.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço às agências de fomento que contribuíram de forma relevante para a realização desse trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradeço à minha orientadora Lenir pela oportunidade de Iniciação Científica, pelo entusiasmo com a pesquisa, pela exigência, e por todos os momentos de aprendizado. Nesses mais de quatro anos, me fizeste crescer muito tanto como aluna quanto como pessoa. Muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório, por ensinarem tudo o que hoje eu sei, por tornarem a minha Iniciação Científica um aprendizado único e me fazerem capaz de ter o meu próprio projeto e administrá-lo da melhor forma possível. Obrigada Paty, Ramiro, Heloisa, Cla, Josi, Bruna e Jaque. Essas últimas duas têm uma participação mais do que especial na minha vida acadêmica devido aos trabalhos com ácido fólico. A Bruna foi, neste último ano, minha companheira de projeto, de pesquisa e de desafios diários (e de lamentações também), e mais do que nunca a ajuda dela foi fundamental pra mim. Bru, só tenho a te agradecer imensamente por toda parceria e que esse projeto lindo continue rendendo muitos frutos! A Jaque é ligada diretamente a grande parte da minha trajetória acadêmica devido aos trabalhos com ácido fólico. Nesse último ano, mesmo de longe se fez muito presente na realização desse trabalho e se tornou parte desse projeto. Agradeço imensamente pelas inúmeras conversas no Skype, pela disponibilidade em responder todas as dúvidas prontamente, por cada orientação e cada palavra de incentivo. Tenho um grande carinho e admiração por esta que considero minha mãe científica no incrível mundo do ácido fólico. Jaque, muito obrigada por tudo!

À Silvia, que foi muito mais do que técnica de laboratório, por toda ajuda com as questões práticas, por sempre tirar minhas dúvidas, por estar sempre à disposição e por todas as risadas.

Aos colegas do grupo PND, que compartilhavam do mesmo espaço, por todos os momentos de contribuição e aprendizado. Em especial, ao querido Otávio por toda ajuda ao longo de nossa iniciação científica

Aos meus amigos e colegas de faculdade por todos os momentos de descontração, por toda ajuda e parceria.

Ao meu querido Mauro, por ser, além de um companheiro na pesquisa e na vida acadêmica, meu companheiro na vida. Por me ensinar, me ouvir, me ajudar, entender as minhas ausências, momentos de estresse e de relapso, ser um grande parceiro, amigo pra todas as horas e ser, acima de tudo, um grande incentivador.

À minha família maravilhosa: meu pai Ivanor, minha mãe Rita e minha irmã Indhirha, por serem meu alicerce, minha base mais forte, por me darem todo suporte e estrutura tanto financeira, quanto emocional e afetiva. Muito obrigada pelo amor incondicional, pela paciência, por entenderem as minhas ausências, por me incentivarem a não desistir... Esse trabalho é pra vocês, por estarem sempre ao meu lado, por serem meu porto seguro e por sempre acreditarem em mim! Não tenho palavras pra agradecer. Amo vocês!

Aos meus mestres e guias espirituais pelos ensinamentos, pelos momentos de consolo, por serem âncoras e me darem todo o suporte para seguir em frente.

E por fim, e talvez o mais importante de todos os agradecimentos, aos animais que contribuíram com suas vidas para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

Nos últimos anos, a suplementação com ácido fólico (AF) vem sendo amplamente incentivada devido à sua importante prevenção dos defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que as gestantes recebam AF na dosagem de 400µg por dia, até o final do primeiro trimestre. Porém, com as políticas públicas de fortificação de alimentos com AF, a ingestão deste pode estar excedendo o limite recomendado e são escassos os estudos avaliando as consequências dessa “super” exposição a longo prazo nas grávidas que utilizaram o AF como suplementação. Assim, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação com AF sob parâmetros motores e de memória após o período de prenhez das ratas Wistar. Foram utilizadas vinte e uma ratas Wistar, e assim que confirmada a prenhez, divididas em três grupos experimentais: Controle (ração padrão de biotério), AF2 (2mg AF/Kg de dieta) e AF20 (20mg AF/Kg dieta). Tanto a ração quanto os animais foram pesados todos os dias, sendo as avaliações comportamentais através dos testes de Campo Aberto, Reconhecimento de Objetos e Esquiva Inibitória, as quais foram iniciadas após o desmame (n=7/grupo). Nossos resultados não mostram diferença entre os grupos, apenas entre dias dentro do mesmo grupo, quando analisado o ganho de peso diário e a quantidade de ração consumida durante a gestação. Quando avaliada a atividade locomotora e a memória aversiva, os grupos não apresentam quaisquer diferenças entre eles. No entanto, quando avaliada a memória de longa duração no teste de reconhecimento de objetos ambos os grupos suplementados apresentam um pior desempenho, sugerindo um déficit na formação da memória. No seu conjunto, nossos resultados demonstram que tanto a dosagem recomendada (2mg/Kg) quanto a em excesso (20mg/Kg), em animais tratados durante os 21 dias de gestação estão associados a um déficit na memória de reconhecimento, mas não na memória aversiva e nem na atividade locomotora.

Palavras-chave: folato, vitamina B9, gravidez, aprendizado, cognição.

ABSTRACT

In recent years, supplementation with folic acid (FA) has been widely encouraged due to important prevention of neural tube defects (NTD). Currently, the World Health Organization (WHO) recommends that pregnant women receive a daily dose of 400 μ g to FA until the end of the first trimester. However, with the public policy of fortification of foods with AF, the intake of this may be exceeding the recommended limit and there are few studies evaluating the consequences of this "super" long-term exposure in pregnant women who used the FA as supplementation. Thus, our aim was to evaluate effects of supplementation to FA in both motor and memory parameters after the pregnancy period in female Wistar rats. Twenty-one Wistar rats were used, and so confirmed the pregnancy, divided into three groups: control (standard diet of biotery), FA2 (2 mg FA/kg diet) and FA20 (20 mg FA/kg diet). Both feed and the animals were weighed every day, and the behavioral assessments through Open Field, Object Recognition and Inhibitory Avoidance test, which began after weaning (n = 7/group). Our results show no difference between the groups, only between days within the same group, when analyzing the average daily gain and the feed intake during pregnancy. When measured locomotor activity and aversive memory, the groups do not present any differences between them. However, when evaluating the long-term memory in the object recognition test both groups supplemented have a poorer performance, suggesting a deficit in formation of memory. Taken together, our results demonstrate that both recommended dosage (2mg/kg) and excess (20 mg/kg) in treated animals during the 21 days of pregnancy are associated with a deficit in the recognition memory but not in memory or aversive and locomotor activity.

Keywords: folate, vitamin B9, pregnancy, learning, cognition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via do folato no metabolismo de um carbono 14

Artigo Científico

Figura 1 – Avaliações durante a prenhez 35

Figura 2 – Teste de Reconhecimento de Objetos 36

Figura 3 – Teste de Esquiva Inibitória 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste de Campo Aberto	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido fólico
AF2	Grupo suplementado com ração com 2 mg/Kg de AF
AF20	Grupo suplementado com ração com 20 mg/Kg de AF
AIN-93	<i>American Institute of Nutrition Rodent Diets</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
CT	Controle
DFTN	Defeitos no fechamento do tubo neural
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
HI	Hipóxia-Isquemia
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IR	Índice de Reconhecimento
mRNA	RNA mensageiro
NeuN	Proteína nuclear específica neuronal
NMDA	N-methyl-d-aspartate
RNA	Ácido ribonucleico
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
T3	Triiodotironina

T4	Tiroxina
TH	Hormônio da Tireoide
THF	Tetraidrofolato
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 ÁCIDO FÓLICO	14
1.2 SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO	15
1.3 ESTUDOS AVALIANDO SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM GESTANTES	17
1.4 OUTROS ESTUDOS AVALIANDO SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO	17
1.5 MEMÓRIA	18
1.6 JUSTIFICATIVA.....	20
1.7 OBJETIVOS	21
1.7.1 Objetivo geral	21
1.7.2 Objetivos específicos.....	21
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NEUROSCIENCE	466
ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico (AF) é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, não sintetizada pelos humanos e por esse motivo deve ser obtida através da ingestão de alimentos como espinafre, brócolis, fígado e algumas frutas cítricas. Essa vitamina é crítica para a biossíntese de nucleotídeos, remetilação da homocisteína e reações de metilação (Smith *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2015). Em vários tecidos, incluindo o cérebro, essa vitamina tem um papel crítico nas reações de transferência de um carbono, essenciais para a síntese de DNA e RNA, nucleotídeos do metabolismo de aminoácidos e para reações de metilação (Araujo *et al.*, 2015) conforme a Figura 1. No encéfalo, esse papel é crucial para a síntese de neurotransmissores, hormônios, fosfolípidos de membrana e de mielina (Araujo *et al.*, 2015), sendo que recentemente se sugeriu que ingestão de folato durante a gravidez tem um papel importante na manutenção da mielina (Lee *et al.*, 2010).

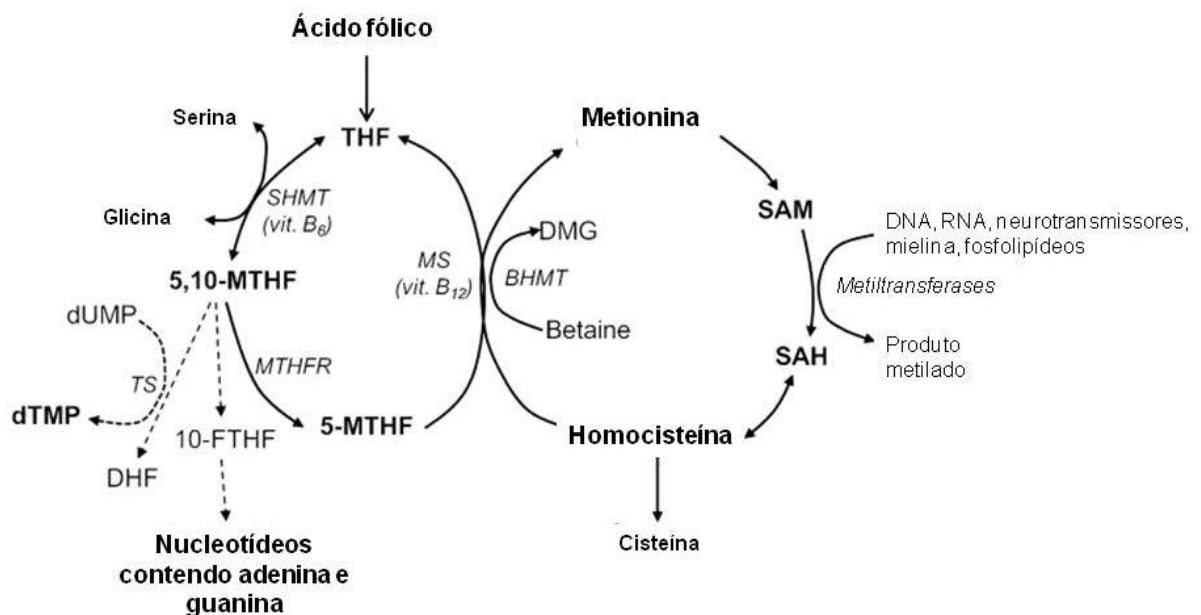


Figura 1. Via do folato no metabolismo de um carbono. 5,10-MTHF: N5,N10-metilenotetraidrofolato; 5-MTHF: N5-metiltetraidrofolato; 10-FTHF: N10- formiltetraidrofolato; BHMT: betaina-homocisteína metiltransferase; DHF: diidrofolato; DMG: dimetilglicina; dTMP: deoxitimidina monofosfato; dUMP: deoxiuridina monofosfato; MS: metionina sintase; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAM: s-adenosilmetionina; SHMT: serina hidroximetiltransferase; THF: tetraidrofolate; TS: thimidilato sintase e vit B12: vitamina B12. Adaptado de Araújo *et al.*, 2015.

O folato é a forma natural encontrada nos alimentos, estando presente na natureza na forma de poliglutamatos, e o AF, por ser monoglutâmico, tem uma maior biodisponibilidade.

A absorção de folato depende da redução da forma poli para monoglutâmica no intestino. Quando absorvido, o folato é reduzido a tetraidrofolato (THF), o composto ativo (Féiz *et al.*, 2012), e sua excreção se dá através de vias urinárias e biliares (Ferreira *et al.*, 2005).

A relação do AF com a redução de defeitos do fechamento do tubo neural (DFTN) no período embrionário já é bem estabelecida (Czeizel & Dudás, 1992); recentemente, a sua suplementação também vem sendo associada à prevenção de eventos isquêmicos (Assaneli *et al.*, 2004) e danos oxidativos causados pela homocisteinemia (Matté *et al.*, 2007), ao controle dos sinais e sintomas da doença de Alzheimer (Mattson & Shea, 2003) e melhoras no quadro de depressão (Budni *et al.*, 2013).

1.2 SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO

Desde a década de 90 existe um crescente incentivo à suplementação com AF durante a gestação, visto que essa é uma intervenção que está relacionada com uma redução nos riscos de ocorrência de DFTN (Rosemberg *et al.*, 2005; Asadi-Pooya *et al.*, 2015); por isso, a ingestão dietética adequada de AF se torna de extrema importância para mulheres em idade fértil ou para aquelas que pretendem engravidar (Salvalágio *et al.*, 2005).

Inicialmente, em 1968, a OMS sugeriu uma dose profilática de 300 µg diárias de AF durante toda a gestação. Entretanto, em 1998, essa dose de suplementação foi elevada para 400 µg/dia (OMS, 2013), a qual é mantida até hoje e deve ser feita pelo menos um mês antes da gestação até o final do primeiro trimestre da mesma. Em 1996, o FDA (*Food and Drug Administration*) determinou o enriquecimento de cereais e todas as farinhas com 140 µg de ácido fólico/ 100 g de farinha de trigo (Jacques *et al.*, 1999). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o regulamento técnico que estipula a fortificação de farinhas de trigo e milho com ferro e AF, através da RDC 344/2002 (ANVISA, 2002), para que toda a população no Brasil, em especial as gestantes, tenha acesso a essa vitamina (Ferreira *et al.*, 2005).

Contudo, apesar da OMS recomendar o uso da suplementação apenas até o final do primeiro trimestre, muitas mulheres ingerem esse nutriente durante toda a gestação, sendo que uma suplementação tardia, ou seja, após o terceiro mês da gravidez, não teria mais efeito sobre a prevenção de defeitos do tubo neural (Stoltzfus *et al.*, 1998). Considerando-se que o nível de ingestão de AF em alimentos fortificados é estimado em não mais do que 100 a 200

µg por dia, e reconhecendo que muitas gestações não são planejadas, todas as mulheres que possam engravidar devem tomar um multivitamínico contendo 400 µg de AF diariamente (Health Canada, 2014). É importante que os profissionais de saúde não aconselhem doses mais elevadas de AF do que é recomendado, pois há informações limitadas sobre suplementação de ácido fólico em doses mais elevadas (Cawley *et al.*, 2015).

Mesmo em países sem fortificação obrigatória, as pessoas têm ácido fólico não metabolizado detectável no sangue, o que poderia indicar superdosagem, provavelmente por causa da ingestão voluntária de alimentos (Sweeney *et al.*, 2005). Então, parece claro que com a política de fortificação obrigatória de farináceos, muitas pessoas podem apresentar altos níveis de ácido fólico não metabolizado na corrente sanguínea. Um estudo realizado nos Estados Unidos constatou que 78% das mulheres pós-menopáusicas em jejum tinham ácido fólico não metabolizado no sangue (Troen *et al.*, 2006). Outro estudo relatou a presença de AF não metabolizado em praticamente todos os participantes do ensaio clínico, em concentrações acima de 1 nmol/L (Pfeiffer *et al.*, 2015). Também foi relatado que em aproximadamente 40% dos adultos mais velhos avaliados em uma pesquisa foi detectado AF não metabolizado (Bailey *et al.*, 2010). Ainda, em um estudo no Canadá em que mulheres em período de amamentação foram suplementadas com placebo, 5-metilTHF ou ácido fólico, observou-se a presença de AF não metabolizado em 96% das amostras de leite testadas, mostrando que a ingestão materna de ácido fólico sintético leva ao aparecimento de AF não metabolizado no leite, sendo desconhecido o impacto disso sobre a biodisponibilidade do folato em crianças (Houghton *et al.*, 2009).

“Decisões políticas em qualquer país considerando fortificação com um ou vários micronutrientes não devem ser limitadas à documentação das indicações para a fortificação (...). Um plano para avaliar a eficácia e segurança da intervenção também é necessário. Embora tal avaliação possa ser cara, a população-alvo de uma intervenção de âmbito nacional ou global merece ser informada sobre a sua eficácia no que diz respeito à promoção da saúde, prevenção de doenças e segurança.” (Rosemberg, 2005)

Portanto, vários estudos destacam a necessidade de uma melhor compreensão da suplementação com AF, observando-se as políticas de fortificação de alimentos e o consumo voluntário de AF.

1.3 ESTUDOS AVALIANDO SUPLEMENTAÇÃO DE AF EM GESTANTES

Os efeitos da suplementação materna de AF durante a gestação geram resultados controversos. Burdge e colaboradores (2012) ressaltam que como o folato participa indiretamente da regulação de transcrição epigenética, os efeitos da suplementação materna de AF podem ser prejudiciais à prole e ainda não são completamente compreendidos.

Em estudos avaliando a suplementação materna de AF em ratos, observou-se diminuição no peso e no tamanho de filhotes cujas mães foram suplementadas com altos níveis de AF (Achón *et al.*, 1999; Takimoto *et al.*, 2011; Mikael *et al.*, 2013), aumento da glicose sanguínea e diminuição nos níveis de insulina em ratos adultos que tiveram suas mães suplementadas durante todo o período gestacional (Joshi *et al.*, 2003) e características de síndrome metabólica em prole de mães tratadas com uma dose excessiva de AF na gestação (Keating *et al.*, 2015).

No entanto, já foram descritos diversos efeitos benéficos dessa suplementação, como associações positivas entre uso de suplementos de AF durante o primeiro trimestre da gravidez e desempenho cognitivo das crianças. Além disso, o AF foi associado a um melhor desenvolvimento neurológico, desempenho verbal e motor em crianças de 4 anos (McGarel *et al.*, 2015), bem como o já bem estabelecido efeito de prevenção de defeitos do fechamento do tubo neural (Czeizel and Dudás, 1992).

1.4 OUTROS ESTUDOS AVALIANDO SUPLEMENTAÇÃO DE AF

Levando-se em conta a utilização do AF em suplementação de gestantes, seu importante papel antioxidante, sua contribuição na prevenção dos DFTN, além de seu duplo efeito, outros possíveis efeitos dessa suplementação, não somente em relação à suplementação materna, já foram investigados.

Recentemente, sugeriu-se que o AF pode melhorar memória de curto prazo, mas piorar a de longo prazo, sendo dose dependente (Shooshtari *et al.*, 2012). Carletti e colaboradores (2012) observaram que o tratamento com AF também foi capaz de prevenir os efeitos ansiogênicos, déficits na memória aversiva e reverter a inibição da atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ produzidos por lesão hipóxica-isquêmica (HI), atuando assim, como um neuroprotetor. Por outro lado, um recente estudo indicou que o déficit na memória espacial foi

agravado em ratos submetidos à HI suplementados com AF (Carletti *et al.*, 2015). Além disso, foram identificados déficits na memória espacial e na motivação em ratos adolescentes suplementados (Sittig *et al.*, 2012). Ainda, estudos mostram que altas concentrações sanguíneas de ácido fólico em humanos podem estar relacionadas à diminuição da citotoxicidade das células *natural killer* (Troen *et al.*, 2006), diminuição da eficácia de drogas usadas contra a malária (Carter *et al.*, 2005), psoríase (Salim *et al.*, 2006), além de risco aumentado de resistência à insulina (Yajnik *et al.*, 2008) e uma possível tendência de desenvolvimento de autismo (Beard *et al.*, 2011). Além disso, a inadequada ingestão de AF vem sendo associada ao desenvolvimento ou aumento de certos tipos de câncer (Baluz *et al.*, 2002), sendo que níveis mais elevados de folato têm sido associados a uma redução nos casos de câncer colorretal na prole de mães suplementadas (Burdge *et al.*, 2012), mas também vem sendo relacionado com a progressão de alguns tumores (Song *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2000)

1.5 MEMÓRIA

A consolidação da memória é um processo gradual e prolongado, sendo necessárias horas para formação de memória de longo prazo. Durante muito tempo, acreditava-se que somente os neurônios realizavam esses processos; no entanto, os astrócitos (células gliais mais heterogêneas no Sistema Nervoso Central) contribuem de forma essencial na formação da memória (Zorec *et al.*, 2015). Diz-se que a memória de curto prazo está envolvida no processamento de informação nova, enquanto a memória de longo prazo é formada constantemente (Alonso *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, intensificaram-se as pesquisas relacionando a plasticidade sináptica com aprendizagem e memória (Ménard *et al.*, 2012) e sabe-se que o neurotransmissor excitatório glutamato está diretamente envolvido nesses processos. Seus receptores, presentes tanto em células gliais quanto neuronais, são divididos em dois tipos: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores metabotrópicos são receptores acoplados à proteína G, sendo 8 já descritos e subdivididos em 3 grupos: Grupo 1 (mGluR1 e mGluR5), grupo (mGluR2 e mGluR3) e grupo 3 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (Ménard *et al.*, 2012). Os receptores ionotrópicos são canais iônicos ativados por agonistas glutamatérgicos e incluem os subtipos de receptores AMPA (2-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxaole-4-propionate), NMDA (N-metil-d-aspartato) e cainato. A estimulação desses receptores conduz à potenciação de

longa duração (LTP), que é o aumento de respostas pós-sinápticas, que pode durar horas, dias ou semanas após uma estimulação de aferentes pre-sinápticos (Izquierdo *et al.*, 2008). Estes receptores permitem a entrada de íons Ca^{2+} na célula, ativando vias de sinalização intracelular, produzindo, então, mudanças na expressão genética e a produção de LTP, favorecendo a formação de memórias de longa duração (Ménard *et al.*, 2012).

Todos esses processos são regulados pelo Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) o qual regula a sobrevivência e diferenciação de populações específicas de neurônios e modula a função sináptica tanto para a memória de curto prazo quanto para a de longo prazo, regulando a plasticidade sináptica no hipocampo e é diretamente envolvido na LTP (Alonso *et al.*, 2002).

Sabe-se que determinados tipos de memória são altamente dependentes do hipocampo, como por exemplo, a memória espacial; porém, a aquisição de memórias de medo condicionado dependem em grande parte da amígdala (Ménard *et al.*, 2012). A formação da memória aversiva requer uma série de eventos moleculares na região CA1 hipocampal (Izquierdo *et al.*, 2008), além do envolvimento da amígdala para que haja associação a um estímulo aversivo (Flavell & Lee, 2012).

Adaptativamente, a capacidade de formar memórias é um pré-requisito para a adaptação comportamental de um organismo às mudanças ambientais (Halder *et al.*, 2015), sendo esse processo complexo, gradual, desenvolvido em várias etapas e envolvendo processos de plasticidade, inibição, regulação de receptores, entre outros.

1.6 JUSTIFICATIVA

Considerando que: existe um grande incentivo à suplementação com ácido fólico, não há um consenso entre a dose e o tempo mais recomendados e pouco se conhece a respeito dos efeitos dessas diferentes doses sobre as gestantes, seria de grande importância um estudo que avaliasse o efeito da suplementação de ácido fólico durante a gestação em doses consideradas aceitáveis e doses consideradas excessivas.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos comportamentais em ratas Wistar suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico durante o período gestacional

1.7.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos dos diferentes níveis de suplementação com ácido fólico durante todo o período gestacional nas ratas progenitoras, após o desmame, avaliando:

- Atividade locomotora pelo teste do campo aberto
- Memória de reconhecimento pelo teste de reconhecimento de objetos
- Memória aversiva pelo teste da esquiva inibitória

2 ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DE RATAS SUBMETIDAS A DIFERENTES NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

Iohanna Deckmann^a, Bruna Ferrary^{ab}, Patrícia Maidana Miguel^{ab}, Heloisa Deola Confortim^{ab},
Lenir Orlandi Pereira^{ab}

- a) Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
- b) Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

RESUMO

Nos últimos anos, a suplementação com ácido fólico (AF) vem sendo amplamente incentivada devido à sua importante prevenção dos defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN). O AF é um micronutriente pertencente ao grupo das vitaminas do complexo B, e crítico para garantir funções celulares como a biossíntese de nucleotídeos. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que as gestantes recebam AF na dosagem de 400µg por dia, até o final do primeiro trimestre. Porém, com as políticas públicas de fortificação de alimentos com AF, a ingestão deste pode estar excedendo o limite recomendado e são escassos os estudos avaliando as consequências dessa “super” exposição a longo prazo nas grávidas que utilizaram o AF como suplementação. Assim, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação com AF sob parâmetros motores e de memória após o período de prenhez das ratas Wistar. Foram utilizadas vinte e uma ratas Wistar, e assim que confirmada a prenhez, divididas em três grupos experimentais: Controle (ração padrão de biotério), AF2 (2mg AF/Kg de dieta) e AF20 (20mg AF/Kg dieta). Tanto a ração quando os animais foram pesados todos os dias, sendo as avaliações através dos testes de Campo Aberto, Reconhecimento de Objetos e Esquiva Inibitória iniciada após o desmame (n=7/grupo). Nossos resultados não mostram diferença entre os grupos, somente nos dias dentro do mesmo grupo, quando analisado o ganho de peso diário e a quantidade de ração consumida durante a gestação. Quando avaliada a atividade locomotora e a memória aversiva, os grupos não apresentam quaisquer diferenças entre eles. No entanto, quando avaliada a memória de longa duração no teste de reconhecimento de objetos ambos os grupos suplementados apresentam um pior desempenho, sugerindo um déficit na aquisição da memória. No seu conjunto, nossos resultados demonstram que tanto a dosagem recomendada (2mg/Kg) quanto a em excesso (20mg/Kg), em animais tratados durante os 21 dias de gestação estão associados a um déficit na memória de reconhecimento, mas não na memória aversiva e nem na atividade locomotora.

Palavras-chave: ácido fólico, suplementação, gestação, memória, cognição

INTRODUÇÃO

O ácido fólico (AF) é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B que atua como cofator no metabolismo de um carbono possuindo um papel crítico na biossíntese de

nucleotídeos e remetilação da homocisteína, além do conhecido efeito de redução dos defeitos de fechamento do tubo neural (Czeizel and Dudás, 1992). Neste contexto, a suplementação de AF pelo menos um mês antes da gestação e a manutenção até o final do primeiro trimestre da mesma, além da utilização da dosagem recomendada (400µg) é fundamental (OMS 2013).

Na literatura é bem evidente um duplo efeito da suplementação materna com AF em roedores: em estudos avaliando suplementação com altos níveis de AF na gestação, foi observado diminuição no peso e no tamanho de filhotes (Achón *et al.*, 1999; Mikael *et al.*, 2013) e características de síndrome metabólica na prole (Keating *et al.*, 2015). Além disso, foi evidenciado um aumento da glicose sanguínea e diminuição nos níveis de insulina em ratos adultos que tiveram suas mães suplementadas durante todo o período gestacional (Joshi *et al.*, 2003). No entanto, efeitos benéficos do AF enquanto suplemento em mulheres grávidas já foram bem descritos: associações positivas entre uso de suplementos de AF durante o primeiro trimestre da gravidez e melhor desempenho cognitivo das crianças, melhor desenvolvimento neurológico, superior desenvolvimento verbal e motor em crianças de 4 anos (McGarel *et al.*, 2015), bem como o já bem estabelecido efeito de prevenção de defeitos do fechamento do tubo neural (Czeizel and Duda's, 1992). Chama-se atenção o fato de que todos os estudos supra-citados têm como foco de estudo a prole das mães suplementadas com AF. Para nosso conhecimento, não há estudos investigando os efeitos da suplementação a longo prazo nas progenitoras tratadas.

Além dos estudos envolvendo suplementação materna de AF e avaliação da prole, outros estudos se propuseram a investigar o efeito do AF e também destacam o já comentado duplo efeito. O AF foi associado a uma melhora na memória de reconhecimento de curto prazo, mas não de longo, dose dependente (Shooshtari *et al.*, 2012). Em um estudo com hipóxia-isquemia (HI), Carletti e colaboradores (2012) observaram uma inibição da atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ produzida por lesão hipóxica-isquêmica, que foi revertida pelo tratamento com AF nos neonatos, o qual também foi capaz de prevenir os efeitos ansiogênicos e déficits na memória aversiva causados pela lesão. Por outro lado, atuando na mesma lesão, o AF agravou o déficit na memória espacial (Carletti *et al.*, 2015). Corroborando com esse estudo, Sittig e colaboradores (2012) observaram déficits na memória espacial e na motivação em ratos adolescentes suplementados. Ainda, em casos de câncer, novamente se observou o duplo efeito do AF: níveis mais elevados de folato têm sido associados a uma redução nos casos de câncer colorretal na prole de mães suplementadas (Burdge *et al.*, 2012), mas também vem sendo relacionado com a progressão de alguns tumores (Song *et al.*, 2000; Song *et al.*,

2000)). Além disso, diminuição da eficácia de drogas usadas contra a malária (Carter *et al.*, 2005), psoríase (Salim *et al.*, 2006), risco aumentado de resistência à insulina (Yajnik *et al.*, 2008) e uma possível tendência de desenvolvimento de autismo (Beard *et al.*, 2011) já foram demonstrados em estudos envolvendo altas concentrações sanguíneas de AF em humanos.

Levando-se em conta o duplo efeito do AF, o grande incentivo à suplementação com essa vitamina durante a gestação, a falta de consenso entre as doses e o tempo para suplementação e a escassez de trabalhos avaliando as progenitoras suplementadas, nosso objetivo foi investigar os efeitos comportamentais em ratas Wistar suplementadas com diferentes níveis de ácido fólico, dose recomendada e dose excessiva, durante o período gestacional, avaliadas nos testes de Campo Aberto, Reconhecimento de Objetos e Esquiva Inibitória.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem Wistar provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais ficaram alojados no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas (ICBS) desta Universidade sendo mantidos em ambiente climatizado (22 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas e disponibilidade de ração e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com as diretrizes da Lei AROUCA (11.794, de 08/08/2008), está de acordo com o Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS), o qual foi aprovado sob código 28136.

Acasalamento

Após duas semanas de ambientação, as ratas foram submetidas a exames colpocitológicos para determinação da fase do ciclo estral na qual se encontravam. As fêmeas

foram colocadas em caixas individuais com machos assim que estivessem na fase receptível (proestro), permanecendo até o dia seguinte, quando foi realizado um novo exame colpocitológico para confirmação do acasalamento. Logo que confirmado, este foi considerado o dia 0 gestacional.

Definição dos Grupos Experimentais e Suplementação com Ácido Fólico

Após confirmada a gestação, as ratas prenhas foram aleatoriamente divididas em 3 grupos, de acordo com o tipo de dieta. Todas as dietas foram baseadas no AIN-93, tanto nos animais com dieta padrão quanto nos tratados (Reeves *et al.*, 1993). Neste estudo, 3 grupos experimentais foram definidos de acordo com o grau de suplementação de AF (n=7/grupos):

- a) Controle: ração padrão de biotério (contendo 0,2 mg/Kg de AF)
- b) AF2: Ração suplementadas com 2 mg/kg de AF;
- c) AF20: Ração suplementadas com 20 mg/kg de AF .

A suplementação com 2 mg/kg de AF na ração das ratas prenhas seria o equivalente à suplementação indicada para mulheres grávidas (Alonso-Aperte, 1997). Já a suplementação com 20 mg/kg de AF nas rações seria um nível 10 vezes superior ao recomendado, o que é visto na clínica com as mulheres que suplementam com 5 mg/dia de AF, sendo que esta, que é considerada uma superdosagem, vem sendo utilizada em estudos prévios (Wang *et al.*, 2012; Mikael *et al.*, 2013; Barua *et al.*, 2015). Durante toda a prenhez, as fêmeas foram pesadas para acompanhamento do ganho de peso e o consumo de ração foi mensurado. Após o desmame, os animais voltaram à dieta padrão (Joshi *et al.*, 2003; Sable *et al.*, 2012; Sable *et al.*, 2014).

Testes Comportamentais

Poucos trabalhos têm avaliado os efeitos da suplementação com ácido fólico durante todo o período gestacional nas prenhas após o nascimento dos filhotes. No presente estudo, a avaliação comportamental das mães iniciou-se 24h após o desmame dos filhotes através dos testes: Campo Aberto, Reconhecimento de Objetos e Esquiva Inibitória.

- Campo Aberto (*open field*)

Para avaliação da atividade locomotora, as fêmeas foram colocadas em uma caixa de madeira de dimensões de 50 x 50 x 39 cm (comprimento x altura x profundidade), com uma parede frontal de vidro. O campo aberto é dividido em 9 quadrantes iguais. Os animais foram colocados no quadrante posterior esquerdo e observou-se a latência que levam para sair deste quadrante, o número de cruzamentos entre os quadrantes e número de elevações verticais (*rearings*), em um tempo de 300 segundos (Netto *et al.*, 1986).

- Teste de Reconhecimento de Objetos

Esse teste permite avaliar a memória de reconhecimento de acordo com Ennaceur & Delacour (1988) adaptado por Pereira e colaboradores (2008). Os animais foram colocados em uma caixa de vidro igual à do teste Campo Aberto, medindo 50 x 50 x 39 cm (comprimento x altura x profundidade), contendo dois objetos. Na fase de treino, foram colocados dois objetos iguais (“A1” e “A2”) e se observou o tempo de exploração de cada objeto durante 5 minutos. Após um intervalo de 5 minutos o animal foi recolocado na caixa para a fase de teste para avaliação da memória de curta duração. Nessa fase, um dos objetos foi trocado por um novo objeto, tendo-se então objetos “A1” e “B” e também se avaliou o tempo de exploração por mais 5 minutos. Após 24h, para avaliação de memória de longa duração, foi observada a exploração de um novo conjunto de objetos (“A1” e “C”). Para a análise desse teste, utilizou-se o Índice de Reconhecimento:

$$IR = \frac{\text{Tempo de exploração do objeto novo} - \text{Tempo de exploração do objeto antigo}}{\text{Tempo de exploração do objeto novo} + \text{Tempo de exploração do objeto antigo}}$$

- Teste da Esquiva Inibitória

Esse teste permite avaliar a memória aversiva de acordo com Netto e colaboradores (1985) e Izquierdo e colaboradores (1999). A esquiva inibitória é um aparato de alumínio que tem a parte frontal de acrílico transparente com espaçamento de fuga de 200 x 75 mm. O assoalho é composto de grades eletrificáveis separadas entre si, por 12,5 mm conectadas a um

estimulador elétrico. Na parte esquerda do assoalho existe uma plataforma onde o animal foi colocado no dia de treino com a cabeça voltada para o fundo da caixa e se observou a latência que o animal demorou a descer para a grade. Quando o animal tocou a grade com as quatro patas levou dois choques seguidos de 0,6 mA, e em seguida foi devolvido para sua caixa-moradia. O teste foi realizado 24 horas após o treino onde se recolocou o animal na plataforma e se observou a latência para descida em um tempo máximo de 180 segundos (Izquierdo *et al.*, 1999; Netto *et al.*, 1985).

Estatística

Para análise estatística, foi utilizada ANOVA (análise de variância) de uma via, seguida de teste Tukey para Campo Aberto e Reconhecimento de Objetos, e Kruskal-Wallis seguido de Dunn para Esquiva Inibitória. Foi considerado significativo $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6®.

RESULTADOS

1. Ganho de peso e consumo de ração

- Ganho de peso

Analisando-se o ganho de peso, ANOVA de medidas repetidas com pós-teste de Tukey mostrou somente efeito do dia ($F(20,40) = 12,31$ $P < 0,0001$), indicando não haver diferença no ganho de peso entre os grupos, mas diferença ao longo dos dias no mesmo grupo (Figura 1):

Grupo Controle: dia 18 difere dos dias 2-15 (exceto 12) ($p = 0,0019, 0,0076, 0,0004, 0,0004, 0,0048, 0,0048, < 0,0001, 0,0182, 0,0030, 0,0030, 0,0048, 0,0404$ e $0,0030$, respectivamente), dia 19 é diferente dos dias 4 ($p = 0,0273$), 5 ($p = 0,0273$), 8 ($p = 0,0019$), dia 20 é diferente dos dias 2-15 (exceto 4) ($p = 0,0019, 0,0076, 0,0004, 0,0004, 0,0048, 0,0048, < 0,0001, 0,0182, 0,0030, 0,0030, 0,0048, 0,0404$ e $0,0030$, respectivamente) e dia 21 é diferente dos dias 4 ($p = 0,0404$), 5 ($p = 0,0404$) e 8 ($p = 0,0030$).

Grupo AF2: dia 1 difere dos dias 3 ($p = 0,0182$), 7 ($p = 0,0119$), 8 ($p = 0,0404$) e 12 ($p = 0,0404$), dia 3 é diferente dos dias 17 ($p = 0,0404$) e 18 ($p = 0,0273$), dia 7 é diferente do 17 ($p = 0,0273$) e 18 ($p = 0,0182$) e o dia 20 é diferente dos dias 3 ($p = 0,0182$), 7 ($p = 0,0119$), 8 ($p = 0,0404$) e 12 ($p = 0,0404$).

Grupo AF20: dia 3 é diferente do dia 1 ($p = 0,0488$), dia 17 diferente dos dias 3 ($p = 0,0024$), 5 ($p = 0,0182$), 7 ($p = 0,0119$), 9 ($p = 0,0404$) e 14 ($p = 0,0273$). Dia 18 diferente dos dias 3 ($p = 0,0147$), e 12 ($p =$), dia 19 diferente dos dias 3 ($p = 0,0002$), 4 ($p = 0,0223$), 5 ($p = 0,0019$), 6 ($p = 0,0076$), 7 ($p = 0,0011$), 8 ($p = 0,0076$), 9 ($p = 0,0048$), 12 ($p = 0,0182$) e 14 ($p = 0,0030$), dia 20 é diferente dos dias 3 ($p = 0,0095$) e 7 ($p = 0,0404$) e dia 21 diferente de 3 ($p = 0,0003$), 4 ($p = 0,0333$), 5 ($p = 0,0030$), 6 ($p = 0,0119$), 7 ($p = 0,0019$), 8 ($p = 0,0119$), 9 ($p = 0,0076$), 12 ($p = 0,0273$) e 14 ($p = 0,0048$).

- Consumo de ração

A análise estatística através ANOVA de medidas repetidas seguida de Tukey novamente só evidencia o efeito do dia ($F(21,42) = 4,279$ $P < 0,0001$), mostrando que o consumo diário de ração não difere entre os grupos, somente ao longo dos dias considerando o mesmo grupo (Figura 1):

Grupo Controle: dia 21 é diferente dos dias 9 ($p = 0,0218$), 12 ($p = 0,0005$), 13 ($p = 0,0125$), 14 ($p = 0,0020$), 15 ($p = 0,0070$), 17 ($p = 0,0125$), 18 ($p = 0,0003$) e 19 ($p = 0,0368$).

Grupo AF2: dia 1 é diferente do dia 18 ($p = 0,0368$).

Grupo AF20: dia 5 difere dos dias 7 ($p = 0,0223$), 16 ($p = 0,0223$), 18 ($p = 0,0034$), 19 ($p = 0,0123$) e 20 ($p = 0,0223$)

2. Teste Campo Aberto

Considerando o comportamento exploratório no Campo Aberto, nenhuma variável sofreu alteração entre os grupos, analisando-se: latência para sair do primeiro quadrante ($F(2, 18) = 0,254$; $p = 0,778$), número de cruzamentos $F(2, 18) = 0,165$; $p = 0,849$) e número de *rearings* ($F(2, 18) = 0,9231$; $p = 0,4153$), conforme mostrado na Tabela 1.

3. Teste Reconhecimento de Objetos

Memória de Curta Duração

Considerando a análise de memória de curta duração, a ANOVA de uma via seguida de Tukey não indicou diferença, analisando-se o Índice de Reconhecimento (IR), entre os grupos experimentais (Figura 2). Porém, existe uma tendência à significância entre os grupos Controle e AF20 (resultado da ANOVA ($F(2, 18) = 2,629$; $p = 0,0996$), apontando um menor IR no grupo AF20.

Memória de Longa Duração

A memória de longa duração, avaliada 24h após a primeira exposição aos objetos, também foi investigada. A ANOVA de uma via seguida de Tukey mostrou resultado significativo analisando-se o IR entre os grupos experimentais ($F(2,18) = 5,322$; $p = 0,0153$), sendo que o grupo Controle apresenta maior IR tanto em relação ao grupo AF2 quanto ao grupo AF20 ($p = 0,022$ e $p = 0,04$, respectivamente) conforme a Figura 2.

4. Teste Esquiva Inibitória

Sessão de Treino

Analisando a sessão de treino, o teste de Kruskal-Wallis não mostrou resultado significativo na variável latência para descer da plataforma entre os grupos experimentais ($p = 0,576$) conforme a Figura 3.

Sessão de Teste

Na sessão de teste, a análise por Kruskal-Wallis não mostra significância entre os grupos, observando-se a latência para descer da plataforma ($p = 0,075$). Porém, no teste de Dunn, existe uma tendência de significância entre os grupos Controle e AF2 na sessão de teste ($p = 0,063$), tendo este último menor latência para descer da plataforma, conforme Figura 3.

DISCUSSÃO

Nesse trabalho, nos propusemos a investigar os possíveis efeitos de uma suplementação com AF durante todo período de prenhez de ratas Wistar. Existe uma recomendação da OMS para que mulheres façam suplementação com AF na dose 400 μ Cg por dia e até o final do primeiro trimestre de gestação (OMS, 2013), porém o que se observa na prática é que não existe um consenso entre a dose e o tempo mais recomendados para essa intervenção. Observou-se no presente estudo que animais tratados com 2mg/Kg e 20mg/Kg de AF apresentaram prejuízo na memória de reconhecimento de longa duração. Além disso, animais tratados com a dose mais baixa de AF (2mg/Kg), possivelmente apresentam uma pior memória aversiva comparado aos outros grupos.

Durante a gestação, um período fisiologicamente particular do organismo feminino, ocorrem diversas mudanças metabólicas, visando uma adaptação a esse novo contexto (Alves, 2012). Existe um crescente incentivo à suplementação com AF durante a gestação, inclusive existindo uma dose recomendada pela OMS (400 μ g/dia) e uma política de fortificação de alimentos iniciada nos EUA durante a década de 90 e que se estendeu a vários outros países, incluindo o Brasil com a aprovação de um regulamento técnico pela ANVISA em 2002 (RDC 344/2002, ANVISA, 2002).

Um dos fatores que mais diverge nos trabalhos com suplementação de AF é a dose de administração de folato. Alguns autores utilizam fortificação com doses mais baixas (Schorah et al., 1998), enquanto que outros preferem fármacos sintéticos, com doses diárias elevadas (Landgren et al. 1995; Chauveau et al., 1996; Barua et al., 2015; Keating et al., 2015); porém, além dos já bem descritos efeitos, sua influência do AF no SNC ainda é parcialmente compreendida. Em diversos estudos avaliando a deficiência de folato também ficam evidentes déficits cognitivos, em especial relacionados a memória e aprendizado (Berrocal-Zaragoza *et al.*, 2014). Contudo, ainda são poucos estudos avaliando o efeito da suplementação dessa vitamina, em especial, com doses consideradas excessivas. Por isso, nosso estudo se propôs a investigar os efeitos da suplementação materna de AF na própria progenitora.

De acordo com Achón e colaboradores (1999), devido ao fato de o AF ser uma vitamina hidrossolúvel, possui um baixo potencial tóxico. Nossos resultados mostram que todos os animais tiveram ganho de peso durante toda a gestação, não havendo diferença ao

longo dos dias no ganho de peso, tampouco no consumo diário de ração. Tais achados evidenciam um desenvolvimento gestacional adequado em todos os grupos experimentais.

No presente estudo, a atividade motora geral e comportamentos do tipo ansiedade foram avaliados no teste Campo Aberto; pode-se dizer isso devido ao fato de não ter havido quaisquer diferenças na exploração do aparato (sendo preferencialmente pelas periferias entre todos os grupos experimentais), termos observado reduzido número de bolos fecais no aparato após a realização do teste, bem como não termos visto diferença significativa entre os grupos em nenhuma das variáveis analisadas, o que, em conjunto, indica não haver déficit motor nem comportamentos ansiogênicos causados pela suplementação com essas dosagens de AF. Apesar de esses achados serem em ratas progenitoras, corroboram com o recente estudo de Barichello e colaboradores (2015) em que a prole de ratas suplementadas com diferentes níveis de AF (5, 10, 15mg/Kg) durante toda gestação também não apresenta alteração significativa nas mesmas variáveis analisadas no Campo Aberto. Além disso, em resultados prévios do nosso grupo também não se viu efeito do AF em filhotes suplementados com dose de 5mg/Kg (Carletti *et al.*, 2012).

No nosso estudo, analisando a memória de curta duração no teste de reconhecimento de objetos, não observamos nenhum resultado estatisticamente significativo; porém, existe uma tendência de significância entre os grupos Controle e AF20. Já na memória de longa duração, a ANOVA mostrou um maior IR do grupo Controle em relação aos dois grupos suplementados, indicando que o AF foi capaz de prejudicar a formação de memória de reconhecimento em ambos os tempos avaliados. Esses resultados vão ao encontro de um achado recente de Carletti e colaboradores (2015) em que um tratamento crônico com AF na dose de 5mg/Kg em filhotes prejudicou a memória espacial e de trabalho no teste *Water Maze*. Contudo, esses resultados contrapõem parcialmente um estudo que sugere uma melhora na memória de curto prazo em dosagens mais elevadas de AF, porém, um prejuízo na de longa duração em doses maiores (Shooshtari *et al.*, 2012).

Também neste estudo, avaliou-se a memória aversiva através do teste Esquiva Inibitória. A formação da memória aversiva depende que ocorra uma série de processos moleculares na região CA1 hipocampal (Izquierdo *et al.*, 2008). Sabe-se que além do hipocampo, a amígdala é outra estrutura com papel chave em memórias relacionadas ao medo. Durante o condicionamento na esquiva inibitória, acredita-se que as representações contextuais do ambiente são formadas no hipocampo e a associação ao choque se dá na amígdala, porém ainda é alvo de estudo o quanto as duas estruturas são necessárias (Flavell &

Lee, 2012). No presente estudo, analisando a sessão de treino, observou-se que não há diferença significativa na variável latência para descer da plataforma entre os grupos experimentais. Já na sessão de teste, apesar de não haver significância de resultados na latência, o grupo AF2 tem um pior desempenho comparado aos grupos Controle e AF20. Existe um claro aprendizado por parte de todos os grupos experimentais analisando as sessões de treino e de teste. Porém, apesar de nosso achado mostrar um possível déficit na memória aversiva por parte do grupo AF2, deve-se levar em conta que o número de animais avaliados é pequeno, podendo não se confirmar esse resultado. Em 2012, Carletti e colaboradores também não observaram alteração na memória aversiva de animais tratados cronicamente com 5mg/Kg de AF no teste Esquiva Inibitória, o que nos leva a pensar que o AF possivelmente não está envolvido na aquisição de respostas de medo condicionadas.

Sabe-se que o armazenamento de informações no encéfalo é um processo gradual e que envolve diferentes tipos ou fases de formação da memória. É descrito que memória de curto prazo está envolvida no processamento de informação nova, enquanto a memória de longo prazo está sempre sendo formada (Alonso *et al.*, 2002). Esta tem como base a potenciação de longa duração (LTP), que é o aumento de respostas pós-sinápticas, que pode durar horas, dias ou semanas após uma estimulação de aferentes pre-sinápticos (Izquierdo *et al.*, 2008). Tais processos são dependentes do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) o qual modula a função sináptica tanto para a memória de curto prazo quanto para a de longo prazo, regulando a plasticidade sináptica no hipocampo (Alonso *et al.*, 2002). A formação da memória de longa duração no hipocampo é muito dependente de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). E, interessantemente, Brocardo e colaboradores (2008) observaram uma inibição dos receptores NMDA causada pelo AF. Já é descrito que o bloqueio desses receptores previne a indução da LTP, prejudicando o aprendizado de tarefas que requerem o hipocampo (Shapiro, 2001). Portanto, é possível propor que o prejuízo de mnemônico do AF pode estar relacionado com uma alteração nos receptores glutamatérgicos.

Outros estudos envolvendo a suplementação de folato em excesso evidenciam déficits cognitivos. Recentemente, viu-se supressão da função da tireoide tanto na periferia quanto no hipocampo associada a déficits na memória espacial em ratos adolescentes (Sittig *et al.*, 2012). Sittig e colaboradores observaram uma diminuição nos níveis de T3 e T4 na periferia (mas não de TSH) e diminuição em níveis de proteínas dos receptores tireoidianos $\alpha 1$ e $\beta 1$ no hipocampo, e propõem que esse resultado pode estar associado a uma possível metilação tanto do receptor do TSH na tireoide (o que, conseqüentemente, leva à diminuição de T3 e T4

circulantes) quanto receptores tireoidianos no hipocampo. Sabe-se que hormônio da tireóide (TH) é essencial para o desenvolvimento normal do hipocampo (Bernal *et al.*, 1995), o qual é crítico para as associações entre estímulos visuais e verbais (Wheeler *et al.*, 2011). Corroborando a isso, estudos mais recentes evidenciam os efeitos duradouros do hipotireoidismo congênito sobre o funcionamento do hipocampo (Wheeler *et al.*, 2015) e relacionam alterações microestruturais na substância branca com a disfunção na memória em pacientes hipotireóideos (Singh *et al.*, 2014). Considerando o exposto, alterações metabólicas da tireoide poderiam ser uma outra linha para a compreensão dos déficits cognitivos consequentes à suplementação com AF.

Portanto, nossos resultados demonstraram que houve um déficit funcional na memória de longa duração causado pela suplementação com as duas doses utilizadas. Cabe ressaltar que este é o primeiro trabalho que avalia ratas progenitoras e que foram suplementadas durante todo o período de prenhez. Para melhor compreensão dos efeitos da suplementação com AF, sugerimos a realização de mais estudos através de técnicas de imunistoquímica, realizando marcações com BDNF, GFAP e NeuN, análises morfológicas do encéfalo através de coloração com Hematoxilina e Eosina, além de outros testes comportamentais, em especial avaliando-se memória, a fim de que se elucidem os mecanismos que possam estar envolvidos nessa suplementação.

AGRADECIMENTOS

O financiamento para esse trabalho foi feito pelas agências brasileiras de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul através da bolsa de Iniciação Científica BIC-UFRGS e PIBIC CNPq-UFRGS.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1

Teste de Campo Aberto.

Grupo	Latência	Cruzamentos	Rearings
Controle	11,285±3,27	63,714±9,71	45,571±6,87
AF2	9,857±1,76	48,714±7,20	37,142±6,00
AF20	8,857±1,92	48,714±5,60	34,428±5,13

Variáveis analisadas no teste: latência para sair do primeiro quadrante, número de cruzamentos e número de rearings. Resultados expressos em Média±Erro Padrão. ANOVA de uma via ($p = 0,4118$). AF2: grupo suplementado com ração com 2mg/Kg; AF20: grupo suplementado com ração com 20mg/Kg

Figura 1

Avaliações durante a prenhez. **A.** Consumo diário de ração. **a** = dia 21 diferente dos dias 9, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19; **b** = dia 1 diferente do dia 18; **c** = dia 5 diferente dos dias 7, 16, 18, 19 e 20. **B.** Ganho de peso médio. **a** = dia 18 difere dos dias 2-15, dia 19 e 21 diferentes dos dias 4, 5 e 8, dia 20 diferente dos dias 2-15. **b** = dia 1 e 20 diferentes dos dias 3, 7, 8 e 12, e dias 3 e 7 diferentes dos dias 17 e 18, dia 20. **c** = dia 3 diferente do dia 1, dia 17 diferente dos dias 3, 5, 7, 9, 12 e 14, dia 18 diferente dos dias 3 e 12, dia 19 diferente dos dias 3-9, 12 e 14, dia 20 é diferente dos dias 3 e 7, e dia 21 é diferente dos dias 3-9, 12 e 14. ANOVA de uma via, $p < 0,05$. Resultados apresentados em Média±Erro Padrão. **AF2**: grupo suplementado com ração com 2mg/Kg; **AF20**: grupo suplementado com ração com 20mg/Kg. **a** = grupo controle, **b** = AF2, **c** = AF20

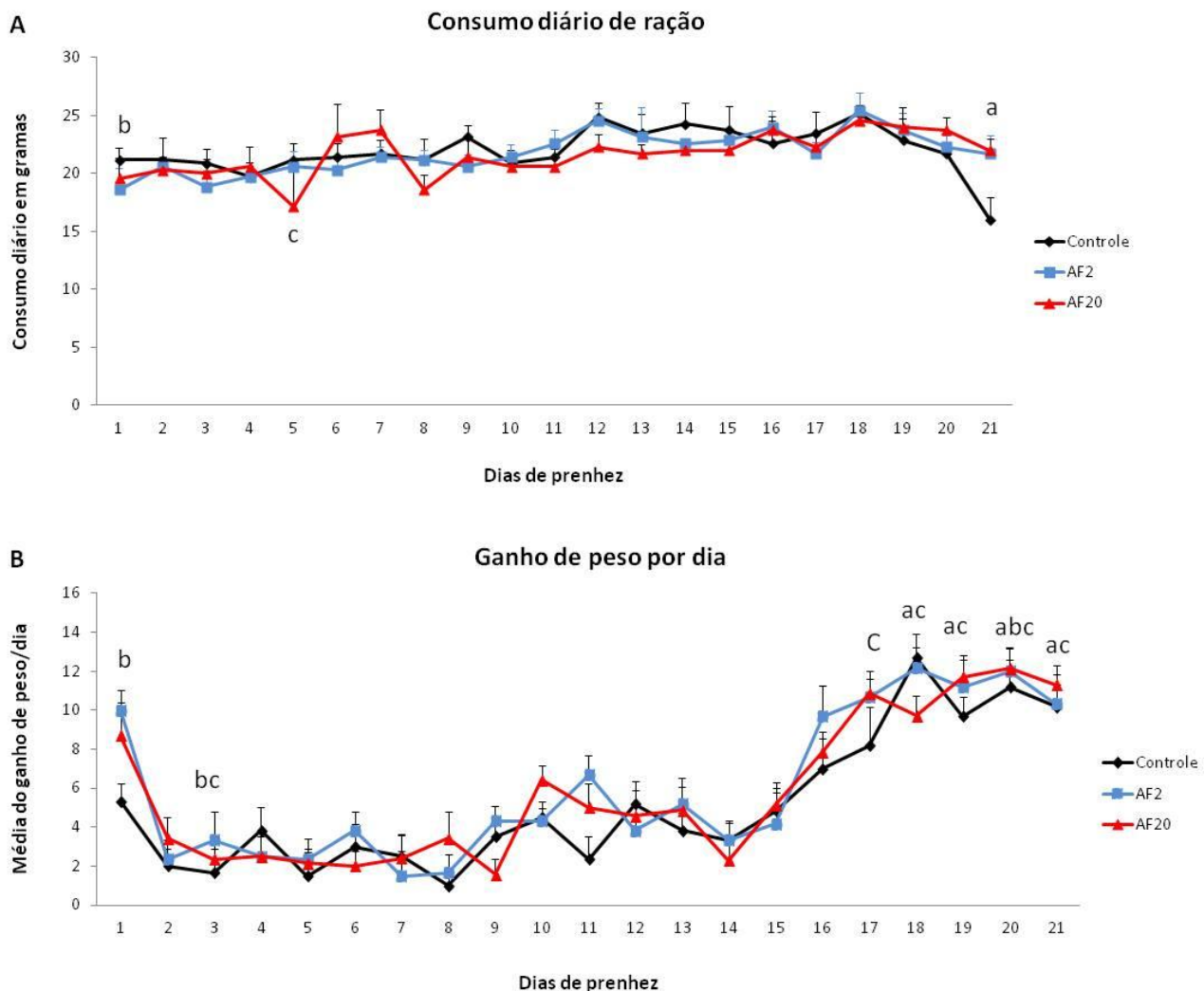
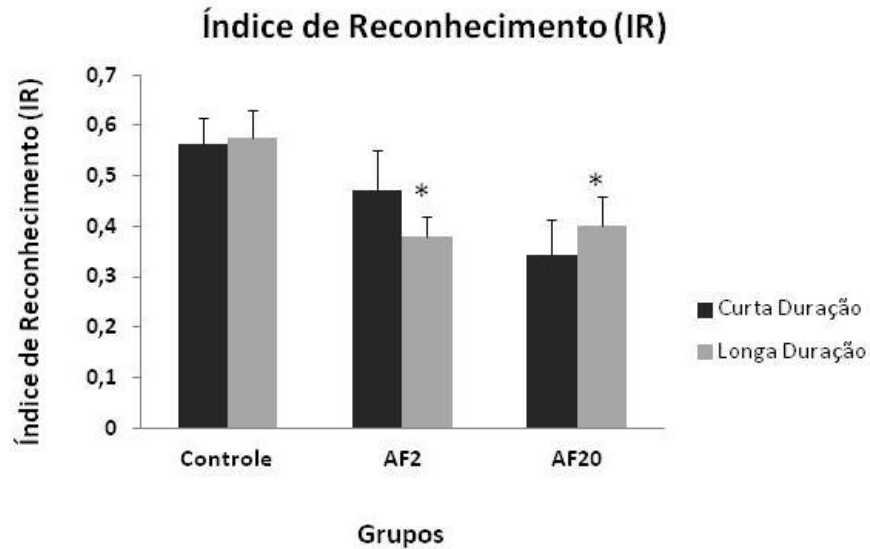
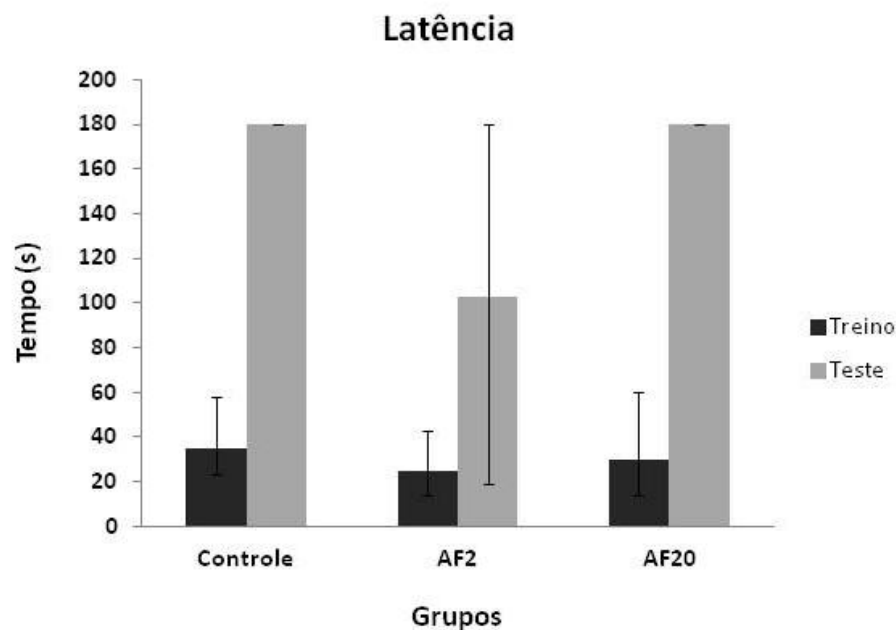


Figura 2

Teste de Reconhecimento de Objetos. Índice de Reconhecimento (IR) de memórias de curta e de longa duração. Resultados expressos em Média±Erro Padrão. *Diferença entre o grupo Controle e ambos os grupos suplementados, AF2 e AF20 ($p = 0,0216$ e $p = 0,0399$, respectivamente) na memória de longa duração. ANOVA de uma via seguida de Tukey, $P < 0,05$ ($p = 0,0153$). AF2: grupo suplementado com ração com 2mg/Kg; AF20: grupo suplementado com ração com 20mg/Kg.

**Figura 3**

Teste de Esquiva Inibitória. Latência para descer da plataforma. Resultados expressos em Mediana±Intervalo Interquartil. Kruskal-Wallis seguido de teste Dunn, $P < 0,05$ ($p = 0,0753$). AF2: grupo suplementado com ração com 2mg/Kg; AF20: grupo suplementado com ração com 20mg/Kg



REFERÊNCIAS

- Achón M, Reyes L, Alonso-Aperte E, Ubeda N, Varela-Moreiras. **High Dietary Folate Supplementation Affects Gestational Development and Dietary Protein Utilization in Rats.** *J. Nutr.* June 1, 1999, vol. 129 no. 6 1204-1208
- Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, Viola H, Pitossi F, Izquierdo I, Medina JH. **BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation.** *Hippocampus.* 2002;12(4):551-60.
- Alonso-Aperte, E. (1997) **Metabolismo de la metionina en rata gestante: Efectos de la ingesta dietaria de ácido fólico y administracion de valproato.** Doctoral thesis, San Pablo-CEU University, Madrid, Spain.
- Alves, Tânia Silene Gomes. **Efeitos da Fisioterapia na Qualidade de Vida da mulher durante o Período Gestacional: Revisão Sistemática.** Dissertação de Mestrado. Universidade Jean Piaget de Cabo Verde, 2012. Disponível em <<http://bdigital.unipiaget.cv:8080/dspace/bitstream/10964/499/1/monografia%20T%C3%a2nia.pdf>>
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante no anexo desta resolução. *Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF*, 18 de dezembro de 2002.
- Baluz K, Carmo, MGT, Rosas, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2002, 48(4): 597-60. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_48/v04/pdf/revisao5.pdf>. Acesso em 21 de novembro de 2015
- Barichello T, Generoso JS, Simões LR, Steckert AV, Moreira AP, Domingui D, Ferrari P, Gubert C, Kapczinski F, Jornada LK, Danielski LG, Petronilho F, Budni J, Quevedo J. **Folic acid prevented cognitive impairment in experimental pneumococcal meningitis.** *J Neural Transm (Vienna).* 2015 May;122(5):643-51. DOI: 10.1007/s00702-014-1302-3.
- Barua s, kuizon s, ted brown w, junaaid ma. **High gestational folic acid supplementation alters expression of imprinted and candidate autism susceptibility genes in a sex-specific manner in mouse offspring.** *J mol neurosci.* 2015 nov 7.
- Beard cm, panser la, katusic sk. **Is excess folic acid supplementation a risk factor for autism?** *Med hypotheses.* 2011 jul;77(1):15-7. Doi: 10.1016/j.mehy.2011.03.013.
- Bernal j, nunez j. **Thyroid hormones and brain development.** *Eur j endocrinol* (1995) 133:390–8.10.1530/eje.0.1330390
- Berrocal-Zaragoza MI, Sequeira JM, Murphy MM, Fernandez-Ballart JD, Abdel Baki SG, Bergold PJ, Quadros EV. **Folate deficiency in rat pups during weaning causes learning and memory deficits.** *Br J Nutr.* 2014 Oct 28;112(8):1323-32. DOI: 10.1017/S0007114514002116.

Brocardo Pde S, Budni J, Lobato KR, Kaster MP, Rodrigues AL. **Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway.** *Eur J Pharmacol.* 2008 Nov 19;598(1-3):37-42. Doi: 10.1016/j.ejphar.2008.08.033. Epub 2008 Sep 3.

Burdge, G.C., Lillycrop, K.A.. **Folic acid supplementation in pregnancy: are there devils in the detail?** *British Journal of Nutrition,* 108, 1924–1930, 2012. DOI:10.1017/S0007114512003765

Carletti, J. V., Deniz, B. F., Miguel, P.M., Rojas, J.R., Kolling, J., Scherer, E. B., Wyse, A. T. S., Netto, C.A., Pereira, L.O.. **Folic Acid Prevents Behavioral Impairment and Na⁺,K⁺-atpase Inhibition Caused by Neonatal Hypoxia–Ischemia.** *Neurochem Res* 37(8):1624-30, 2012. DOI 10.1007/s11064-012-0757-6

Carletti jv, deniz bf, rojas jj, miguel pm, kolling j, scherer eb, de souza wyse at, netto ca, pereira lo. **Folic acid can contribute to memory deficit and na⁺, k⁺- atpase failure in the hippocampus of adolescent rats submitted to hypoxia-ischemia.** *Cns neurol disord drug targets.* 2015 nov 10. [epub ahead of print]

Carter JY, Loolpapit MP, Lema OE, Tome JL, Nagelkerke NJ, Watkins WM. **Reduction of the efficacy of antifolate antimalarial therapy by folic acid supplementation.** *Am J Trop Med Hyg* 2005;**73**:166–70.

Chauveau P, Chadeaux B, Coudé M, Aupetit J, Kamoun P, Jungers P. **Long-term folic acid (but not pyridoxine) supplementation lowers elevated plasma homocysteine level in chronic renal failure.** *Miner Electrolyte Metab.* 1996;22(1-3):106-9.

Czeizel AE, Dudás. **Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation.** *N Engl J Med* 26: 1832–1835, 1992.

Ennaceur,A.,Delacour,J.,1988. **A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavior data.** *Behavioral Brain Research* 31, 47–59

Flavell & Lee. **Post-training unilateral amygdala lesions selectively impair contextual fear memories.** *Learn. Mem.* 2012. 19: 256-263© 2012 Cold Spring Harbor Laboratory Press DOI:10.1101/lm.025403.111

Halder R, Hennion M, Vidal RO, Shomroni O, Rahman RU, Rajput A et al. **DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory.** *Nat Neurosci.* 2015 Dec 14. doi: 10.1038/nn.4194. [Epub ahead of print]

Izquierdo, I., Schroder, N., Netto, C.A., Medina, J.H., 1999. **Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance task in rats through NMDA receptor and camkii-dependent mechanisms in the hippocampus.** *European Journal of Neuroscience.* 11, 3323 – 3328.

Izquierdo I, Cammarota M, Da Silva WC, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Mello P, Benetti F, Costa JC, Medina JH. **The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks.** *An Acad Bras Cienc.* 2008 Mar;**80**(1):115-27.

Joshi S, Rao S, Golwilkar A, Patwardhan M, Bhonde R. **Fish oil supplementation of rats during pregnancy reduces adult disease risks in their offspring.** J Nutr 133(10):3170-4, 2003.

Keating e, correira-branco a, araujo jr, meireles m, fernandes r, guardão l, guimarães jt, martel f, calhau c. **Excess perigestational folic acid exposure induces metabolic dysfunction in post-natal life.** J endocrinol. 2015 mar;224(3):245-59. Doi: 10.1530/joe-14-0448.

Landgren F¹, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg B, Andersson A, Brattström L. **Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effect of folic acid.** J Intern Med. 1995 Apr;237(4):381-8.

McLean C, Ferriero D. **Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Tern Infant.** Semin Perinatol 28: 425-432, 2004.

Ménard C., Quirion R. **Group 1 Metabotropic Glutamate Receptor Function and Its Regulation of Learning and Memory in the Aging Brain.** Front Pharmacol. 2012; 3: 182. doi: 10.3389/fphar.2012.00182

Mikael LG, Deng L, Paul L, Selhub J, Rozen R. **Moderately high intake of folic acid has a negative impact on mouse embryonic development.** Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 97(1):47-52, 2013.

Netto, C.A., Dias, R.D., Izquierdo, I., 1985. **Interactions between consecutive learnings: inhibitory avoidance and habituation.** Behavioral and Neural Biology 44, 512 – 520.

Netto, C.A., Dias, R.D., Izquierdo, I., 1986. **Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task.** Psychoneuroendocrinology 11, 437–446.

Organização Mundial da Saúde, 2013. **Diretriz: suplementação diária de ferro e ácido fólico em gestantes.** Disponível em <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/guidelines/daily_ifa_supp_pregnant_women/en/>. Acesso em 21 de novembro de 2015.

Pereira LO, Strapasson AC, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA (2008), **Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia–ischemia.** Brain Res 1218: 257–266.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993). **AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet.** J Nutr 123(11): 1939-51.

Sable PS, Dangat KD, Joshi AA, Joshi SR., **Maternal omega 3 fatty acid supplementation during pregnancy to a micronutrient-imbalanced diet protects postnatal reduction of brain neurotrophins in the rat offspring.** Neuroscience 217:46-55, 2012.

Sable P, Kale A, Joshi A, Joshi S. **Maternal micronutrient imbalance alters gene expression of BDNF, NGF, trkb and CREB in the offspring brain at an adult age.** *Int J Dev Neurosci* 34C:24-32, 2014.

Salim A, Tan E, Ilchyshyn A, Berth-Jones J. **Folic acid supplementation during treatment of psoriasis with methotrexate: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Br J Dermatol.* 2006 Jun;154(6):1169-74.

Schorah, H. Devitt, M. Lucock, *et al.* **The responsiveness of plasma homocysteine to small increases in dietary folic acid: a primary care study.** *Eur J Clin Nutr,* 52 (1998), pp. 407–411

Shapiro m. **Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps.** *Arch neurol.* 2001 jun;58(6):874-81.

Shooshtari, M. K., Moazedi, A. A., Parham, G. **Memory and Motor Coordination Improvement by Folic Acid Supplementation in Healthy Adult Male Rats.** *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 15, 1173-1179 2012.

Singh S, Trivedi R, Singh K, Kumar P, Shankar LR, Khushu S. **Diffusion tensor tractography in hypothyroidism and its correlation with memory function.** *J Neuroendocrinol.* 2014 Nov;26(11):825-33. DOI: 10.1111/jne.12193.

Sittig LJ, Herzing LB, Xie H, Batra KK, Shukla PK, Redei EE. **Excess folate during adolescence suppresses thyroid function with permanent deficits in motivation and spatial memory.** *Genes Brain Behav.* 2012 Mar;11(2):193-200. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2011.00749.x. Epub 2011 Dec 13.

Song J, Medline A, Mason JB, Gallinger S, Kim YI. **Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the *apc*min mouse.** *Cancer Res* 2000;60:5434–40.

Song J, Sohn KJ, Medline A, Ash C, Gallinger S, Kim YI. **Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in *Apc*^{+/-}*Msh2*^{-/-} mice.** *Cancer Res* 2000;60:3191–9.

Wheeler SM, Willoughby KA, McAndrews MP, Rovet JF. **Hippocampal size and memory functioning in children and adolescents with congenital hypothyroidism.** *J Clin Endocrinol Metabolism* (2011)96:E1427–34.10.1210/jc.2011-0119

Wheeler SM, McLelland ES, McAndrews MP, Rovet JF. **Hippocampal functioning and verbal associative memory in adolescents with congenital hypothyroidism.** *Front endocrinol (lausanne).* 2015; 6: 163 doi: 10.3389/fendo.2015.00163

Yajnik CS¹, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ, Bhat DS, Naik SS, Coyaji KJ, Joglekar CV, Joshi N, Lubree HG, Deshpande VU, Rege SS, Fall CH. **Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study.** *Diabetologia.* 2008 Jan;51(1):29-38. Epub 2007 Sep 13.

Zorec R., Horvat A., Vardian N., Verkhatsky A. **Memory Formation Shaped by Astroglia.** *Front Integr Neurosci.* 2015 Nov 17;9:56. doi: 10.3389/fnint.2015.00056. eCollection 2015

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com esse trabalho, foi possível observar que:

- O AF, tanto na dosagem recomendada (2mg/Kg) quanto na excessiva (20mg/Kg) foi capaz de prejudicar a formação da memória de longa duração avaliada através do Reconhecimento de Objetos;

- Em relação à memória de curta duração, embora não haja diferença pela estatística, existe uma tendência de prejuízo do grupo AF20 comparando-se com o grupo Controle.

- No teste de Esquiva inibitória, não se observaram resultados significativos comparando-se quaisquer grupos experimentais. No entanto, novamente existe uma tendência de significância entre o grupo Controle e o AF2.

- Ainda, em relação aos resultados, não se viu qualquer alteração motora nem características do tipo ansiedade entre os grupos avaliados no teste Campo Aberto.

Cabe ressaltar que nosso resultado se deu a partir de um n de animais parcial, portanto as tendências observadas no nesse estudo podem não se confirmar. Mais estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos nos quais o ácido fólico possa estar atuando. Por isso, nossas perspectivas são de aumentar o n de animais, realizar mais um teste comportamental avaliando especialmente memória (OX-Maze) a fim de correlacionar com dados obtidos previamente, além de analisar estruturas encéfalicas, em especial o hipocampo, através de imunistoquímica, analisando-se num primeiro momento marcação por BDNF e, posteriormente, GFAP e NeuN.

REFERÊNCIAS

- Achón M, Reyes L, Alonso-Apperte E, Ubeda N, Varela-Moreiras. **High Dietary Folate Supplementation Affects Gestational Development and Dietary Protein Utilization in Rats.** *J. Nutr.* June 1, 1999, vol. 129 no. 6 1204-1208
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante no anexo desta resolução. *Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF*, 18 de dezembro de 2002.
- Araújo JR, Martel F, Borges N, Araújo JM, Keating E. **Folates and aging: Role in mild cognitive impairment, dementia and depression.** *Ageing Res Rev.* 2015 Jul;22:9-19. DOI: 10.1016/j.arr.2015.04.005
- Asadi-Pooya, Ali A. **High dose folic acid supplementation in women with epilepsy: Are we sure it is safe?.** *European Journal of Epilepsy* 27, 51–53, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2015.02.030>
- Assanelli, D., Bonamone, A., Pezzini, A., Albertini, F., Maccali, P., Grassi, M., Archetti, S., Negrini, R., Visioli, F. **Folic Acid and Vitamin E Supplementation Effects on Homocysteinemia, Endothelial Function and Plasma Antioxidant Capacity in Young Myocardial-Infarction Patients.** *Pharmacology Research* 49, 79-84, 2004
- Bailey RL, Millis, JL, Yetley EA, Gahche, JJ, Pfeiffer, CM, Dwyer JT, Dodd KW, Sempos CT, Betz JM, Picciano MF. **Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged ≥60 y in the United States.** *Am J Clin Nutr* 2010;92:383–9. Printed in USA. 2010. DOI: 10.3945/ajcn.2010.29499
- Baluz K, Carmo, MGT, Rosas, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2002, 48(4): 597-60. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_48/v04/pdf/revisao5.pdf>. Acesso em 21 de novembro de 2015.
- Beard cm, panser la, katusic sk. **Is excess folic acid supplementation a risk factor for autism?** *Med hypotheses.* 2011 jul;77(1):15-7. Doi: 10.1016/j.mehy.2011.03.013.
- Budni j, zomkowski ad, engel d, santos db, dos santos aa, moretti m, valvassori ss, ornell f, quevedo j, farina m, rodrigues al. **Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice.** *Exp neurol.* 2013 feb;240:112-21. Doi: 10.1016/j.expneurol.2012.10.024. Epub 2012 nov 8.
- Burdge, G.C., Lillycrop, K.A.. **Folic acid supplementation in pregnancy: are there devils in the detail?** *British Journal of Nutrition*, 108, 1924–1930, 2012. DOI:10.1017/S0007114512003765
- Carletti, J. V., Deniz, B. F., Miguel, P.M., Rojas, J.R., Kolling, J., Scherer, E. B., Wyse, A. T. S., Netto, C.A., Pereira, L.O.. **Folic Acid Prevents Behavioral Impairment and Na⁺,K⁺-ATPase Inhibition Caused by Neonatal Hypoxia–Ischemia.** *Neurochem Res* 37(8):1624-30, 2012. DOI 10.1007/s11064-012-0757-6

Carletti JV, Deniz BF, Rojas JJ, Miguel PM, Kolling J, Scherer EB, De Souza Wyse AT, Netto CA, Pereira LO. **Folic acid can contribute to memory deficit and Na⁺, K⁺-ATPase failure in the hippocampus of adolescent rats submitted to hypoxia-ischemia.** *Cns Neurol Disord Drug Targets*. 2015 Nov 10. [epub ahead of print]

Carter JY, Loolpapit MP, Lema OE, Tome JL, Nagelkerke NJ, Watkins WM. **Reduction of the efficacy of antifolate antimalarial therapy by folic acid supplementation.** *Am J Trop Med Hyg* 2005;**73**:166–70.

Cawley, S., Mullaney, L., McKeating, A., Farren, M., McCartney., Turner, M.. **An analysis of folic acid supplementation in women presenting for antenatal care.** *Journal of Public Health Advance* pp. 1–8, 2015. DOI:10.1093/pubmed/fdv019

Czeizel AE, Dudás. **Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation.** *N Engl J Med* 26: 1832–1835, 1992.

Félicz TM (2002). **Metabolismo da Homocisteína e Defeitos do Tubo Neural: um Estudo Bioquímico e Molecular no Sul do Brasil.** 2002. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas: Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Ferreira AFS (2005). **Consumo de farináceos fortificados e de alimentos ricos em folatos por mulheres em idade fértil de Porto Alegre, RS, Brasil.** 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas: Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Health Canada, 2014. **Prenatal Nutrition Guidelines for Health Professionals Folate Contributes to a Healthy Pregnancy.** Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/pubs/nutrition/folate-eng.php>>. Acesso em 21 de novembro de 2015.

Houghton LA, Yang J, O'Connor DL. **Unmetabolized folic acid and total folate concentrations in breast milk are unaffected by low-dose folate supplements.** *Am J Clin Nutr* 2009;**89**:216–20. Printed in USA. 2009. DOI: 10.3945/ajcn.2008.26564

Jacques P.F., Selhub J., Bostom A.G. **The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations.** *N Engl J Med*, 340 (1999), pp. 1449–1454

Joshi S, Rao S, Golwilkar A, Patwardhan M, Bhonde R. **Fish oil supplementation of rats during pregnancy reduces adult disease risks in their offspring.** *J Nutr* 133(10):3170-4, 2003.

Keating E, Correia-Branco A, Araújo Jr, Meireles M, Fernandes R, Guardão I, Guimarães Jt, Martel F, Calhau C. **Excess perigestational folic acid exposure induces metabolic dysfunction in post-natal life.** *J Endocrinol*. 2015 Mar;**224**(3):245-59. Doi: 10.1530/joe-14-0448.

Lee J.H., Lee Y.A, Oh K.H, Chang N. **Effects of Dietary Folic Acid on the Expression of Myelin Basic Protein in the Brain and Spinal Cord of Pregnant and Lactating Rats.** *Ann Nutr Metab* 2010;**56**:83–90 (DOI:10.1159/000275945).

Matté C, Scherer EBS, Stefanello FM, Barschak AG, Vargas CR, Netto CA, Wyse ATS. **Concurrent folate treatment prevents Na⁺, K⁺-ATPase activity inhibition and memory**

impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat development. *Int J Dev Neurosci* 25: 545-552, 2007.

Mattson MP, Shea TB. **Folate and homocysteine metabolism in neuralplasticity and neurodegenerative disorders.** *Trends Neurosci* 26(3): 137-46, 2003.

Mclean C, Ferriero D. **Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Tern Infant.** *Semin Perinatol* 28: 425-432, 2004.

Mikael LG, Deng L, Paul L, Selhub J, Rozen R. **Moderately high intake of folic acid has a negative impact on mouse embryonic development.** *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 97(1):47-52, 2013.

Organização Mundial da Saúde, 2013. **Diretriz: suplementação diária de ferro e ácido fólico em gestantes.** Disponível em

<http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/guidelines/daily_ifa_supp_pregnant_women/en/>. Acesso em 21 de novembro de 2015.

Pfeiffer CM, Sternberg MR, Fazili Z, Yetley EA, Lacher DA, Bailey RL, Johnson CL. **Unmetabolized Folic Acid Is Detected in Nearly All Serum Samples from US Children, Adolescents, and Adults.** *J Nutr.* 2015 Mar;145(3):520-31. DOI: 10.3945/jn.114.201210. Epub 2014 Dec 10

Rosenberg IH. **Science-based micronutrient fortification: which nutrients, how much, and how to know?** *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 279–80.

Salim A, Tan E, Ilchyshyn A, Berth-Jones J. **Folic acid supplementation during treatment of psoriasis with methotrexate: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Br J Dermatol* 2006;154:1169–74

Salvalágio, andressa burgo. Ingestão de ácido fólico entre mulheres em idade fértil. Trabalho de conclusão de curso. Unifil – centro universitário filadélfia. Londrina, 2005.

Shooshtari, M. K., Moazedi, A. A., Parham, G. **Memory and Motor Coordination Improvement by Folic Acid Supplementation in Healthy Adult Male Rats.** *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 15, 1173-1179 2012.

Sittig LJ, Herzing LB, Xie H, Batra KK, Shukla PK, Redei EE. **Excess folate during adolescence suppresses thyroid function with permanent deficits in motivation and spatial memory.** *Genes Brain Behav.* 2012 Mar;11(2):193-200. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2011.00749.x. Epub 2011 Dec 13.

Smith, A David; Kim, Young-In; Refsum, Helga. **Is folic acid good for everyone?** *The American Journal Clinical Nutrition* 87:517–33, 2008.

Song J, Medline A, Mason JB, Gallinger S, Kim YI. **Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the apcMin mouse.** *Cancer Res* 2000;60:5434–40.

Song J, Sohn KJ, Medline A, Ash C, Gallinger S, Kim YI. **Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in Apc+/-Msh2-/- mice.** *Cancer Res* 2000;60:3191–9.

Stoltzfus r, dreyfuss m. **Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anaemia.** Washington, dc, ilsi press, 1998.

Sweeney MR, McPartlin J, Weir DG, et al. **Evidence of unmetabolised folic acid in cord blood of newborn and serum of 4-day-old infants.** *Br J Nutr*2005;**94**:727–30.

Takimoto h, hayashi f, kusama k, kato n, yoshiike n, toba m, ishibashi t, miyasaka n, kubota t. **Elevated maternal serum folate in the third trimester and reduced fetal growth: a longitudinal study.** *J nutr sci vitaminol (tokyo)*. 2011;**57**(2):130-7.

Troen AM, Mitchell B, Sorensen B, et al. **Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women.** *J Nutr* 2006;**136**:189–94

Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, et al. **Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study.** *Diabetologia* 2008;**51**:29–38.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NEUROSCIENCE



NEUROSCIENCE

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.1
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0306-4522

DESCRIPTION

Neuroscience publishes papers describing the results of original research on any aspect of the scientific study of the nervous system. Any paper, however short, will be considered for publication provided that it reports significant, new and carefully confirmed findings with full experimental details.
IBRO-DEF-02.jpg

AUDIENCE

Neuroscientists from all disciplines.

IMPACT FACTOR

2014: 3.357 © Thomson Reuters: Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Chemical Abstracts
Current Contents/ASCA
Current Contents/BIOMED Database
Current Contents/Life Sciences
Current Contents/SciSearch Database
Current Contents/Science Citation Index
MEDLINE®
EMBASE
PASCAL/CNRS
Scopus

EDITORIAL BOARD

Chief Editor

S.G. Lisberger, Dept. of Neurobiology, Duke University School of Medicine, 311 Research Drive, Durham, NC 27710, North Carolina, USA

Associate Editor

E.C. Hirsch, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 5075, Paris, France

Board of Section Editors

Y. Bozzi, Università di Trento, Trento, Italy
 S.M. Carlton, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA
 M.T. Carrì, Università di Roma "Tor Vergata", Roma, Italy
 E. Coffey, Turku Centre for Biotechnology, Turku, Finland
 J. Fudge, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York, USA
 L. Galea, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada
 R.F. Hevner, University of Washington, Seattle, Washington, USA
 T. Iaa, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan
 M. Knipper, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Germany
 H. Luhmann, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Germany
 S. Olliet, Institut Francois Magendie, Bordeaux, France
 E.M. Powell, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA
 J. Saanes, Warren Alpert Medical School at Brown University, Providence, Rhode Island, USA
 R. Schmidt-Kastner, Florida Atlantic University, Boca Raton, Florida, USA
 S.R. Sesack, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
 G. Spark, Medizinische Universität Innsbruck, Innsbruck, Austria

Editorial Board

G. Arbutnot, Okinawa Inst. of Science & Tech., Kunigami gun, Japan
 T. Arendt, Universität Leipzig, Leipzig, Germany
 E. Aronica, Academic Medical Centre (AMC), Amsterdam, Netherlands
 K. Arvin, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA
 M. Barrot, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Strasbourg, France
 M. Besson, Université de la Méditerranée, Cedex, Marseille, France
 M.D. Bevan, Northwestern University, Chicago, Illinois, USA
 E. Bezard, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France
 W.W. Blessing, Flinders University Medical Centre, Adelaide, South Australia, Australia
 S. Bookheimer, UCLA Health System, Los Angeles, California, USA
 K. Borges, University of Queensland, St. Lucia, Queensland, Australia
 P. Brundin, Van Andel Institute, Michigan, Missouri, USA
 M.F. Casanova, University of Louisville, Louisville, Kentucky, USA
 L. Chalazzi, Università degli Studi di Verona, Verona, Italy
 B. Christie, University of Victoria, Victoria, British Columbia, Canada
 C. Conrad, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA
 D.P. Crewther, Swinburne University of Technology, Victoria, Victoria, Australia
 L. Della Corte, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italy
 A. Draguhn, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg, Germany
 F.E. Dudek, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA
 M.B. Dutilleul, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK
 B. Firestein, Rutgers University, Piscataway, New Jersey, USA
 S. Fioravante, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada
 G. Förster, University of South Dakota, South Dakota, USA
 T.F. Freund, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary
 M. Frotscher, Universität Hamburg, Hamburg, Germany
 A. Fukuda, Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka, Japan
 C.M. Gall, University of California at Irvine, Irvine, California, USA
 C. Glaume, Collège de France, Paris, France
 A. Giraud, Ecole Normale Supérieure de Paris, Paris, France
 S.G.N. Grant, The Sanger Institute, Cambridge, UK
 I. Hanganu-Opatu, Universität Hamburg, Hamburg, Germany
 M. Harrington, Smith College, Northampton, Massachusetts, USA
 S. He, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China
 D. Heck, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, Tennessee, USA
 M. Hill, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada
 P.R. Hof, MSSM-Ichan Medical Institute, New York, New York, USA
 R.L. Hyson, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA

R. Insausti, University of Castilla La Mancha, School of Medicine, Albacete, Spain
 N. Ip, Hong Kong University of Science & Technology, Kowloon, Hong Kong
 D. Jaeger, Emory University, Atlanta, Georgia, USA
 P.H. Janak, University of California at San Francisco (UCSF), Emeryville, California, USA
 R-R. Ji, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
 B.E. Jones, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
 G. Ju, Fourth Military Medical University, Xi'an, China
 H. Keirstead, University of California at Irvine, Irvine, California, USA
 S. Kitazawa, Osaka University, Osaka, Japan
 M. Kokala, Lund University, Lund, Sweden
 S. Konishi, University of Tokyo, Tokyo, Japan
 O.A. Kriahel, Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine
 L. Lanfumey, INSERM, Paris, France
 H. Lassmann, Medizinische Universität Wien, Wien, Austria
 P. Lavenex, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland
 J. Lerma, Instituto Cajal, Madrid, Spain
 J.D. Levine, University of California at San Francisco (UCSF), San Francisco, California, USA
 P. Lucassen, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, Netherlands
 M.S. Malmarica, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain
 C.M. McCormick, Brock University, St. Catharines, Ontario, Canada
 T.A. Milner, Weill Cornell Medical College, New York, New York, USA
 O. Neale-Taylor, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA
 D. Pare, Rutgers University, Newark, New Jersey, USA
 T. Perrot, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada
 P.M. Pilowsky, University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia
 A. Planas, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Barcelona, Spain
 L. Puelles, Universitat de Lleida, Murcia, Spain
 G.J. Quirk, Ponce School of Medicine, Ponce, Puerto Rico
 T.E. Salt, University College London (UCL), London, UK
 H. Scharfman, Nathan S. Kline Institute, Orangeburg, New York, USA
 B. Setlow, University of Florida, McKnight Brain Institute, Gainesville, Florida, USA
 R. Shigemoto, National Institute for Physiological Sciences, Aichi, Japan
 J. Staiger, Georg-August Universität Göttingen, Germany
 C. Steinhäuser, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, Germany
 C.L. Stuckey, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, USA
 T.C. Südhof, Howard Hughes Medical Institute (HHMI), University of Texas, Dallas, Texas, USA
 Y. Tache, UCLA Health System, Los Angeles, California, USA
 L. Tan, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong
 M. Tanaka, Hokkaido University, Sapporo, Japan
 M.J. Tarr, Brown University, Providence, Rhode Island, USA
 J.M. Tepper, Rutgers University, Newark, New Jersey, USA
 D. Theodosis, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France
 A. Todd, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK
 K. Unsicker, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Germany
 A. Vezzani, Mario Negri Istituto di Ricerche Farmacologiche IRCCS, Milano, Italy
 N. Wenderoth, Catholic University of Leuven, Heverlee, Netherlands
 T. Wichmann, Emory University, Atlanta, Georgia, USA
 D.S. Zahm, St. Louis University, St. Louis, Missouri, USA
 R.E. Zigmond, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA

Editorial Assistant

S. Joachim

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Neuroscience publishes the results of original research on any aspect of the scientific study of the nervous system. Papers most suitable for publication are those that report new observations that directly contribute to our understanding of how the nervous system works. Any paper, however short, will be considered for publication provided that it reports significant, new and carefully confirmed findings with full experimental details.

Neuroscience does not have page or figure restrictions, and authors are encouraged to write complete papers that contain all the data necessary to present their findings persuasively.

Editorial Organisation

The Chief and Associate Editors seek advice from Section Editors representing all major areas of research: Cellular and Molecular Neuroscience Cognitive, Behavioral, and Systems Neuroscience Neurodegeneration, Neuroprotection and Disease-Oriented Neuroscience Pain Mechanisms and Sensory Neuroscience Regeneration, Repair, and Developmental Neuroscience

Section Editors suggest appropriate reviewers and also recommend an editorial decision based on the reviews.

Each paper is typically evaluated by at least two Editors or ad hoc reviewers. Papers are accepted by the Chief and Associate Editors in consultation with the appropriate Section Editor.

Stephen G. Lisberger, Dept. of Physiology, University of California School of Medicine, San Francisco, CA, USA; sgl@phy.ucsf.edu

Etienne C. Hirsch, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 5975, Paris, France; etienne.hirsch@upmc.fr

Section Editors (and specialties)

Yuri Bozzi (cellular and molecular neuroscience), Centre for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy

Susan M. Carlton (pain mechanisms), Dept. of Neuroscience and Cell Biology, University of Texas, Galveston, TX, USA

Maria Teresa Carri (cellular and molecular neuroscience), Dept. of Biology, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

Eleanor Coffey (molecular neuroscience), Turku Centre for Biotechnology, Åbo Akademi University and University of Turku, Turku, Finland

Julie Fudge (systems neuroscience, functional neuroanatomy), School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, Rochester, NY, USA

Liisa Galea (behavioral neuroendocrinology, cognition, stress, aging), Dept. of Psychology University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Robert F. Hevner (development, stem cells, repair), Dept. of Pathology, University of Washington, Seattle, WA, USA

Tadashi Isa (Systems neuroscience), Dept. Of Developmental Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan

Lutz Jäncke (cognitive neuroscience, motor control), Institute of Psychology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

Marlies Knipper (sensory neuroscience), Dept. of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Tübingen Hearing Research Centre, Tübingen, Germany

Heiko Luhman (cellular neuroscience), Inst. of Physiology and Pathophysiology, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Germany

Stéphane Oliet (cellular neuroscience), Dept of Neuroscience, Institut Francois Magendie, Bordeaux, France

Elizabeth M. Powell (behavioural neuroscience, learning and memory), Dept of Anatomy and Neurobiology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Rainald Schmidt-Kastner (neuroprotection, cerebral ischemia), C.E. Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University, Boca Raton, FL, USA

Susan Sesack (pharmacology, drugs of abuse, behavior), Dept. of Neuroscience, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

Günther Sperk (molecular/cellular approaches to systems and disease), Dept. Of Pharmacology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

The Neuroscience Peer Review Consortium

Neuroscience is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Neuroscience* and indicate that the referees' reports from the first journal be made available to the Editors of *Neuroscience*.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Neuroscience*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Neuroscience* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to *Neuroscience's* specification and submit the paper to *Neuroscience* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that the authors will ask for the referee's reports to be forwarded from the first Consortium journal. The authors then must contact the first journal, and ask that reviews be forwarded, indicating they have submitted to *Neuroscience*, and providing the new manuscript ID number.

The Editors of *Neuroscience* will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

Types of Papers

(a) *Research papers*. These are full-length papers describing original research. There are no specific page limits although authors are encouraged to be as concise as possible and to use as few, high quality illustrations as necessary to adequately document their findings. Former rapid reports that describe outstanding new discoveries fall under this category and should follow the same layout as research papers. All papers are handled rapidly.

(b) *Reviews* (previously known as *Commentaries*). These are short articles (3,000 to 10,000 words in length), not exhaustive reviews, that are intended to either draw attention to developments in a specific area of research, to bring together observations that seem to point the field in a new direction, to give the author's personal views on a controversial topic, or to direct soundly based criticism at some widely held dogma or widely used technique in neuroscience. Reviews may also provide an historical perspective on an area of neuroscience research. Authors should make their Review understandable to a broad spectrum of neuroscientists. Potential authors are invited to submit a letter of interest to the Section Editor for Reviews and Special Issues or to the Chief or Associate Editors indicating the topic of a potential Review. Proposals for reviews or commentaries should also contain an outline of the contents, including an abstract (200 words), a list of 10 relevant articles including 5 from the proposer's own research, and a brief statement on why now is a good time to review the topic in question. Reviews will not be accepted for editorial processing unless pre-approved for submission.

(c) *Neuroscience Forefront Reviews*. These are invited reviews from a select list of scientists who have introduced new concepts, models, or methods in neurobiology. Forefront Reviews enable the authors to express their own opinions in a rigorous way. There is no page limit and the author/authors may choose the focus of the review as long as it remains scientifically sound. The reviews will be promoted through IBRO's websites and publications, and will be highly visible in the scientific community.

(d) *Special Issues*. These are published as separate volumes with prominent neuroscientists as guest editors. Special Issues are devoted to specific topics, preferably "emergent topics" that open new fields in neurobiological research. The Special Issues are used actively in the promotion of *Neuroscience*.

A Special Issue is not a loose collection of topically related articles but a concerted attempt to provide an overview of the status of an emerging field. Cross references between the articles are strongly encouraged.

A Special Issue should normally contain 20-25 articles, corresponding to 200-300 printed pages in total. The articles may include original data. At least one of the articles (typically signed by the guest editors) should provide a general discussion of the implications of the recent advances in the field, and should attempt to identify the directions and challenges of future research.

Manuscripts are subjected to the review process according to the same high standards of quality as regular issues of *Neuroscience*. The Guest Editor(s) identify reviewers and take responsibility for the further editorial handling of the manuscripts, supported by the San Diego office. As for regular papers, the final decision on each article is taken by the Chief Editor.

Suggestions for special issues should be sent to Prof. Stephen Lisberger, Editor-in-Chief, at sgl@phy.ucsf.edu. They should contain an outline of the contents, including an abstract (200 words), a list of articles with preliminary titles and contributors, and a brief statement on why now is a good time to review the topic in question.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on **Ethics in Publishing** and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

All submissions to *Neuroscience* must contain experiments that conform to the ethical standards printed below. To confirm their agreement with this, authors are required to include the following statement in their cover letter indicating their agreement with these standards: "I have read and have abided by the statement of ethical standards for manuscripts submitted to *Neuroscience*." A list of ethical standards is not required in the cover letter.

Policy and ethics

The authors declare that all experiments on human subjects were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> and that all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects.

The authors also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the human subjects review board of their institution and could be provided upon request.

If the studies deal with animal experiments, the authors certify that they were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996 or the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, or the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

The authors also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the animal subjects review board of their institution and could be provided upon request.

The authors further attest that all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

If the ethical standard governing the reported research is different from those guidelines indicated above, the authors must provide information in the submission cover letter about which guidelines and oversight procedures were followed.

The Editors reserve the right to return manuscripts in which there is any question as to the appropriate and ethical use of human or animal subjects.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts

Before the accepted manuscript is published in an online issue Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: The reason the name should be added or removed or the author names rearranged. Written confirmation (email, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests. Publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue

Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 2200, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission address

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/nsc>.

Authors are strongly encouraged to use this Web-based submission system. However, for those who are unable to submit via the Web, please contact neuroscience@journal-office.com or Neuroscience Editorial Office, 525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101, USA; FAX: 619-699-6859.

Referees

It is in your best interest to suggest some suitable reviewers and we request that you do so. You may suggest up to 6 reviewers. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information

All manuscripts are subject to any modifications required by the Editorial Office to conform to Journal policy.

Cover Illustrations

Authors are encouraged to submit visually and scientifically interesting figure(s) representative of their data, though not necessarily as they appear in the manuscript, for potential cover illustrations (see specific instructions for submission of cover art under *PREPARATION / Color Artwork* below). The use of illustrations for journal covers is at the discretion of the Editors; only those related to articles accepted for publication will be considered. At the end of each year, all published covers will automatically be considered in a competition for the year's best cover illustration, and will be judged on their aesthetic value and scientific interest. Submitted cover images not created by the author group must include the reprint permission and source. The author(s) of the winning image will receive US\$ 500 from Elsevier.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscripts should be written in English in a concise and understandable style. Technical jargon or "laboratory slang" should not be used. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that the manuscript is written in a style that is grammatically correct and free of spelling or other typographical errors.

All manuscripts must be typewritten with double-spacing throughout and with margins at least 2.5 cm wide. Pages should be numbered in succession, the title page being no. 1.

The Editorial Office reserves the right to revise the wording of manuscripts accepted for publication in the journal.

Subdivision

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Research papers should be organized in the following four main sections: Introduction, Experimental Procedures, Results, Discussion

Reviews should have an introductory section, followed by several information presentation sections and then end with a conclusion section. Section headings should be used to organize the presentation of information.

Introduction

This should provide the scientific rationale for the research that is reported. No heading "Introduction" should be used, and no results should be presented.

Experimental procedures

Procedures used in the research should be described in sufficient detail to permit the replication of the work by others. Previously published procedures should be referenced and briefly summarized. The source of all materials, including animals and human tissue, must be provided. The location of each supplier should be detailed on first use in the text. The author(s) also agree(s) to make freely

available to colleagues in academic research any clones of cells, nucleic acids, antibodies, etc. that were used in the research reported and that are not available from commercial suppliers. Authors must clearly describe all manipulations made to digital data that were collected as images, and images which have been scanned and printed for publication.

Results

This section presents findings without discussion of their significance. Subsections should be used in order to present results in an organized fashion.

Discussion

This section presents the authors' interpretations of their findings and an assessment of their significance in relation to previous work. Avoid repetition of material presented in the Results section. The Results and Discussion sections may not be combined.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of the Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly (in less than 300 words) the purpose of the research and the principal results obtained. The abstract should conclude with a final statement summarizing the major conclusions in such a way that the implications of the work to the field would be clear to a general neuroscience reader. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 125 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

The excessive use of abbreviations in the text is strongly discouraged. In order to aid communication between scientists of different disciplines, authors should only use abbreviations sparingly and should always define the abbreviation when first used in the text by placing it in parentheses after the full term, e.g. acetylcholinesterase (AChE). The abbreviations should then be used consistently thereafter and appear at least twice in the text. A comprehensive list of the abbreviations used should be put on a separate page that follows the title page.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). It is the corresponding author's responsibility to insure that individuals who are acknowledged for assistance or for providing comments on the manuscript are agreeable to being acknowledged in this way.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUGS: Nomenclature for geological time scales/rock names: <http://www.iugs.org/> for further information.

Symbols for physical units should be restricted to the Systems Internationale (S.I.) Units. Drug names should be the official or approved names; trade names or common names may be given in brackets where the drug is first mentioned. The manufacturer's name must be given. The doses of the drugs should be given as unit weight/unit body weight, e.g. mmol/kg or mg/kg.

Artwork

Electronic artwork

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

- Do not supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Do not supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Do not supply files that are too low in resolution;
- Do not submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Cover art

Illustrations to be considered for the cover should be related to the authors' submitted article and be representative of their data, but need not necessarily be as they appear in the manuscript. Cover art should be formatted to occupy the entire 8.5 X 11 inch cover and should be submitted in digital format (TIFF, Photoshop, JPEG or Powerpoint) with a resolution of at least 300 dpi. Please also include a descriptive text with your cover art submission. The files should be uploaded to a specified FTP site. Please contact the Editorial Office at neuroscience@journal-office.com for instructions. For authors who wish to postal mail a CD with the cover art, please send it to: Neuroscience Editorial Office, 525 B Street, Suite 1700, San Diego, CA 92101, U.S.A. Please ensure that the manuscript reference number is included on all materials.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

The reference list should be included at the end of the main text. A paper which has been accepted for publication but which has not appeared may be cited in the reference list with the abbreviated name of the journal followed by the words "in press". See Reference Style below.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Personal Communications may be used only when written authorization from the communicator is submitted with the original manuscript; they may be mentioned only in the text and in the following form: (G.H. Orwell, Department of Psychiatry, University of Washington, personal communication). Unpublished or submitted experiments by one of the authors may be mentioned only in the text, not in the References. Initials, as well as surnames, must be given for authors whose unpublished experiments are quoted: (M.L. King, unpublished observations).

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference to arXiv

As with unpublished results and personal communications, references to arXiv documents are not recommended in the reference list. Please make every effort to obtain the full reference of the published version of an arXiv document. If a reference to an arXiv document must be included in the references list it should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the volume and page numbers with 'arXiv:YYMM.NNNN' or 'arXiv:arch-ive/YYMMNNN' for articles submitted to arXiv before April 2007.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/neuroscience>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

In the text, references should be quoted as the name of the first author and year in chronological order. Multiple authors are indicated by "et al.", except when there are only two authors, in which case both names are written. For example, The pattern of the pathology instead represents a synaptically connected network of neurons (Braak and Braak, 1991; Morris, 1997). This hypothesis was recently proposed by Nagy et al. (1997).

The reference list should be on a separate page at the end of the manuscript, in **alphabetical order** and arranged as follows: authors' names and initials, year; title of the article, abbreviated title of the journal, volume, first and last page numbers. Journal titles should be abbreviated according to the rules adopted in the fourth edition of the World List of Scientific Periodicals (Butterworths, 1965). **Note that first and last pages are given in full.** For example, Nagy ZA, Esiri MM, Cato A-M, Smith AD (1997), Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropath* 94:6-15.

References to books should include the authors' names and initials, year, title of book, volume, publisher, place of publication and page numbers. Where relevant, the title of a paper within a book, and the editor's name(s) should be given. For example, Morris JH (1997) Alzheimer's disease. In: The neuropathology of dementia, vol. 2 (Esiri MM, Morris JH, eds), pp 70-121. Cambridge: Cambridge University Press.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body

text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Neuroscience accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, sound clips, videos, and other formats that cannot yet be embedded in our standard PDF files. Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: www.sciencedirect.com. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at www.elsevier.com/artworkinstructions.

For Neuroscience, authors are allowed to post supplementary material for review, but for publication supplementary material will be restricted to formats that cannot be published in the standard form of a PDF, such as movies.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

3D neuroimaging

You can enrich your online articles by providing 3D neuroimaging data in NIFTI format. This will be visualized for readers using the interactive viewer embedded within your article, and will enable them to: browse through available neuroimaging datasets; zoom, rotate and pan the 3D brain reconstruction; cut through the volume; change opacity and color mapping; switch between 3D and 2D projected views; and download the data. The viewer supports both single (.nii) and dual (.hdr and .img) NIFTI file formats. Recommended size of a single uncompressed dataset is maximum 150 MB. Multiple datasets can be submitted. Each dataset will have to be zipped and uploaded to the online submission system via the '3D neuroimaging data' submission category. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading a dataset. Note: all datasets will be available for downloading from the online article on ScienceDirect. If you have concerns about your data being downloadable, please provide a video instead. For more information see: <http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
 - Full postal address
 - Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Cover letter includes your agreement to the ethical standards: "I have read and have abided by the statement of ethical standards for manuscripts submitted to Neuroscience," as well as the other statement that all authors have approved the final article.
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

See also the IBRO Website <http://www.ibro.org>

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with 25 free paper offprints, or, alternatively, a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication.

Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

See also the IBRO Website www.ibro.org

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 28136

Título: O EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO EM RATAS PRENHESES SOBRE PARÂMETROS FUNCIONAIS, MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS NA PROLE, SUBMETIDOS OU NÃO A HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LENIR ORLANDI PEREIRA SILVA - coordenador desde 01/01/2015
SILVIA BARBOSA - Técnico de Laboratório desde 01/01/2015
Jaqueline Vieira Carletti - Aluno de Doutorado desde 01/01/2015
Bruna Ferrary Deniz - Aluno de Doutorado desde 01/01/2015
PATRÍCIA MAIDANA MIGUEL - Aluno de Doutorado desde 01/01/2015
IOHANNA DECKMANN - desde 01/01/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 23/02/2015 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 152 ratos Wistar(40 machos e 112 fêmeas) e 672 filhotes, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 9 de Março de 2015

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE

Vice Coordenador da comissão de ética