



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO - CENTRO DE CIÊNCIAS
MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS
DO COMPORTAMENTO

EULÁLIA REBECA DA SILVA ARAÚJO

**NUTRIÇÃO E PLASTICIDADE FENOTÍPICA:
efeitos do tratamento crônico com
diferentes doses de riboflavina sobre
o desenvolvimento sensório-motor e
somático em ratos neonatos**

Recife
2024

EULÁLIA REBECA DA SILVA ARAÚJO

**NUTRIÇÃO E PLASTICIDADE FENOTÍPICA:
efeitos do tratamento crônico com
diferentes doses de riboflavina sobre
o desenvolvimento sensório-motor e
somático em ratos neonatos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.
Área de concentração: Neurociências.

Orientador (a): Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Coorientador (a): Prof. Dra. Ana Elisa Toscano

Recife
2024

Catálogo na fonte:
Elaine Freitas, CRB4:1790

A663n Araújo, Eulália Rebeca da Silva
Nutrição e plasticidade fenotípica: efeitos do tratamento crônico com diferentes doses de riboflavina sobre o desenvolvimento sensorio-motor e somático em ratos neonatos / Eulália Rebeca da Silva Araújo. – 2024.
71 p. : il.

Orientador: Raul Manhães de Castro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Médicas. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Recife, 2024.

Inclui referências e anexo.

1. Riboflavina. 2. Sistema nervoso. 3. Plasticidade do desenvolvimento. 4. Período neonatal. I. Castro, Raul Manhães de (orientador). II. Título.

616.73 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS 2024 - 161)

EULÁLIA REBECA DA SILVA ARAÚJO

**NUTRIÇÃO E PLASTICIDADE FENOTÍPICA:
efeitos do tratamento crônico com
diferentes doses de riboflavina sobre
o desenvolvimento sensório-motor e
somático em ratos neonatos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.
Área de concentração: Neurociências.

Aprovada em: 24/05/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes (Examinador externo)
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Luiz Alberto Reis Mattos Junior (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos que me ensinam, diariamente, sobre o amor.

AGRADECIMENTOS

A Ti, Senhor, toda a minha gratidão e amor incondicional!

Aos meus pais, irmã e sobrinho, pelo amor, força e proteção. Eu amo vocês.

Bela, Léa e Mel (minhas pets), por todo amor e carinho.

À memória de Dinho, o meu eterno colorido.

Aos meus padrinhos, tios e tias, pela ajuda emocional, espiritual e financeira para que eu pudesse permanecer realizando o meu sonho. Sem vocês, jamais teria conseguido. Em especial, ao meu padrinho Dudu, tia Lurdes, madrinha Karinni, tio César, titio Luiz, tia Érika e tia Valdete.

À toda minha família, especialmente para os avós mais doces do mundo.

À minha amiga Paulinha, pela troca de conhecimento, abraços, risadas, conselhos, karaokês, drinks e sermões; pelo piercing que colocamos juntas e por todas as ligações e memes aleatórios ao longo dos anos. Nosso elo é sólido e sei que permanecerá por todo o sempre. Sem você não teria chegado até aqui, amiga, você sabe muito bem disso. A minha vida ama a sua.

Às minhas amigas Helô e Catarina, pelo amor e parceria de toda a vida.

Aos meus queridos Eri, Jaclécio, João Vitor, Ezequias, Keitiane, Caio e Kauê, pela amizade de anos.

Ao meu presente da FESBE, Vitor, por todos os momentos “doces” e especiais. Como é bom compartilhar a vida com você.

À Adriana, minha ‘hermanita del corazón’.

Gratidão a todos os outros amigos de vida que estiveram comigo durante mais essa

etapa.

A todos os meus amigos de infância, do Colégio Pentágono e também da Universidade. Especialmente aos meus eternos monitorandos da turma de Fisiologia. Vocês representam histórias lindas em meu caminho.

Ao meu orientador, Dr. Raul, que foi a minha bússola em diversos rumos. As nossas histórias ficarão sempre registradas em meu coração. Como já lhe disse uma vez: “Tô com você até a morte. Eu sei, você faria o mesmo”. E como senhor já me falou: “Seja o que vier. Venha o que vier”. Gratidão por me escolher e me aceitar.

À professora Ana Elisa, minha co-orientadora, por todo auxílio, conhecimento e braços abertos para mim. Também à sua família linda, que esteve por várias vezes, oferecendo-me carinho e companhia. Especialmente, à Luana Toscano.

Às professoras Sandra, Matilde e Tereza Deiró.

Gratidão a uma professora da graduação, muito especial, Janaína Viana de Melo.

Ao doutor França, o veterinário mais inteligente que já conheci. Uma pessoa brilhante, de coração enorme, que tão bem me acolheu e me instruiu no que eu deveria aprender para minha pesquisa. Agradecer-lhe apenas pelos animais e treinamento seria pouco perto do que me ensinou sobre o mundo.

Ao professor Eduardo Padrón, sobretudo pela sua parceria no doutorado direto.

A todo o Colegiado do Programa.

Ao professor Sebastião Rogério.

Aos meus colegas de laboratório por toda companhia, trocas e conhecimentos compartilhados ao longo dos anos.

À minha IC, Laíza, pela parceria e amizade que levarei para sempre.

Ao grupo “Peixinhos do Professor Raul”.

À banca julgadora, constituída por excelência pela Profa. Belmira, Prof. Dr. Luiz Alberto e Prof. Rodrigo Mello.

Gratidão ao Prof Omar, Dra Luz e suas equipes, que tão bem me receberam durante o meu estágio no México.

Gratidão a Dr. Bruno e Dra. Catharina por fornecerem os animais utilizados em minha pesquisa.

À CAPES.

Ao meu médico, Dr. Hugo, e à minha psicóloga, Dra. Rafaela, por todo esforço realizado para que eu estivesse firme e saudável durante esses anos.

Às minhas inúmeras versões... Como aprendi a me amar e me respeitar durante esses anos.

À vida.

“Guarda-me como à menina dos teus olhos;
esconde-me à sombra das tuas asas”.

(Salmo 17:8)

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos do tratamento crônico com diferentes doses de riboflavina (vitamina B2) sobre o desenvolvimento sensório-motor e somático e parâmetros neuromotores em ratos neonatos. 48 machos da linhagem *Wistar* foram distribuídos em quatro grupos experimentais: Controle (C, 0 mg/kg de B2), Riboflavina 1 (R1, 1 mg/kg de B2), Riboflavina 2 (R2, 10 mg/kg de B2) e Riboflavina 3 (R3, 100 mg/kg de B2). O tratamento em suas respectivas doses foi realizado por via subcutânea durante os dias P1 ao P21. Como resultados, os reflexos de recuperação de decúbito ($p < 0,0001$), colocação pelas vibrissas ($p < 0,0001$), aversão ao precipício ($p < 0,0001$), geotaxia negativa ($p < 0,01$) e queda livre ($p < 0,05$) foram acelerados para os animais R3. Igual modo, a abertura ocular ($p < 0,01$), a erupção dos incisivos superiores ($p < 0,01$) e a erupção dos incisivos inferiores ($p < 0,05$) foram mais precoces para o grupo R3. Com relação ao desenvolvimento físico, os animais R3 apresentaram menor ganho de peso corporal em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). A marcha em CatWalk demonstrou números reduzidos de steps ($p < 0,05$) e cadência ($p < 0,01$) para os animais R3, que constituem parâmetros associados ao gasto de energia cinética. Ademais, em campo aberto, o grupo R3 apresentou menor gasto energético (J) ($p < 0,05$). A força muscular mostrou-se padronizada para os grupos ($p > 0,05$), assim justificando os achados relacionados ao peso dos tecidos, que foram padronizados para todos os animais. Todos os ratos tratados com diferentes doses de riboflavina apresentaram melhor coordenação motora e equilíbrio nas barras paralelas (R1 e R2: $p < 0,05$; R3: $p < 0,01$), mas apenas o grupo R3 apresentou aumento no índice hepatossomático, um indicador do conteúdo de glicogênio hepático. Nossos resultados sugerem que altas doses de riboflavina, durante o período neonatal, estimulam o desenvolvimento sensório-motor e somático e reduzem a energia investida no crescimento, ganho de peso corporal e gasto calórico durante a atividade.

Palavras-chave: vitamina B2; sistema nervoso; plasticidade do desenvolvimento; período neonatal.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of chronic treatment with different doses of riboflavin (vitamin B2) on sensorimotor and somatic development and neuromotor parameters in neonatal rats. 48 Wistar males were distributed into four experimental groups: Control (C, 0 mg/kg of B2), Riboflavin 1 (R1, 1 mg/kg of B2), Riboflavin 2 (R2, 10 mg/kg of B2) and Riboflavin 3 (R3, 100 mg/kg of B2). Treatment at their respective doses was carried out subcutaneously during days P1 to P21. As a result, the reflexes of recovery from decubitus ($p < 0,0001$), positioning by the vibrissae ($p < 0,0001$), aversion to the precipice ($p < 0,0001$), negative geotaxis ($p < 0,01$) and falling free ($p < 0,05$) were accelerated for R3 animals. Likewise, eye-opening ($p < 0,01$), eruption of the upper incisors ($p < 0,01$), and eruption of the lower incisors ($p < 0,05$) were earlier for the R3 group. Regarding physical development, R3 animals showed less body weight gain compared to the control group ($p < 0,05$). CatWalk gait demonstrated reduced numbers of steps ($p < 0,05$) and cadence ($p < 0,01$) for R3 animals, which are parameters associated with the expenditure of kinetic energy. Furthermore, in the open field, group R3 showed lower energy expenditure (J) ($p < 0,05$). Muscle strength was standardized for the groups ($p > 0,05$), thus justifying the findings related to tissue weight, which were standardized for all animals. All rats treated with different doses of riboflavin showed better motor coordination and balance on parallel bars (R1 and R2: $p < 0,05$; R3: $p < 0,01$), but only the R3 group showed an increase in the hepatosomatic index, an indicator of liver glycogen content. Our results suggest that high doses of riboflavin, during the neonatal period, stimulate sensorimotor and somatic development and reduce the energy invested in growth, body weight gain, and caloric expenditure during activity.

Keywords: vitamin B2; nervous system; developmental plasticity; neonatal period.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Linha do tempo dos estudos sobre o desenvolvimento das espécies.....	25
Figura 2 – Constituição e regulação da locomoção.....	29
Figura 3 – Esquema ilustrativo sobre características da riboflavina, fontes, funções e hipóteses estudadas.....	32
Figura 4 – Análise do peso corporal durante os dias P1 ao P25 pós-natal.....	46
Figura 5 – Análise do crescimento somático durante o período de intervenção neonatal (P1 ao P21).....	47
Figura 6 – Análise da marcha locomotora, através do CatWalk, em P28.....	49
Figura 7 – Análise da atividade locomotora em campo aberto (P28).....	50
Figura 8 – Análise da força muscular (g) pelo aparelho GripStrength System em P28 pós-natal.....	52
Figura 9 – Análise da coordenação motora e equilíbrio em barras paralelas (P35).....	53
Figura 10 – Índice hepatossomático (%) em P36.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dia pós-natal da ontogênese dos reflexos e maturação somática.

Tabela 2 – Peso do cérebro, músculos e fígado em P36.

LISTA DE ABREVIÇÕES

COX – Cicloxigenase

EDL – Extensor longo dos dedos

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FMN – Flavina mononucleotídeo

GPCs – Gerador de padrões centrais

Q10 – Coenzima Q10

RFK – Riboflavina quinase

RFVT – Transportadores de riboflavina

SNC – Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	DESENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES À LUZ DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA	19
2.2	DESENVOLVIMENTO SENSORIO-MOTOR E SOMÁTICO EM HUMANOS E MODELOS EXPERIMENTAIS: ESTUDO DA ESTRUTURAÇÃO DO COMPORTAMENTO LOCOMOTOR	23
2.3	RIBOFLAVINA: CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO SENSORIO-MOTOR E SOMÁTICO EM HUMANOS E MODELOS EXPERIMENTAIS	27
3	JUSTIFICATIVA	31
4	HIPÓTESE	32
5	OBJETIVOS	33
5.1	OBJETIVO GERAL	
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
5.2.1	Avaliar durante o período de lactação (P1 – P21)	
5.2.2	Avaliar após o tratamento com riboflavina (P22 – P35)	
5.2.3	Avaliar ex vivo (P36)	
6	MÉTODOS	34
6.1	ANIMAIS	34
6.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
6.3	ANÁLISES EXPERIMENTAIS	35
6.3.1	Análises experimentais realizadas durante o tratamento com riboflavina (P1 ao P21 pós-natal)	35
6.3.1.1	<i>Ontogênese sensorio-motora</i>	35
6.3.1.2	<i>Maturação somática</i>	36

6.3.1.3	<i>Crescimento murinométrico e evolução do peso corporal</i>	37
6.3.2	Análises experimentais realizadas após o tratamento com riboflavina (P22 – P35)	37
6.3.2.1	<i>Avaliação da marcha locomotora em CatWalk</i>	38
6.3.2.2	<i>Avaliação da atividade locomotora em campo aberto</i>	38
6.3.2.3	<i>Avaliação da força muscular</i>	38
6.3.2.4	<i>Avaliação da coordenação motora e equilíbrio</i>	39
6.3.3	Análises experimentais realizadas após o sacrifício (P36)	39
6.3.3.1	<i>Peso dos órgãos</i>	39
6.3.3.2	<i>Índice hepatossomático</i>	39
6.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
7	RESULTADOS	41
7.1	ONTOGÊNESE DE REFLEXOS E MATURAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SOMÁTICAS	41
7.2	PESO CORPORAL	42
7.3	CRESCIMENTO MURINOMÉTRICO	43
7.4	MARCHA EM CATWALK	46
7.5	ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO	47
7.6	FORÇA MUSCULAR	49
7.7	COORDENAÇÃO MOTORA E EQUILÍBRIO	50
7.8	PESO DOS ÓRGÃOS	51
7.9	ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO	52
8	DISCUSSÃO	54
9	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA	71

1 INTRODUÇÃO

A gestação e os anos iniciais de vida pós-natal são etapas consideráveis para maturação dos sistemas fisiológicos (Cappellini *et al.*, 2020). A alta plasticidade, durante essas fases, confere aos organismos a capacidade de modular suas características próprias, por interação extrínseca, através de distintas formas de expressão fenotípica (West-Eberhard, 1986). Esse fenômeno é denominado plasticidade fenotípica e constitui um dos pilares que norteiam os estudos de plasticidade do desenvolvimento, cujo conceito explica os distintos percursos que podem tomar os eventos que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento fisiológico (Rice; Barone, 2000; West-Eberhard, 1986). Nesse contexto, destaca-se o envolvimento nutricional, incluindo intervenções com polifenóis e vitaminas, como fatores de modulação do desenvolvimento neonatal (Georgieff; Ramel; Cusick, 2018; Visco *et al.*, 2022; Pontes *et al.*, 2023; Silva-Araújo *et al.*, 2023). Ainda são escassos, entretanto, os estudos que investigam os efeitos da riboflavina (vitamina B2) na perspectiva desenvolvimentista do presente projeto.

As vitaminas do complexo B constituem um conjunto de moléculas hidrossolúveis, estruturalmente distintas entre si, mas com funções destacáveis e complementares sobre a fisiologia dos seres vivos (Lienhart; Gudipati; Macheroux, 2013). Atuam em funções metabólicas e hematológicas, produzindo efeitos sobre os mais diversos sistemas (Vorosmarti; Yaktine; Schneeman, 2021). A riboflavina é um micronutriente pertencente ao complexo de vitaminas B (Chawla; Kvarnberg, 2014) e facilmente encontrada em alimentos *in natura* (Plaut; Smith; Alworth, 1974). É ofertada aos humanos através da alimentação ou produção endógena pela microbiota intestinal (Kennedy, 2016). Apesar disso, níveis deficitários são comumente relatados em países subdesenvolvidos (Kennedy, 2016).

De acordo com as recomendações nutricionais diárias, a ingestão satisfatória de riboflavina corresponde a 1,3 mg por dia para adultos, enquanto cotas de oferta máxima (UL – limite superior) não foram até então elucidadas (Vorosmarti; Yaktine; Schneeman, 2021). Apesar disso, a administração de doses superiores às recomendadas foi associada à preservação do desenvolvimento do sistema nervoso central e à redução da mortalidade em ratos neonatos (Ogunleye; Odotuga, 1989).

Ademais, o tratamento farmacológico crônico com riboflavina pareceu estimular o equilíbrio metabólico, promovendo uma maior absorção e utilização pelo corpo, mesmo em altas doses (Powers; Corfe; Nakano, 2012).

Ainda que os estudos atuais tenham avançado no conhecimento científico sobre as vitaminas do complexo B, a riboflavina (vitamina B2) permanece foco de grande interesse científico (Kennedy, 2016). A riboflavina é o elemento precursor da flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e da flavina mononucleotídeo (FMN), que participam do balanceamento de elétrons durante a produção de energia aeróbica nos seres vivos animais (Chawla; Kvarnberg, 2014; Suwannasom *et al.*, 2020). Em fases precoces, essas funções são investidas para o crescimento e maturação cerebral (Suwannasom *et al.*, 2020). Um estudo publicado na literatura demonstrou que a administração de alta dose de riboflavina (177.6mg/kg dia) durante o período neonatal reduz o índice de mortalidade, previne o surgimento de lesões nas extremidades corporais e preserva a composição lipídica das regiões encefálicas em roedores (Ogunleye; Odutuga, 1989). Além disso, a suplementação com riboflavina durante a gestação e lactação estimulou a ontogênese de reflexos e os parâmetros de atividade locomotora em um modelo experimental de hipóxia neonatal (Blaise *et al.*, 2009). Os efeitos neuroprotetores, anti-inflamatórios e antioxidantes da riboflavina estão associados à recuperação das funções sensório-motoras e cognitivas em diferentes fases do desenvolvimento (Silva-Araújo *et al.*, 2023).

Não apenas as funções sensório-motoras, mas o desenvolvimento somático demanda mecanismos associados à riboflavina, sobretudo pela dependência existente entre as funções associadas à proliferação e diferenciação celular, e a homeostase bioenergética (Jin *et al.*, 2020). Dados *in vitro* sugerem uma participação da riboflavina na regulação do metabolismo ósseo em células embrionárias humanas, juntamente à intensa transcrição e estabilização de cateninas – proteínas responsáveis pelos processos de adesão celular entre membranas (Chaves Neto *et al.*, 2010). A aplicação clínica de altas doses de riboflavina em indivíduos com deficiência mitocondrial estimulou o crescimento físico, seguido de recuperação mitocondrial (Bugiani *et al.*, 2006). Ademais, possibilitou a normalização do perímetro cefálico em crianças acometidas por hipóxia neonatal (Lavrick *et al.*, 2016).

Em roedores, marcos de desenvolvimento sensório-motor e somático podem ser observados pela análise da ontogênese de reflexos, da maturação somática e da caracterização murinométrica. O desenvolvimento neuromotor pode ser acompanhado até a fase adulta através do estudo da locomoção, marcha, coordenação motora e força muscular. Contudo, ainda são necessários estudos dedicados à compreensão dos efeitos de diferentes doses da riboflavina sobre o desenvolvimento das funções sensório-motoras e somáticas. A partir da avaliação pré-clínica do tratamento crônico com riboflavina, estudamos a relação dose-resposta entre a riboflavina e a ontogênese das funções sensório-motoras, desenvolvimento e caracterização somática e parâmetros neuromotores, incluindo a constituição do comportamento locomotor, em ratos. Este estudo poderá contribuir com a aplicabilidade terapêutica da riboflavina em condições adversas, surgidas durante o desenvolvimento neonatal, que prejudicam os parâmetros sensório-motores, dentre as quais destacam-se a paralisia cerebral. Ademais, amplia a compreensão acerca da segurança e eficácia de doses de riboflavina quando administradas de maneira farmacológica durante o início da vida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES À LUZ DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA

O despertar sobre a curiosidade da origem das espécies consagra o século XIX como um período notadamente marcado por estudos voltados à compreensão da gênese e desenvolvimento dos seres vivos pluricelulares – animais e vegetais (Lamarck, 1809; Darwin, 1859; Galton, 1865; Wallace, 1889). Os primeiros relatos acerca das modificações ocorridas durante o desenvolvimento centralizaram-se em discursos meramente naturalistas, e dentre estes, as proposições de Charles Darwin através da Teoria da Evolução das Espécies, ganham um maior destaque (Darwin, 1859). Segundo esse constructo, os seres vivos se modificam para sobreviver às alterações ambientais, de modo que os mais aptos resistem às flutuações externas e, por isso, conseguem se reproduzir e gerar descendentes com maior facilidade (Darwin, 1859). Esse mecanismo é chamado por Darwin de “seleção natural” e contribuiu posteriormente para a compreensão de outros fenômenos evolucionistas (García-Robles *et al.*, 2012). Apesar de tamanha importância para as ciências da vida, os constructos de Charles Darwin não explicavam como as características adaptativas, alcançadas pela interação com o meio, eram repassadas entre os indivíduos de uma mesma espécie (García-Robles *et al.*, 2012).

Sob uma perspectiva desenvolvimentista, alguns anos após a publicação do revolucionário livro “A origem das espécies”, o cientista Francis Galton, primo de Charles Darwin, propõe uma visão inovadora aos estudos anteriormente evidenciados (Del Cont, 2008). Em primeiro momento, Francis Galton constrói ideias associadas a constructos darwinianos, mas sob um diferencial do ponto de vista matemático e eugenista (Galton, 1865; 1869; 1892). Galton, após alguns experimentos, retifica as ideologias evolucionistas, apresentando-as de maneira controversa às até então teorias darwinistas (Del Cont, 2008). A visão galtoniana passa então a explicar, entre outras questões desenvolvimentistas, a não influência do meio ambiente sobre as características humanas, que estariam programadas de forma inata, acompanhando o indivíduo desde o seu nascimento (Galton, 1865). Por isso, os estudos de Galton repercutiram amplamente sobre o esquecimento temporário da visão darwiniana,

desconsiderada por muitos anos e somente retomada com a onda Neodarwinista (Mayr, 1997).

No século XX, os estudos sobre o desenvolvimento dos seres vivos avançaram de forma significativa (Mayr, 1997; 2001), e esse marco soou consoante à retomada das bases da genética, propostas inicialmente pelo biólogo Gregor Mendel (Mendel, 1865). A partir de então, tornaram-se evidentes e considerados os eventos de mutação e hereditariedade, que preencheram lacunas outrora deixadas pelo Darwinismo (Mendel, 1865). É neste momento que os estudos de Ernst Mayr unem os constructos estabelecidos por Darwin às descobertas genéticas de Mendel, direcionando as explicações da evolução para caminhos ainda mais complexos (Mayr, 1997). Além disso, Mayr revisita os constructos de Lamarck, anteriores aos de Darwin, que destacavam o papel do ambiente nas modificações biológicas dos seres vivos, conforme descreve a teoria dos “caracteres adquiridos”, o que posteriormente contribuiria para a compreensão da epigenética (Mayr, 1972).

A ampla discussão acerca do possível envolvimento do meio ambiente sobre a fisiologia humana destacaria um outro marco nos estudos biológicos observados no século passado (Rice; Barone, 2000). Neste momento, as pesquisas evolucionistas passam a visualizar a participação do ambiente sobre o desenvolvimento dos indivíduos; isso porque somente a partir das pesquisas experimentais de Mary Jane West Eberhard que os debates sobre a influência do ambiente na gênese das modificações orgânicas ganharam maior visibilidade (West-Eberhard, 1986). Os estudos desta época sugerem que, durante a trajetória do desenvolvimento, os seres vivos estão muito sujeitos a enfrentar fenômenos ambientais, capazes de provocar alterações em suas formas, funções ou comportamentos (Rice; Barone, 2000). Tal capacidade dos organismos em reagir a estas condições extrínsecas, modulando suas características próprias através de distintas formas de expressão de seus genótipos, denomina-se plasticidade fenotípica (West-Eberhard, 1986). Dentre as múltiplas formas da plasticidade fenotípica, a plasticidade do desenvolvimento, baseada no conceito “Developmental Origins of Health and Disease” (DOHaD), refere-se aos inúmeros percursos que podem seguir os eventos ocorridos ao longo das fases do desenvolvimento de um ser vivo (Suzuki, 2018).

A plasticidade fenotípica do desenvolvimento em mamíferos pode explicar por que os insultos em fases precoces atuam na gênese de doenças futuras (Rice; Barone, 2000; Wells, 2010). Antes mesmo da clara definição do DOHaD, um grande cientista nacional, chamado Josué de Castro, denunciou as graves sequelas da desnutrição sob um olhar da plasticidade fenotípica (Castro, 1937; 1946). Em suas publicações, Castro sugeria que fatores ambientais poderiam gerar modificações na fisiologia humana (Castro, 1937; 1946). Segundo ele, a fome representara um fenômeno grave e causador de impactos severos no indivíduo, especialmente sobre aqueles que se encontravam em períodos precoces do desenvolvimento (Castro, 1946). Assim sendo, em *Geografia da fome*, Josué de Castro expõe o alimento como algo necessário para o bom funcionamento do corpo, enquanto a sua ausência, a fome/subnutrição, implicaria no desenvolvimento defeituoso das crianças, na fraqueza dos mais velhos e nas consequências mentais dos indivíduos (Castro, 1946).

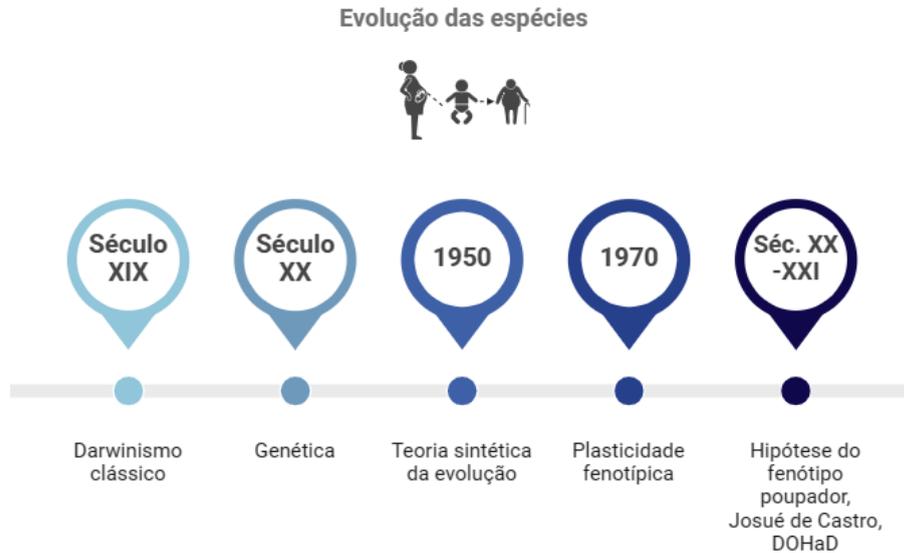
Com o surgimento do DOHaD, novas perspectivas sobre o desenvolvimento fisiológico passaram a ser discutidas (Sebayang *et al.*, 2011). Esta linha de estudo muito atual baseia-se nos princípios da genética, epigenética, ecologia e plasticidade fenotípica, para associar o ambiente perinatal ao surgimento ou não de doenças futuras, assim propondo, que fatores externos podem estimular respostas a curto ou longo prazo em determinado indivíduo (Suzuki, 2018). A consolidação da plasticidade do desenvolvimento, portanto, recebe influências históricas de estudos nacionais, incluindo os estudos sobre a fome, realizados pelo cientista Josué de Castro (Castro, 1937; 1946; 1964) e internacionais, incluindo o estudo das repercussões tardias da desnutrição em período perinatal (Bergmann; Dudenhausen, 2008; Hales; Barker, 2001).

Os trabalhos mundialmente reconhecidos são em sua maior parte ligados à nutrição durante as fases críticas de crescimento e desenvolvimento, cujas essas representam períodos de maior vulnerabilidade plástica dos seres vivos complexos, como mamíferos (Gluckman; Hanson, 2004; Hales; Barker, 2001). Nesse contexto, podemos citar alguns modelos teóricos, como a hipótese do fenótipo poupador, sugerida por Hales e Barker, que associa o baixo peso ao nascer a alterações no metabolismo da insulina em fases futuras (Hales; Barker, 2001) e o modelo da carga e capacidade metabólica (Wells, 2010), aquele relaciona a nutrição fetal, observada em ambiente uterino, à gênese de doenças crônicas em indivíduos adultos.

Nos últimos anos, diversos estudos baseados nos constructos desenvolvimentistas mostraram-se curiosos quanto à compreensão da estreita relação entre os fatores nutricionais e o sistema nervoso central (Lopes-de-Souza *et al.*, 2008; Orózco-Solis *et al.*, 2009; Lacerda *et al.*, 2019; Pontes *et al.*, 2023; Visco *et al.*, 2022). Certamente, após o nascimento, o cérebro neonatal perpassa por constantes modificações e a nutrição oferecida ao recém-nascido configura-se um fator crítico e decisivo à maturação cerebral (Beauport *et al.*, 2017; Schneider; García-Rodenas, 2017). A literatura destaca, por exemplo, que a nutrição neonatal adequada pode reduzir os riscos para transtornos associados ao neurodesenvolvimento (Beauport *et al.*, 2017). Outros estudos, ainda, associam a maturação cerebral típica à oferta nutricional macro energética durante o período precoce (Schneider; García-Rodenas, 2017; De Nardo *et al.*, 2022). Tal qual, a suplementação dos macronutrientes, sobretudo as cotas proteicas destinadas aos recém-nascidos, também parece influenciar o crescimento somático a curto e longo prazo (Schneider; García-Rodenas, 2017). Apesar de tais discussões, são escassos os estudos em humanos que investigam as repercussões dos micronutrientes, como a riboflavina, na maturação sensório-motora e desenvolvimento somático em neonatos (de Nardo *et al.*, 2022). Dados pré-clínicos, no entanto, já destacam a relação entre a deficiência precoce da riboflavina ao subsequente comprometimento do neurodesenvolvimento neonatal, abrindo um leque para futuras investigações com o complexo de vitaminas B (Blaise *et al.*, 2009).

Figura 1. Linha do tempo dos estudos sobre o desenvolvimento das espécies.

TEORIAS DO DESENVOLVIMENTO



Fonte: autora (2024).

2.2 DESENVOLVIMENTO SENSORIO-MOTOR E SOMÁTICO EM HUMANOS E MODELOS EXPERIMENTAIS: ESTUDO DA ESTRUTURAÇÃO DO COMPORTAMENTO LOCOMOTOR

Em fases iniciais da vida, a aquisição de habilidades motoras perpassa pelo desenvolvimento de respostas sensório-motoras precoces, primariamente espontâneas, que se estabelecem complexas a partir da maturação do SNC (Westerga; Gramsbergen, 1993). Essa janela de maturação responde a fatores genéticos e epigenéticos, de modo que intervenções extrínsecas, como manipulações nutricionais, imobilização de membros ou exposição a fármacos, podem estimular respostas, adaptativas ou não (Geisler; Westerga; Gramsbergen, 1993). Em ratos, o desenvolvimento sensório-motor expressa respostas reflexas primitivas, que se estabelecem durante os 21 dias de lactação (Fox, 1965). Esses reflexos são comandos nervosos emitidos, em resposta a estímulos periféricos, pelas regiões do tronco cerebral, cerebelares, corticais e medulares (Bronsing; Van Der Burg; Ruigrok, 2005). Fox (1965) através de estudos experimentais, denomina os reflexos neurológicos do rato como preensão palmar, recuperação de decúbito, aversão ao precipício, resposta ao susto, geotaxia negativa e queda livre.

Consoante à ontogênese de reflexos, as regiões musculares (gastrocnêmio e sóleo) se desenvolvem e apresentam, a partir dos dias 16 a 20 pós-natal, motoneurônios, que responderão, mediante o SNC, ao desenvolvimento das tarefas locomotoras (Westerga; Gramsbergen, 1993). No ser humano, as funções sensório-motoras são reguladas pelas regiões supra espinhais e emitidas pelas regiões do tronco cerebral e da medula (Hadders-Algra, 2018b). Somente a partir do terceiro mês de vida, o indivíduo começa a desenvolver mecanismos ainda mais complexos, que respondem ao ambiente, a partir de estímulos periféricos, para a realização de atividades locomotoras (Hadders-Algra, 2018b). Essas respostas amadurecem a partir da aquisição das habilidades motoras grossas e finas e são inicialmente apresentadas por meio de funções destinadas à comunicação e à linguagem (Hadders-Algra, 2018a). Durante esse período, as regiões musculares também se desenvolvem e nota-se intenso crescimento somático (Demers *et al.*, 2020).

Os anos iniciais de vida constituem períodos críticos importantes do desenvolvimento fisiológico e anatômico, sobretudo para a gênese de conexões neurais relacionadas ao comportamento motor (Giza; Prins, 2006; West-Eberhard, 1986). A locomoção representa um marco importante no desenvolvimento infantil (Cappellini *et al.*, 2020) e é realizada através da manipulação dos sistemas musculoesqueléticos contra a força gravitacional (Aoi; Funato, 2016). O período fetal e a infância são etapas consideráveis para o amadurecimento do sistema nervoso central dos animais, porquanto nessas fases, o organismo encontra-se muito sensível às influências sobre o aprendizado e a assimilação das funções motoras (Cappellini *et al.*, 2020). O aprendizado da locomoção é paralelo à maturação do sistema nervoso e por ele influenciado, integrando-se de modo complexo com todo o sistema musculoesquelético (Fragopoulou *et al.*, 2019; Westerga; Gramsbergen, 1993). Portanto, a maneira na qual os animais se locomovem resulta de interações intrincadas entre os elementos neurais, neuronais, elementos musculares, tendinosos, osteoarticulares etc., todos responsáveis pela geração de propriedades biomecânicas (Miles; Sillar, 2011).

O sistema musculoesquelético é organizado de maneira semelhante e característica em suas formas e funções (Biewener, 2016). As fibras musculares esqueléticas possuem atributos mecânicos e energéticos, que em resposta às demandas motoras, desempenham funções essenciais na regulação da locomoção

(Biewener, 2016; Roberts, 2002). As propriedades funcionais deste sistema encontram-se relacionadas e codependentes à ativação da junção neuromuscular e das unidades músculo-tendão, importantes para a despolarização e trabalho muscular (Biewener, 2016; Josephson, 1999). O grau de tensão produzido através da contração musculoesquelética sobrevém das especialidades relacionadas à velocidade, dinâmica da ativação dos músculos e nexos comprimento-força aplicados na realização da tarefa (Roberts, 2002). Os tendões são estruturas biomecânicas que auxiliam o desempenho muscular durante a execução das atividades locomotoras. Assim, junto aos músculos, estes elementos constituem as unidades músculo-tendíneas e fornecem suporte funcional às fibras musculares durante os movimentos corporais (Roberts, 2002).

Os movimentos realizados pelos animais são organizados e resultam da conexão entre o sistema nervoso, sistema musculoesquelético e ambiente (Aoi; Funato, 2016). Assim, as regiões centrais participam ativamente da execução de atividades locomotoras através da relação estímulo-resposta com as regiões periféricas (Westerga; Gramsbergen, 1993). O cerebelo, medula espinhal, tronco encefálico e núcleos da base são regiões responsáveis pela integração de funções sensoriais e vestibulares aos comandos motores para promover a movimentação (Aoi; Funato, 2016). A atuação da medula espinhal na ativação muscular durante a marcha humana pode ser subjacente aos reflexos espinhais ou à atividade dos geradores de padrões centrais (GPCs) (Minassian *et al.*, 2017). Além disso, a formação reticular do tronco cerebral apresenta uma região de controle da locomoção que modula os GPCs localizados na medula e integrados no mesencéfalo (Komiya, 2010). Durante um comportamento locomotor, músculos sinérgicos produzem forças que, juntas, atuam na movimentação de um determinado membro; essas forças são denominadas de reflexos motores, desenvolvidos no início da vida de maneira adquirida ou adaptativa (Madarshahian; Letizi; Latash, 2021). Eles são respostas motoras a um estímulo sensorial e atuam como reguladores da locomoção humana (Zehr; Komiya; Stein, 1997; Zehr; Stein, 1999; Zehr; Stein; Komiya, 1998; Komiya, 2010; Minassian *et al.*, 2017).

Os reflexos adquiridos compõem nosso desenho genético, enquanto os adaptativos são aprendidos por meio da aquisição das habilidades motoras e codificados pelos circuitos da medula espinhal (Verbruggen *et al.*, 2014). É por meio

desta adaptação que os animais conseguem manipular com mais facilidade as suas massas corporais de acordo com o ambiente, fatores extrínsecos e variações morfológicas (Thor; Strohmer; Manoonpong, 2021). A depender da fase e tarefa, esses aferentes podem estimular efeitos inibitórios ou excitatórios nos músculos, sendo capazes de induzir uma atividade funcional, como a caminhada ou manutenção postural na posição em pé (Zehr; Stein, 1999). Em animais experimentais, reflexos primitivos são avaliados durante o período de lactação e podem indicar parâmetros de maturação neural e desenvolvimento típico (Fox, 1965). Logo, durante a transição entre o período neonatal e fase adulta, a ontogênese dos reflexos sensorio-motores e características somáticas caracterizam o desenvolvimento rostral caudal em roedores (Dobbing; Smart, 1974; Fox, 1965).

As regiões neurais responsáveis pela integração dinâmica dos elementos responsáveis pela locomoção, combinam e manipulam diferentes comandos motores para realização das funções locomotoras (Aoi *et al.*, 2010; Aoi; Funato, 2016). Na medula espinhal dos vertebrados, conjuntos específicos de neurônios parecem ser utilizados para realização de atividades locomotoras; estes agrupamentos nervosos são nomeados de GPCs (Minassian *et al.*, 2017). Os GPCs impulsionam a movimentação dos grupos musculares durante a execução de tarefas rítmicas ou na ausência de feedback sensorial (Minassian *et al.*, 2017). Eles são responsáveis pelo controle do ritmo locomotor às estimulações sensoriais, através do gerador de ritmo, e por ajustes no padrão da atividade motora, por meio das redes de formação de padrões, diante da ativação dos motoneurônios (Aoi *et al.*, 2010). As regiões motoras supraespinhais, como o córtex motor e o trato corticoespinal, também atuam sobre os reflexos segmentares e os agrupamentos musculares, e por isso, aumentam o desempenho da marcha locomotora em humanos (Solopova *et al.*, 2015).

A movimentação corporal rítmica demanda, do organismo, a manutenção da coordenação motora, que representa um fator essencial para o comportamento locomotor adaptativo, visto que auxilia o desempenho energético, sobretudo na realização de atividades voluntárias, incluindo locomover-se sobre obstáculos ou padrões de marcha, como andar e correr (Aoi; Funato, 2016). Sobre essas tarefas, os reflexos cutâneos e musculares atuam de forma integrada, possibilitando equilíbrio, postura e deslocamento espacial com precisão (Zehr; Stein, 1999; Komiyama, 2010). Tal maturação e integração desses sistemas ocorre em tempo similar à maturação do

SNC e regiões somáticas, incluindo ossos, articulações, músculos e tendões (Miles; Sillar, 2011) (Figura 2).

Figura 2. Constituição e regulação da locomoção.



Fonte: autora (2024).

2.3 RIBOFLAVINA: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FUNÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO SENSORIO-MOTOR E SOMÁTICO EM HUMANOS E MODELOS EXPERIMENTAIS

A riboflavina é um micronutriente pertencente ao complexo B, caracterizado por coloração amarelo-alaranjada, baixo peso molecular e altíssima sensibilidade à luz (Chawla; Kvarnberg, 2014). Sua estrutura molecular envolve a ligação química de uma cadeia lateral do açúcar ribitol a um anel de flavina isoaloxazina (Wu *et al.*, 2005). Em humanos, níveis deficitários de riboflavina são comumente relatados em países subdesenvolvidos, devido ao perfil alimentar existente, nutricionalmente empobrecido

(Kennedy, 2016). Encontra-se envolvida no desenvolvimento saudável de tecidos, fluidos, cognição e homeostase bioenergética (Bourgonje *et al.*, 2022).

A vitamina B2 é um componente essencial da respiração mitocondrial, que influencia as atividades metabólicas de inúmeros sistemas, incluindo o SNC e tecido muscular (Kennedy, 2016). Além de sua participação nas inúmeras cascatas que regulam o estresse oxidativo, esta vitamina pode estimular a biogênese e a atividade mitocondrial (Powers, 2003). Isso porque a mitocôndria exibe dois complexos formadores de elétrons, o complexo I, regulado por FMN, e o complexo II, regulado por FAD; nessas regiões, produzem-se elétrons, que seguem para os complexos III e IV, respectivamente regulados pela coenzima Q10 e COX, para posteriormente estabelecer um gradiente de prótons para gênese de ATP, no complexo mitocondrial V (Henriques *et al.*, 2010).

Em mamíferos, a riboflavina é transportada para os enterócitos através do transportador RFVT3, que permite a absorção da vitamina diante da ingestão dietética (Barile *et al.*, 2016). O transportador RFVT1 é encontrado na placenta, possibilitando a passagem da riboflavina entre mãe e feto, enquanto o transportador RFVT2 é encontrado em órgãos metabólicos e corrobora à eficiência energética das regiões do pâncreas, fígado e músculo (Barile *et al.*, 2016). É a fosforilação da riboflavina, a partir de RFK, que permite a sua entrada nas células em formas ativas de FAD e FMN (Hirano *et al.*, 2011).

A riboflavina atua como precursora das flavoenzimas FAD e FMN, que participam do funcionamento de diversas enzimas que compõem o proteossoma humano, incluindo as desidrogenases, oxidases, redutases e mono oxidases (Lienhart; Gudipati; Macheroux, 2013). Juntas, essas proteínas desempenham papéis críticos no transporte de elétrons a nível mitocondrial, homeostase redox, ciclo do ácido cítrico, catabolismo de aminoácidos e oxidação de ácidos graxos (Henriques *et al.*, 2010). Elas atuam para a regulação de apoptose, síntese de DNA e metabolismo de hormônios e outras vitaminas do complexo B (Mosegaard *et al.*, 2020).

O ambiente nutricional acentuado, reduzido ou desequilibrado, oferecido ao recém-nascido durante o período neonatal, pode repercutir sobre as funções neurais que estão em ontogenia, dentre elas as conexões sensório-motoras (Cappellini *et al.*,

2020; Georgieff; Ramel; Cusick, 2018). Baixos níveis de vitaminas do complexo B no leite materno, dentre elas a riboflavina, foram associados ao precoce surgimento de habilidades motoras grossas, ainda imaturas, em humanos neonatos (Torsvik *et al.*, 2015). Os prejuízos das baixas concentrações de riboflavina em fases neonatais sobre as funções sensório-motoras foram também evidenciados em animais experimentais, que apresentaram deficiências precoces, como a atipicidade na ontogênese de reflexos primitivos, e danos tardios, incluindo falhas na atividade locomotora em fase adulta (Blaise *et al.*, 2009). A suplementação neonatal com riboflavina, por outro lado, pode estimular a ontogênese de reflexos e a locomoção em ratos submetidos à privação de oxigênio cerebral (Blaise *et al.*, 2009).

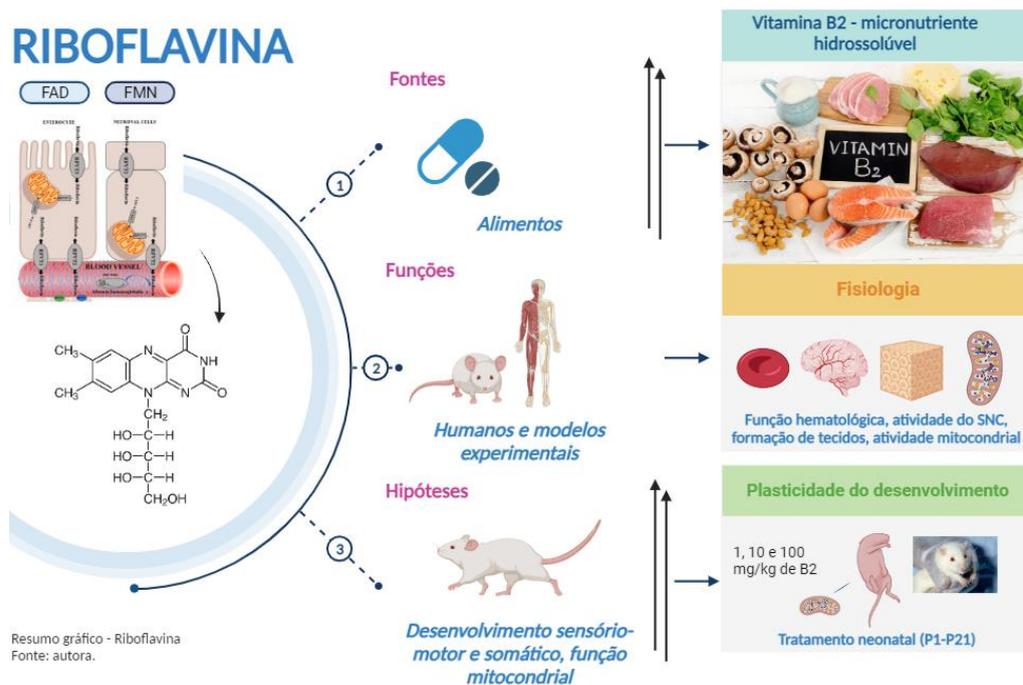
Recentemente, produzimos dois estudos de revisão sobre os benefícios da riboflavina nas diferentes fases do desenvolvimento (Silva-Araújo *et al.*, 2023; Silva-Araújo *et al.*, 2024). Foram reunidos estudos clínicos e pré-clínicos que demonstram os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores da riboflavina no SNC (Silva-Araújo *et al.*, 2023), bem como na regulação do peso corporal (Silva-Araújo *et al.*, 2024a). Essas funções estão relacionadas à recuperação das habilidades sensório-motoras, comprometidas no dano cerebral decorrente de hipóxia, sobretudo em estágios iniciais de vida (Silva-Araújo *et al.*, 2023). Isso decorre do aumento da produção de energia pelas mitocôndrias, mediante o tratamento com riboflavina, que está associado à neurogênese e à redução da inflamação e do estresse oxidativo (Agte; Paknikar; Chiplonkar, 1998). Ademais, através da interação proposta entre a riboflavina e o metabolismo energético, a suplementação desta vitamina em doses farmacológicas tem sido associada à regulação do peso corporal e da densidade de peso de órgãos (*ex vivo*) (Debski *et al.*, 2006; Lewicka *et al.*, 2017; Silva-Araújo *et al.*, 2024a).

A suplementação dietética durante os 21 dias pós-natais com riboflavina (177,6 mg/kg/dia) reduziu o índice de mortalidade, preveniu o surgimento de lesões nas extremidades corporais e preservou a composição lipídica das regiões encefálicas (Ogunleye; Odutuga, 1989). Os compostos lipídicos são os responsáveis pela constituição da bainha de mielina dos neurônios, assim possibilitando a condução saltatória dos impulsos sinápticos (Dubois *et al.*, 2014). Entretanto, os níveis deficitários de riboflavina em fases neonatais estão associados à deficiência no

metabolismo de ácidos graxos e ao subsequente comprometimento da estruturação de membranas celulares do cerebelo (Ogunleye; Odutuga, 1989).

Em humanos, a suplementação com altas doses de riboflavina (50 a 100 mg/kg), durante os primeiros 5 anos de vida, estimula o crescimento somático, as funções sensório-motoras e reduz a deficiência no complexo mitocondrial II (Bugiani *et al.*, 2006). Este achado reforça a atuação da riboflavina no desenvolvimento físico, sobretudo pela dependência existente entre as funções associadas à homeostase energética, proliferação e diferenciação celular (Jin *et al.*, 2020). Por estimular a regulação do metabolismo ósseo em células embrionárias humanas, cultivadas *in vitro*, a riboflavina foi importantemente descrita para a transcrição e estabilização de cateninas, proteínas responsáveis pelos processos de adesão celular (Chaves Neto *et al.*, 2010). Portanto, intervenções farmacológicas com riboflavina parecem apresentar efeitos estimulantes sobre a maturação dos sistemas, tanto em parâmetros sensório-motores (associados ao SNC), quanto somáticos (relacionados ao desenvolvimento físico) (Ogunleye; Odutuga, 1989; Silva-Araújo *et al.*, 2023) (Figura 3).

Figura 3. Esquema ilustrativo sobre características da riboflavina, fontes, funções e hipóteses estudadas.



Fonte: autora (2024).

3 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos experimentais do nosso grupo de pesquisa buscam avaliar a participação nutricional sobre o desenvolvimento, sobretudo a plasticidade fenotípica do desenvolvimento, através de modelos experimentais em animais. Em roedores, marcos da evolução neonatal podem ser observados através da análise da ontogênese sensório-motora e da maturação somática, consoante ao estudo do crescimento murinométrico e do desenvolvimento neuromotor. Nesse contexto, as repercussões precoces e tardias de estímulos nutricionais ou farmacológicos durante o período crítico de desenvolvimento são temas de grande interesse nas pesquisas atuais. Até o momento, nenhum estudo investigou os efeitos de diferentes doses da vitamina B2 (riboflavina) sobre o desenvolvimento sensório-motor e somático em ratos. Ademais, informações acerca da segurança e eficácia de doses de riboflavina não estão totalmente elucidadas. A partir da avaliação pré-clínica do tratamento crônico com riboflavina, estudamos a relação dose-resposta entre a riboflavina e a ontogênese das funções sensório-motoras, desenvolvimento e caracterização somática, e parâmetros neuromotores, incluindo a constituição do comportamento locomotor, em ratos, durante a fase neonatal até a adolescência. Este estudo poderá contribuir com a aplicabilidade terapêutica da riboflavina em condições adversas, surgidas durante o desenvolvimento neonatal, que prejudicam os parâmetros sensório-motores, dentre as quais destacam-se a paralisia cerebral. Ademais, amplia a compreensão acerca da segurança e eficácia de doses de riboflavina quando administradas de maneira farmacológica durante o início da vida.

4 HIPÓTESE

O tratamento crônico com riboflavina tem efeito dose-dependente sobre o desenvolvimento sensório-motor e somático em ratos neonatos.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos do tratamento crônico com diferentes doses de riboflavina sobre o desenvolvimento sensório-motor, maturação somática, crescimento murinométrico e parâmetros neuromotores em ratos neonatos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Avaliar durante o período de lactação (P1 – P21)

- Ontogênese sensório-motora, através dos seguintes testes reflexológicos: preensão palmar, recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, resposta ao susto, geotaxia negativa e queda livre;
- Maturação somática, por meio do surgimento das seguintes características: abertura do pavilhão auditivo, abertura do conduto auditivo, abertura ocular, erupção dos incisivos inferiores e erupção dos incisivos superiores;
- Crescimento murinométrico, através da análise do peso corporal e das seguintes medidas murinométricas: eixo látero-lateral do crânio, eixo ântero-posterior do crânio, eixo longitudinal e comprimento da cauda.

5.2.2 Avaliar após o tratamento com riboflavina (P22 – P35)

- Marcha locomotora, através do teste Catwalk, no P28;
- Atividade locomotora em campo aberto, no P28;
- Força muscular, através do teste de força manual em P28, realizado pelo aparelho GripStrength Sytem;
- Coordenação motora e equilíbrio, através do teste de barras paralelas, em P35.

5.2.3 Avaliar *ex vivo* (P36)

- Peso dos tecidos (cérebro, músculos sóleo e EDL, e fígado);
- Índice hepatossomático.

6 MÉTODOS

6.1 ANIMAIS

Foram utilizados 48 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar* (10-12 por grupo), provenientes de ratas progenitoras da colônia do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição – UFPE. As ratas progenitoras foram escolhidas conforme os seguintes critérios: ausência de consaguinidade, idade entre 90 e 120 dias de vida, peso entre 220 e 250 gramas e primíparas. Estes cuidados foram adotados para minimizar possíveis influências genéticas e fisiológicas nos resultados. A prenhez foi diagnosticada pelo peso corporal. Um dia após o nascimento foi realizada a sexagem, redução de ninhadas e randomização aleatória dos filhotes com peso corporal ideal (6g a 8g), mantendo-se oito filhotes por nutriz, sendo dois filhotes para cada grupo experimental, até o 36º dia de vida, quando foram sacrificados ao fim das análises. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação da Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica, sob uma temperatura de 22 +/- 2°C, ciclo claro-escuro invertido de 12/12 horas, com luzes apagadas às 8h00, alojados em gaiolas de polipropileno e livre acesso à água e à dieta padrão em todas as etapas do estudo. Toda a manipulação animal foi realizada conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e somente iniciada após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa e Utilização de Animais (CEUA), conforme Lei n 11.794/2008, decreto n. 6.899/2009 e demais disposições legais pertinentes, sob registro nº 0014/2023 (UFPE).

6.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 10 ninhadas para obtenção final de 48 ratos machos. Toda as ninhadas foram padronizadas para oito filhotes por nutriz. Os animais de cada ninhada foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais e receberam, diariamente, injeções no volume de 10 µL/g, via subcutânea, durante os 21 dias pós-natais (P1 ao P21). Os grupos formados foram: Grupo Controle Salina (Grupo C), formado por animais que receberam apenas solução salina (0,9% de NaCl); Grupo R1, constituído por ratos que receberam riboflavina na dose de 1 mg/kg, diluída em salina; Grupo R2,

composto por filhotes machos que receberam riboflavina na dose de 10 mg/kg, diluídas em salina; e Grupo R3, formado por animais que receberam riboflavina na dose de 100 mg/kg, diluídas em salina. Ao final dos experimentos, cada grupo foi composto por 10-12 animais, a depender da análise experimental. Toda a manipulação considerou os riscos da separação materna, portanto, até o desmame, os filhotes foram mantidos afastados de suas mães por um tempo máximo de 6 minutos durante as análises.

6.3 ANÁLISES EXPERIMENTAIS

6.3.1 Análises experimentais realizadas durante o tratamento com riboflavina (P1 ao P21 pós-natal)

6.3.1.1 Ontogênese sensório-motora

Para avaliar os impactos da administração de diferentes doses de riboflavina sobre o desenvolvimento sensório-motor de todos os grupos experimentais, analisamos durante os 21 dias pós-natais, os seguintes reflexos: preensão palmar, recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas, resposta ao susto, geotaxia negativa e queda livre. O reflexo foi considerado positivo após três dias consecutivos de aparecimento completo da resposta esperada (Fox, 1965). Ao final, foram avaliados 12 animais por grupo experimental.

- **Preensão palmar:** este é um reflexo primitivo e inerente ao animal. Para detectá-lo, utilizou-se um bastonete de 5 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro. Este bastonete foi levemente pressionado na pata anterior esquerda do animal, onde a resposta foi considerada negativa após duas tentativas sem realização da flexão;
- **Recuperação de decúbito:** o animal foi colocado em decúbito dorsal e apresentou 10 segundos (s) para virar em decúbito ventral, apoiando-se sobre as 4 patas, sendo esta considerada uma resposta positiva;
- **Colocação de vibrissas:** o rato foi suspenso pela cauda até que suas vibrissas tocassem a borda da mesa. O animal apresentou 10s para colocar as patas dianteiras sobre a mesa, tentando caminhar;

- Aversão ao precipício: o animal foi colocado com as patas dianteiras sobre uma superfície alta e plana (mesa), de forma a detectar o precipício. O animal apresentou 10s para se afastar 45° da borda da mesa, caracterizando a aversão ao precipício;
- Resposta ao susto: o rato foi submetido ao estampido agudo realizado com recipiente e bastonete metálicos (4,5 cm de largura e 6 cm de comprimento) e oco, com uma distância de aproximadamente 10 cm do animal. Considerou-se como resposta positiva, a ocorrência de uma retração rápida, com simultânea imobilização do animal, caracterizando o susto;
- Geotaxia negativa: o animal foi colocado com a cabeça para baixo e corpo voltado para cima sobre uma rampa de 45°, coberta com papel crepom preto. Considerou-se como resposta positiva, o movimento giratório do corpo em aproximadamente 140°, associado à colocação da cabeça no sentido ascendente, em tempo estimado de até 10s;
- Queda livre: o rato foi segurado pelas quatro patas no sentido ventral e, em seguida, solto com o dorso para baixo em uma altura de 30 cm (medição realizada através de uma régua), sobre um recipiente de 30 cm de largura x 12 cm de comprimento, com algodão, para amortecer a queda.

6.3.1.2 *Maturação somática*

Para avaliar os efeitos da administração de diferentes doses de riboflavina sobre o desenvolvimento somático de todos os grupos, observamos o surgimento das características somáticas descritas abaixo, durante o P1 ao P21, conforme o método proposto por Smart e Dobbing (1971). Ao final, foram avaliados 12 animais por grupo experimental.

- Abertura ocular: considerou-se como idade de maturação a abertura dos dois olhos, acompanhados de movimento palpebral;
- Abertura do pavilhão auditivo: os pavilhões apresentam-se dobrados por serem primitivos, mas com o tempo tornam-se palpáveis pelo pesquisador. Considerou-se este momento como a idade de maturação;
- Abertura do conduto auditivo: os dois orifícios auditivos nascem fechados, mas com o tempo, abrem-se e tornam-se visíveis por auxílio de uma lupa com foco luminoso. Neste momento, considerou-se a idade de maturação;

- Erupção dos incisivos inferiores: considerou-se rompimento da gengiva junto à exposição dos dentes inferiores incisivos como idade de maturação;
- Erupção dos incisivos superiores: considerou-se o rompimento da gengiva junto à exposição dos dentes superiores incisivos como idade de maturação.

6.3.1.3 Crescimento murinométrico e evolução do peso corporal

Com o objetivo de avaliar as repercussões da administração de diferentes doses de riboflavina sobre o crescimento somático, estudou-se diariamente o desenvolvimento murinométrico e o ganho de peso corporal dos grupos experimentais. O peso foi aferido através de uma balança digital calibrada por um único avaliador para evitar o surgimento de possíveis vieses. Com o auxílio de um paquímetro digital, o avaliador também analisou as seguintes medidas murinométricas, conforme proposto por Gouveia *et al.* (2020): eixo látero-lateral do crânio, eixo ântero-posterior do crânio, eixo longitudinal e comprimento da cauda. Dessa forma, para as análises descritas abaixo, consideramos 10 animais por grupo experimental.

- Eixo látero-lateral do crânio: seguindo uma referência de linha imaginária perpendicular ao eixo látero-lateral do crânio, e dividindo os pavilhões auriculares, cada animal foi contido por uma das mãos do pesquisador, de modo que sua cabeça se enquadrasse entre o dedo indicador e o polegar, possibilitando a medição;
- Eixo ântero-posterior do crânio: foram consideradas como referências as linhas médias que vão do focinho ao ponto de interseção com outra linha perpendicular imaginária, sendo esta última, tangencial às extremidades posteriores dos pavilhões auriculares. O animal foi contido com uma das mãos do pesquisador, de modo que sua cabeça se enquadrasse entre o dedo indicador e o polegar, possibilitando a medição;
- Eixo longitudinal: o animal teve o dorso anterior e os posteriores comprimidos, e a cauda de encontro a uma superfície plana e lisa (mesa). Foram feitas marcações com caneta, permitindo medir a distância (mm) do focinho à cauda do rato;
- Comprimento da cauda: o rato foi segurado por uma das mãos do pesquisador e, sua cauda, colocada verticalmente sobre uma base plana e lisa (mesa). Foi

realizada uma marcação com caneta, da base da cauda à extremidade, para obter-se um valor em mm.

6.3.2 Análises experimentais realizadas após o tratamento com riboflavina (P22 – P35)

6.3.2.1 Marcha em CatWalk

O CatWalk System é um instrumento correspondente a uma passarela fechada, iluminada por luz fluorescente, capaz de identificar parâmetros dinâmicos e estáticos na marcha locomotora do animal (Herold *et al.*, 2016). Os ratos são habituados um dia antes do teste e avaliados no P25 para os seguintes parâmetros capturados pelo software: base de suporte (cm), variação máxima (%), velocidade de balanço (cm/s) e cadência (passos/segundo). O ganho da câmera corresponde a 20, e o limiar de detecção, a 0,1. As corridas foram realizadas entre 0,50 e 5,00 segundos de duração. Considerou-se a média de três execuções compatíveis para avaliação. Após cada execução, o aparelho foi cuidadosamente limpo com papel toalha umedecido de solução de etanol a 70%. Para esse teste, consideramos 10 animais por grupo experimental.

6.3.2.2 Atividade locomotora em campo aberto

O campo aberto é um aparato circular, com 1 metro de comprimento, dividido em três zonas. Os animais são adaptados um dia anterior ao teste e filmados por 5 minutos em locomoção livre, no dia seguinte, durante a fase escura do ciclo circadiano, na idade de P28 (Adaptado de Pereira *et al.*, 2021). Utilizamos o software de rastreamento comportamental ANY-maze para leitura automática dos vídeos capturados durante o experimento, onde avaliamos as medidas de velocidade média (m/s), tempo imóvel (s), entrada nas zonas 1, 2 e 3 (n) e tempo de permanência nas zonas 1, 2, 3 (s). Para esse teste, consideramos 10 animais por grupo experimental.

6.3.2.3 Avaliação da força muscular

Para avaliar a força muscular, utilizou-se o teste de força por preensão manual, através de um indicador de força muscular geral, o GripStrength System. Este teste é semelhante ao teste de preensão palmar para pessoas e avalia a capacidade do

animal de segurar um dispositivo com a pata (Meyer *et al.*, 1979). Em P28, os ratos foram posicionados horizontalmente a partir de uma barra para apoio (Grip) e puxados de maneira lenta e contínua para baixo, até soltarem. O ensaio foi repetido três vezes e calculou-se a média do pico de força aplicado pelas patas dianteiras. Os ratos foram pesados antes do teste, permitindo que a força de preensão fosse normalizada pelo peso. Assim, avaliamos o pico de força muscular geral e o relativo ao peso corporal. Para esse teste, consideramos 10 animais por grupo experimental.

6.3.2.4 Avaliação da coordenação motora e equilíbrio

O teste de barras paralelas foi realizado em P35 para avaliar a coordenação motora dos animais em locomoção livre. O aparato constitui-se de duas barras de aço, com 1,0 cm de diâmetro e 1,15 cm de comprimento. Elas são conectadas a uma plataforma de 15x50 cm² e distanciadas por 2,5 cm entre si. O teste foi realizado segundo o protocolo adaptado de Costa-de-Santana *et al.* (2023), cujos animais são habituados um dia anterior à análise e posteriormente avaliados quanto ao tempo percorrido em movimento (s) e erros equiparados de passos (n). Foram avaliados o tempo em movimento sem queda (s) e o número de erros de passos por segundo de tempo em movimento (n/s). Utilizou-se uma câmera filmadora para capturar imagens da movimentação dos animais durante 3 minutos. Corridas inferiores a 2 minutos de duração foram desconsideradas, repetindo-se o experimento. Para esse teste, consideramos 10 animais por grupo experimental.

6.3.3 Análises experimentais após o sacrifício (P36)

6.3.3.1 Peso dos órgãos

Os animais foram pesados e sacrificados no P36, após a realização de todas as análises comportamentais. Os ratos de todos os grupos experimentais foram eutanasiados por decapitação e seus tecidos (cérebro, soléo, EDL e fígado) coletados para análise do peso através de uma balança digital calibrada. Nessa análise, consideramos uma amostra de 6 animais por grupo experimental.

6.3.3.2 Índice hepatossomático

O sacrifício dos animais foi realizado no P36, após todas as análises comportamentais e aferição de peso corporal (PC). Para a coleta do fígado, realizou-se a decapitação com auxílio de guilhotina. O peso do fígado (PF) dos animais de todos os grupos experimentais foi aferido através de uma balança digital, imediatamente após a sua extração. O índice hepatossomático (IH) foi calculado através da seguinte fórmula: $PF/PC \times 100$ (Wotoon *et al.*, 1978). Nessa análise, consideramos uma amostra de 6 animais por grupo experimental.

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 8 para análise dos dados coletados. A normalidade dos resultados foi avaliada segundo o teste Kolmogorov-Smirnov. O teste anova Two-way medidas repetidas foi aplicado para a análise estatística do peso corporal e crescimento murinométrico. Na avaliação desses dados, considerou-se o fator de interação entre grupos (F). A análise da ontogênese de reflexos, maturação somática, testes comportamentais (marcha e atividade locomotora, força muscular e coordenação motora/equilíbrio), peso dos órgãos e índice hepatossomático foi realizada através do teste Kruskal-Wallis. Todos os resultados foram avaliados, secundariamente, pelo pós-teste Dunnet. Os dados de peso corporal, crescimento murinométrico, testes comportamentais, peso dos órgãos e índice hepatossomático foram sumarizados em média \pm desvio padrão da média, enquanto os resultados referentes à ontogênese de reflexos e maturação somática foram apresentados através de mediana e valores de mínimo e máximo. Para todos os fins, consideramos o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

7 RESULTADOS

7.1 ONTOGÊNESE DE REFLEXOS E MATURAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SOMÁTICAS

A ontogênese de reflexos e a maturação somática foram avaliadas em todos os grupos experimentais durante o P1 ao P21 pós-natal. Diferenças não foram observadas apenas para a maturação dos reflexos de preensão palmar (teste Kruskal-Wallis: 4,870; $p=0,1816$) e resposta ao susto (teste Kruskal-Wallis: 3,611; $p=0,3066$). A colocação pelas vibrissas distinguiu-se entre os grupos experimentais (teste Kruskal-Wallis: 24,17; $p=0,0001$) e os animais R2 e R3 atingiram mais rapidamente a maturação reflexa (C vs R2; $p=0,0005$; C vs R3; $p<0,0001$). A ontogênese do reflexo recuperação de decúbito diferiu entre os grupos avaliados (teste Kruskal-Wallis: 21,36; $p<0,0001$), com surgimento mais acelerado para os animais R3 (C vs R3; $p<0,0001$). Observou-se diferença para a ontogênese do reflexo de aversão ao precipício (teste Kruskal-Wallis: 12,36; $p=0,0062$), com maturação precoce para o grupo R3 (C vs R3; $p=0,0018$). A geotaxia negativa, ademais, diferiu entre os grupos experimentais (teste Kruskal Wallis: 18,41; $p=0,0004$), com um surgimento acelerado para o grupo R3 (C vs R3; $p<0,0001$). Por fim, a ontogênese do reflexo de queda livre também se distinguiu entre os grupos analisados (teste Kruskal-Wallis: 10,41; $p=0,0154$) e apresentou-se antecipado para os animais R3 (C vs R3; $p=0,0045$). Quanto à maturação das características físicas, observou-se diferença para a abertura ocular (teste Kruskal-Wallis: 17,02; $p=0,0007$), com maturação acelerada para os animais R3 (C vs R3; $p=0,0018$), para a erupção dos incisivos inferiores (teste Kruskal-Wallis: 10,96; $p=0,0120$), cujos animais do grupo R3 rapidamente alcançaram a resposta somática esperada (C vs R3; $p=0,0276$), e para a erupção dos incisivos superiores (teste Kruskal-Wallis: 15,45; $p=0,0015$), com um surgimento precoce para os animais R3 (C vs R3; $p=0,0024$).

Reflexo	C (n = 12)	R1 (n = 12)	R2 (n = 12)	R3 (n = 12)
Preensão palmar	4,0 (3-5)	3,0 (3-4)	3,5 (3-5)	3,0 (3-4)

Recuperação de decúbito	7,5 (6-10)	6,5 (3-9)	6,0 (5-8)	5,0 (3-6) ^{****c}
Colocação pelas vibrissas	7,0 (5-10)	6,0 (3-9)	4,5 (3-6) ^{***b}	4,0 (3-5) ^{****c}
Aversão ao precipício	7,0 (6-9)	6,5 (4-9)	6,0 (5-8)	5,0 (4-7) ^{***c}
Resposta ao susto	13,5 (13-18)	14,0 (12-16)	14,0 (13-16)	12,0 (10-14)
Geotaxia negativa	12,0 (9-17)	9,0 (7-13)	10,5 (8-13)	7,0 (5-13) ^{**c}
Queda livre	16,5 (10-18)	13,0 (10-17)	12,5 (11-16)	12,0 (10-14) ^{*c}
Característica somática				
Abertura ocular	14,0 (13-14)	14,0 (13-15)	14,0 (12-15)	13,0 (11-14) ^{**c}
Abertura do pavilhão auditivo	2,0 (2-6)	2 (2-4)	2 (2-5)	2 (2-3)
Abertura do conduto auditivo	12,0 (8-14)	11,5 (8-13)	12 (8-12)	11,5 (8-12)
Erupção dos incisivos superiores	9,5 (8-11)	9,0 (8-10)	9,5 (7-12)	7,0 (7-9) ^{**c}
Erupção dos incisivos inferiores	10,5 (9-14)	11,0 (9-13)	11,5 (9-14)	9,0 (9-11) ^{*c}

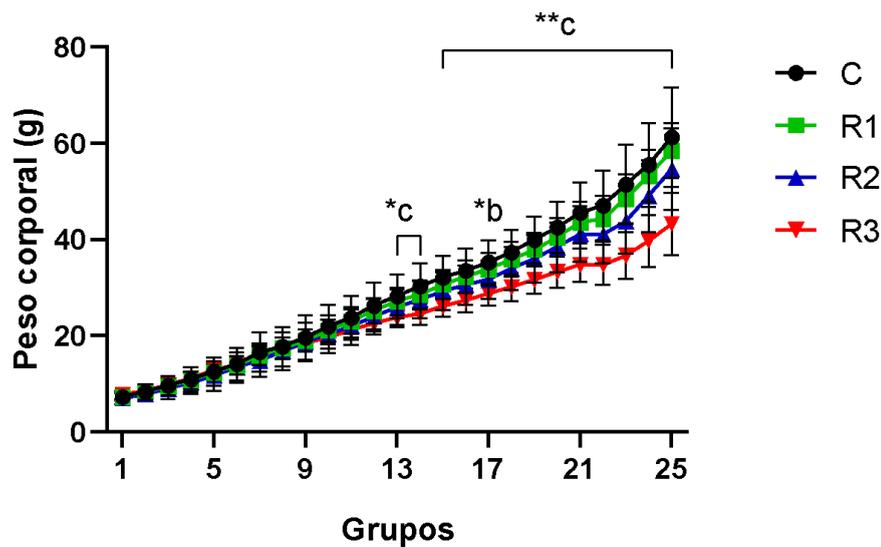
Tabela 1. Dia pós-natal da ontogênese dos reflexos e maturação somática. Esses marcos foram avaliados durante o período de intervenção neonatal com veículo ou riboflavina (P1 ao P21). Os grupos foram divididos de acordo com o tratamento: C (controle, n = 12); R1 (riboflavina, 1 mg/kg, n = 12); R2 (riboflavina 10 mg/kg, n = 12), R3 (riboflavina 100 mg/kg, n = 12). Os dados são apresentados como mediana e valor

mínimo e máximo. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e seguido do pós-teste Dunnet. ^aC vs R1, ^bC vs R2, ^cC vs R3; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

7.2 PESO CORPORAL

O peso corporal foi aferido durante os dias P1 ao P25 em todos os grupos experimentais. Houve interação entre os grupos [$F_{(3,137, 34,50)} = 16,23$; $p < 0,0001$] e valores distintos foram observados entre os grupos C e R2, no dia P17 (C: $33,25 \pm 3,40$; R2: $29,00 \pm 2,39$, $p < 0,05$), com ganho de peso reduzido para os animais R2 em comparação aos controles, assim como entre os animais R3 e C, durante os dias P13 a P14 (C: $25,50 \pm 1,41$; R3: $23,88 \pm 0,88$, $p < 0,05$) e P15 ao P25 (C: $43,45 \pm 9,11$; R3: $33,31 \pm 5,21$, $p < 0,01$), com um ganho de peso reduzido para os animais tratados com 100 mg/kg de riboflavina em comparação ao grupo controle. Dessa forma, nota-se efeitos das doses 10 mg/kg e 100 mg/kg sobre a redução do peso corporal a partir da segunda semana de intervenção neonatal, com resultados permanentes para a dose elevada (grupo R3), mesmo após o término da administração farmacológica (P1 ao P21) (Figura 4).

Figura 4. Análise do peso corporal durante os dias P1 ao P25 pós-natal. A composição dos grupos é de acordo com a intervenção neonatal (P1 ao P21) com riboflavina (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo: C (controle, $n = 10$); R1 (riboflavina, 1 mg/kg, $n = 10$); R2 (riboflavina, 10 mg/kg, $n = 10$); e R3 (riboflavina, 100 mg/kg, $n = 10$). Os dados são apresentados como média e desvio padrão da média e foram analisados por meio do teste de análise de variância para medidas repetidas anova two-way seguido do teste post hoc de Dunnet. ^aC vs R1; ^bC vs R2; ^cC vs R3. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



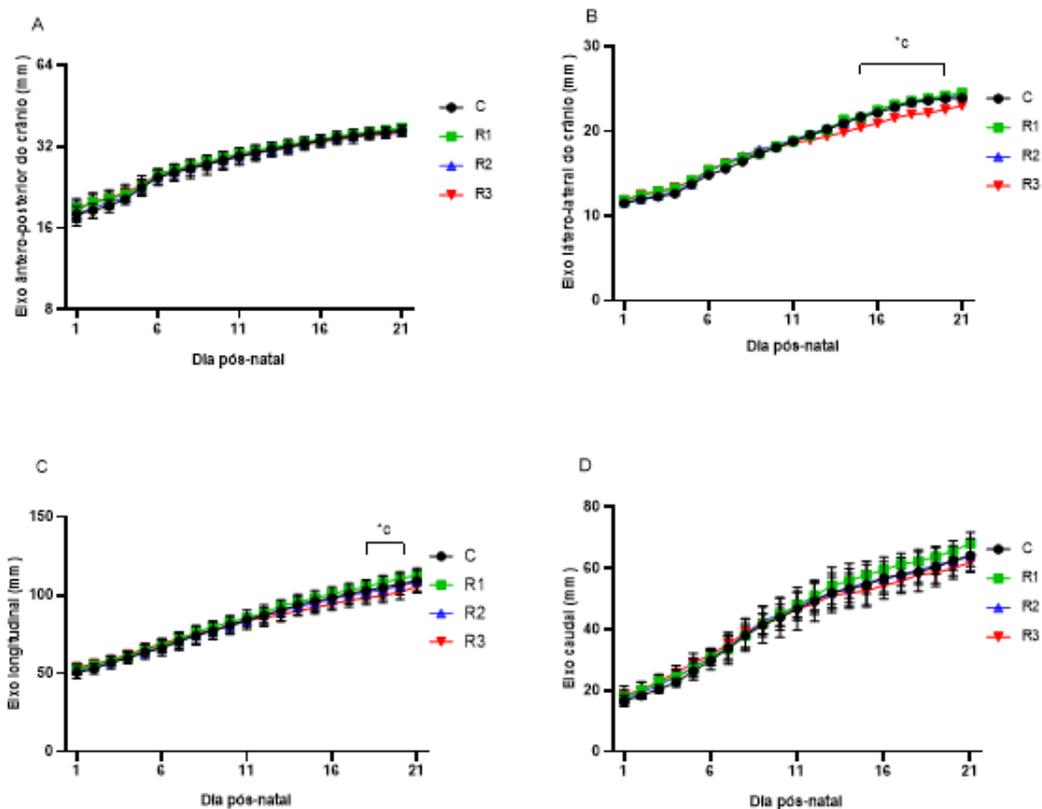
Fonte: autora (2024).

7.3 CRESCIMENTO MURINOMÉTRICO

O crescimento murinométrico foi avaliado durante o tratamento neonatal com veículo ou riboflavina (P1 ao P21 pós-natal), através das medições dos eixos ântero-posterior e látero-lateral do crânio, eixo longitudinal e eixo caudal. Não houve interação entre os grupos para o crescimento do eixo ântero-posterior do crânio [$F_{(60, 776)} = 0,4425$; $p > 0,9999$], cujo comprimento não diferiu entre os grupos durante os 21 dias de análise somática (C = $28,58 \pm 6,08$; R1 = $29,25 \pm 5,96$; R2 = $28,67 \pm 5,99$, R3 = $28,75 \pm 5,50$; $p > 0,05$) (Figura 5A). A interação entre os grupos experimentais para o comprimento do eixo látero-lateral do crânio não foi significativa [$F_{(60, 776)} = 1,184$; $p = 0,1672$], mas os animais do grupo C apresentaram um maior comprimento com relação aos animais R3 nos dias P15 (C = $21,69 \pm 1,80$; R3 = $20,43 \pm 1,34$; $p < 0,05$), P16 (C = $22,17 \pm 1,95$; R3 = $20,93 \pm 1,44$; $p < 0,05$), P17 (C = $22,81 \pm 1,94$; R3 = $21,58 \pm 1,37$; $p < 0,05$), P18 ($23,29 \pm 1,54$; R3 = $22,00 \pm 1,39$; $p < 0,05$), P19 (C = $23,63 \pm 1,52$; R3 = $22,15 \pm 1,41$; $p < 0,05$) e P20 (C = $23,84 \pm 1,40$; R3 = $22,56 \pm 1,21$; $p < 0,05$) (Figura 5B). Uma interação entre os grupos para o eixo longitudinal [$F_{(60, 776)} = 1,342$; $p = 0,0472$] foi também observada (C = $18,35 \pm 4,34$; R1 = $18,65 \pm 4,25$; R2 = $18,58 \pm 4,32$; R3 = $18,01 \pm 3,57$), cujo comprimento mostrou-se acentuado para os animais C, comparados ao grupo R3, durante os dias P18 (C = $23,39 \pm 1,54$; R3 = $22,00 \pm 1,39$;

$p < 0,05$), P19 ($C = 23,63 \pm 1,52$; $R3 = 22,15 \pm 1,41$; $p < 0,05$) e P20 ($C = 23,84 \pm 1,40$; $R3 = 22,56 \pm 1,21$; $p < 0,05$) (Figura 5C). Não houve interação entre os grupos para o eixo caudal [$F_{(60, 776)} = 0,8796$; $p = 0,7289$], cujo crescimento apresentou-se padronizado para todos os animais analisados durante os 21 dias pós-natais ($C = 43,24 \pm 15,73$; $R1 = 45,18 \pm 16,55$; $R2 = 43,87 \pm 15,26$; $R3 = 43,22 \pm 13,97$) (Figura 5D).

Figura 5. Análise do crescimento somático durante o período de intervenção neonatal (P1 ao P21). A composição dos grupos é de acordo com o tratamento com riboflavina (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (salina, 0,9% NaCl, sem riboflavina: C (controle, $n = 10$); R1 (riboflavina, 1 mg/kg, $n = 10$); R2 (riboflavina, 10 mg/kg, $n = 10$); e R3 (riboflavina, 100 mg/kg, $n = 10$). Os dados são apresentados como média e desvio padrão da média e analisados por meio do teste de análise de variância para medidas repetidas two-way seguido do teste post hoc de Dunnett. ^aC vs R1; ^bC vs R2; ^cC vs R3. * $p < 0,05$.

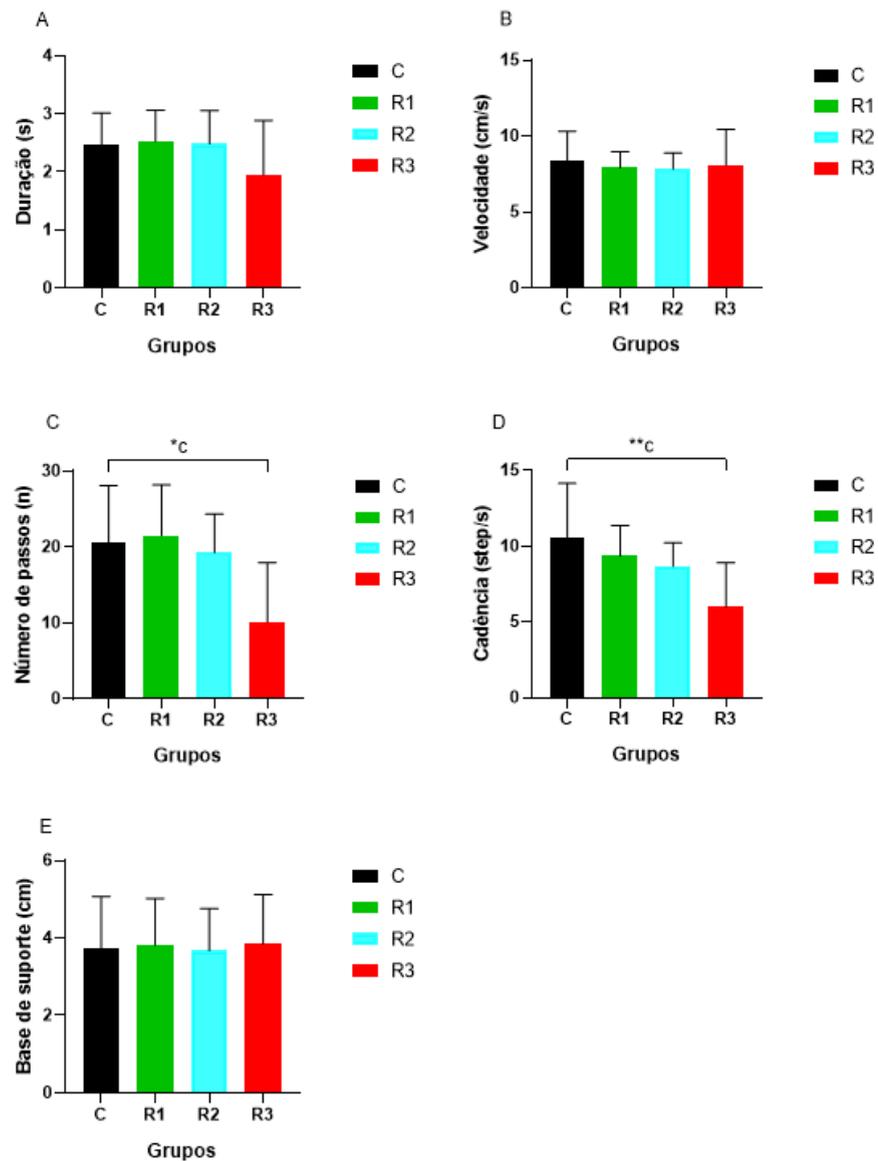


Fonte: autora (2024).

7.4 MARCHA EM CATWALK

Em P28, todos os animais foram submetidos à análise da marcha locomotora em CatWalk. As seguintes medidas foram padronizadas em todos os grupos experimentais: duração de corrida (s) (Figura 6A – C: $2,47 \pm 0,54$; R1: $2,52 \pm 0,53$; R2: $2,48 \pm 0,57$; R3: $1,94 \pm 0,94$), velocidade média (m/s) (Figura 6B – C: $8,38 \pm 1,93$; R1: $7,91 \pm 1,06$; R2: $7,83 \pm 1,05$; R3: $8,10 \pm 2,36$) e base de suporte (cm) (Figura 6E – C: $3,72 \pm 1,34$; R1: $3,81 \pm 1,21$; R2: $3,67 \pm 1,08$; R3: $3,84 \pm 1,27$). No entanto, com relação aos animais controle, o grupo R3 apresentou valores otimizados no número médio de passos realizados durante uma corrida (Figura 6C – teste Kruskal-Wallis: 10,61; C: $20,50 \pm 7,59$; R3: $10,11 \pm 7,85$; $p=0,0170$) e no número de passos calculados por segundo de tempo (Figura 6D – teste Kruskal-Wallis: 13,05; C: $10,59 \pm 3,54$; R3: $5,99 \pm 2,91$; $p=0,0014$), sugerindo eficiência metabólica durante a atividade física.

Figura 6. Análise da marcha locomotora, através do CatWalk, em P28. A composição dos grupos é de acordo com a intervenção com riboflavina (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (salina, 0,9% NaCl, sem riboflavina): C (controle, n = 10); R1 (riboflavina, 1 mg/kg, n = 10); R2 (riboflavina, 10 mg/kg, n = 10); e R3 (riboflavina, 100 mg/kg, n = 10). Os dados são apresentados como média e desvio padrão da média e foram analisados por meio do teste Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunnet. ^aC vs R1, ^bC vs R2, ^cC vs R3; * $p<0.05$; ** $p<0.01$.



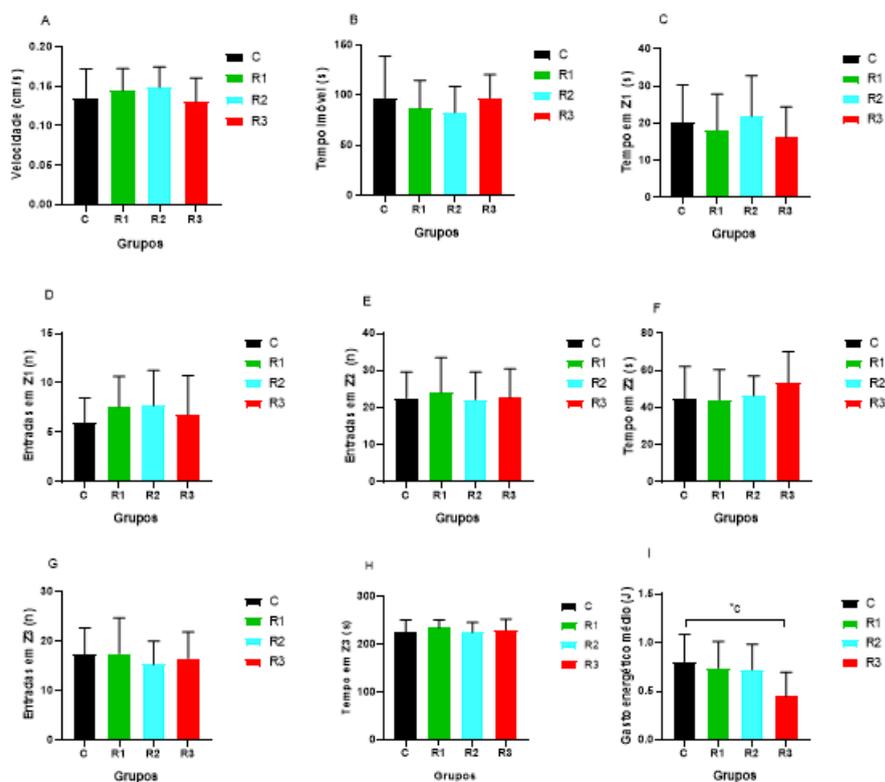
Fonte: autora (2024).

7.5 ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO

Em P28 pós-natal, avaliou-se a atividade locomotora em campo aberto para todos os grupos experimentais. Não foram reportadas diferenças quanto à velocidade média (C: $0,145 \pm 0,029$; R1: $0,145 \pm 0,027$; R2: $0,149 \pm 0,025$; R3: $0,130 \pm 0,030$), tempo imóvel (C: $97,14 \pm 41,75$; R1: $87,04 \pm 27,67$; R2: $82,69 \pm 25,76$; R3: $97,09 \pm 23,38$), tempo em zonas 1 (C: $20,19 \pm 10,17$; R1: $18,14 \pm 9,71$; R2: $22,91 \pm 10,92$; R3: $22,70 \pm 7,74$), 2 (C: $44,83 \pm 17,36$; R1: $44,21 \pm 16,21$; R2: $46,51 \pm 10,53$; R3: $53,48 \pm 16,78$) e 3 (C: $224,82 \pm 26,35$; R1: $234,88 \pm 16,31$; R2: $225,33 \pm 20,80$; R3: $229,96 \pm$

23,48), e número de entradas nas zonas 1 (C: $6,00 \pm 2,49$; R1: $7,60 \pm 3,06$; R2: $7,70 \pm 3,56$; R3: $6,80 \pm 3,93$), 2 (C: $22,60 \pm 7,04$; R1: $24,10 \pm 9,42$; R2: $22,20 \pm 7,42$; R3: $22,70 \pm 7,74$) e 3 (C: $17,30 \pm 5,37$; R1: $17,50 \pm 7,21$; R2: $15,30 \pm 4,69$; R3: $16,50 \pm 5,35$) (Figuras 7A – H). Os grupos apresentaram interação para os valores de gasto médio de energia (J) durante a atividade (Figura 7I) (teste Kruskal-Wallis: 8,514; $p=0,0365$). Os animais R3 gastaram menos energia que o grupo controle para se locomover (C: $0,80 \pm 0,28$; R3: $0,45 \pm 0,24$; $p=0,022$), ainda que diante de um desempenho locomotor semelhante.

Figura 7. Análise da atividade locomotora em campo aberto (P28). A composição dos grupos é de acordo com a intervenção com riboflavina (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (salina, 0,9% NaCl, sem riboflavina); C (controle, n = 10); R1 (riboflavina, 1 mg/kg, n = 10); R2 (riboflavina, 10 mg/kg, n = 10); e R3 (riboflavina, 100 mg/kg, n = 10). Os dados são apresentados como média e desvio padrão da média e analisados por meio do teste Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunnet. ^aC vs R1, ^bC vs R2, ^cC vs R3; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

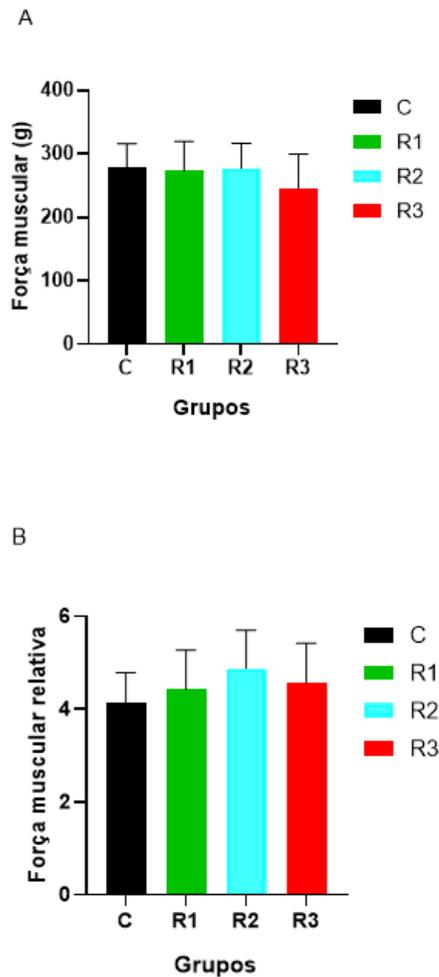


Fonte: autora (2024).

7.6 FORÇA MUSCULAR

A força muscular de todos os animais do estudo foi avaliada no P28, através de um sensor de força de preensão manual, chamado GripStrength System. Após a captação de três medidas de força muscular absoluta (g), calculou-se a média de força geral e sua medida relativa ao peso corporal (g). Não foram observadas diferenças para força muscular absoluta (C: $277,70 \pm 38,35$; R1: $273,30 \pm 46,59$; R2: $277,00 \pm 39,98$; R3: $245,69 \pm 53,75$; $p > 0,05$) (Figura 8A) ou relativa (C: $4,13 \pm 0,66$, R1: $4,42 \pm 0,84$, R2: $4,88 \pm 0,82$; R3: $4,57 \pm 0,85$; $p > 0,05$) entre os grupos experimentais avaliados (Figura 8B).

Figura 8. Análise da força muscular (g) pelo aparelho GripStrength System em P28 pós-natal. A composição dos grupos é de acordo com a intervenção neonatal (P1 ao P21) com riboflavina (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (salina, 0,9% NaCl, sem riboflavina): C (controle, n = 10); R1 (riboflavina, 1 mg/kg, n = 10); R2 (riboflavina, 10 mg/kg, n = 10); e R3 (riboflavina, 100 mg/kg, n = 10). Os dados são apresentados como média e desvio padrão da média e foram analisados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunnet. ^aC vs R1, ^bC vs R2, ^cC vs R3.



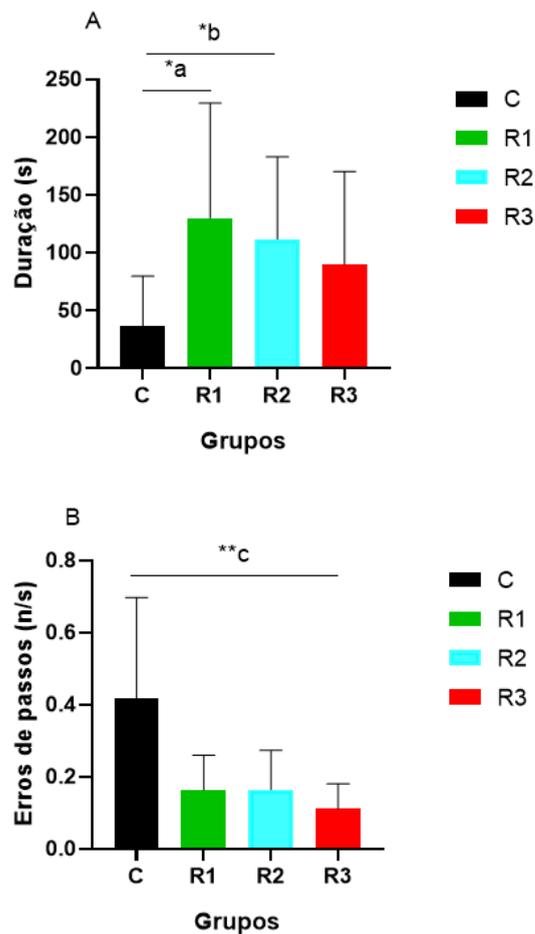
Fonte: autora (2024).

7.7 COORDENAÇÃO MOTORA E EQUILÍBRIO

Em P35, foram analisados a coordenação motora e equilíbrio através do teste de barras paralelas. Avaliou-se o tempo de movimentação (s) e o número de erros de passos por segundo em movimento (n/s). Os grupos diferiram na duração do teste (s) (teste Kruskal-Wallis: 9,707; $p=0,0212$) (Figura 9A). Logo, em comparação ao grupo controle, os animais R1 e R2 apresentaram um maior desempenho de atividade segundo o tempo de caminhada (s) nas barras paralelas (C: $36,40 \pm 43,26$; R1: $130,00 \pm 99,38$; R2: $111,70 \pm 71,34$; C vs R1: $p=0,0191$; C vs R2: $p=0,0278$). Os animais tratados com a maior dose de riboflavina (grupo R3) também apresentaram maior eficiência motora, devido ao menor número de erros de passos por segundo em

movimento, quando comparados ao grupo controle (Figura 9B) (teste Kruskal-Wallis: 11,64; C: $11,50 \pm 12,86$; R3: $7,50 \pm 4,19$; $p = 0,0022$).

Figura 9. Análise da coordenação motora e equilíbrio em barras paralelas (P35). A composição dos grupos é de acordo com a intervenção com riboflavina (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (salina, 0,9% NaCl, sem riboflavina): C (controle, $n = 10$); R1 (riboflavina, 1 mg/kg, $n = 10$); R2 (riboflavina, 10 mg/kg, $n = 10$); e R3 (riboflavina, 100 mg/kg, $n = 10$). Os dados são apresentados como média e desvio padrão da média e foram analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunnet. ^aC vs R1, ^bC vs R2, ^cC vs R3; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Fonte: autora (2024).

7.8 PESO DOS ÓRGÃOS

Os animais foram eutanasiados por decapitação em P36 e seus tecidos foram coletados e pesados antes do armazenamento. Não foram observadas diferenças para o peso do cérebro (teste Kruskal-Wallis: 6,547; $p=0,088$), sóleo (teste Kruskal-Wallis: 1,305; $p=0,728$), EDL (teste Kruskal-Wallis: 4,064; $p=0,254$) e fígado (teste Kruskal-Wallis: 5,273; $p=0,152$).

	C (n = 6)	R1 (n = 6)	R2 (n = 6)	R3 (n = 6)	
Peso (g)					
Cérebro	1,639	$\pm 1,639$	$\pm 1,679$	$\pm 1,527$	\pm
	0,175	0,117	0,094	0,071	
Sóleo	0,036	$\pm 0,036$	$\pm 0,037$	$\pm 0,033$	\pm
	0,009	0,007	0,009	0,008	
EDL	0,026	$\pm 0,036$	$\pm 0,028$	$\pm 0,029$	\pm
	0,009	0,008	0,014	0,010	
Fígado	0,331	$\pm 0,324$	$\pm 0,324$	$\pm 0,445$	\pm
	0,011	0,008	0,092	0,096	

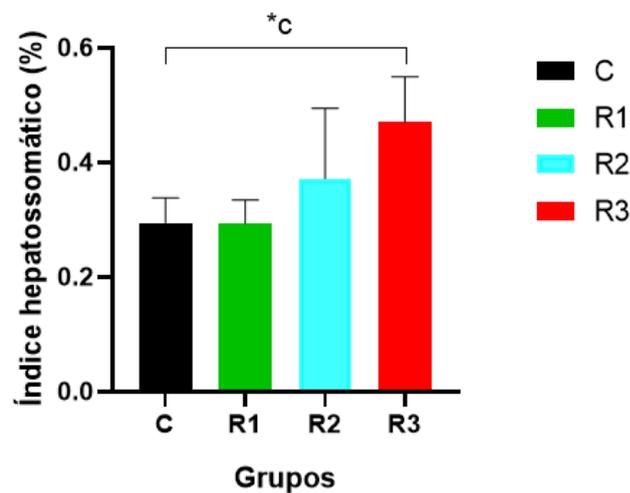
Tabela 2. Peso do cérebro, músculos e fígado em P36. Os grupos foram divididos de acordo com a intervenção com riboflavina ou veículo: C (controle, n = 6); R1 (riboflavina 1 mg/kg, n = 6); R2 (riboflavina 10 mg/kg, n = 6), R3 (riboflavina 100 mg/kg, n = 6). O peso (g) é apresentado como média e desvio padrão. A comparação estatística foi realizada por meio do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunnet.

7.9 ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO

O índice hepatossomático foi calculado através da seguinte fórmula: $PF/PC \times 100$, em P36. O peso corporal foi aferido minutos antes do sacrifício, enquanto o peso do fígado foi registrado durante a eutanásia e extração de tecidos. O cálculo sugere parâmetros de reservas energéticas no tecido hepático. Foram observadas diferenças no índice hepatossomático dos animais avaliados (teste Kruskal-Wallis: 11,53; $p=0,0092$). Os animais do grupo R3 apresentaram valores superiores de índice em comparação aos animais controle (C: $0,29 \pm 0,04$; R3: $0,47 \pm 0,07$; C vs R3; $p=0,0112$). Demais comparações não foram significativas (R1: $0,29 \pm 0,04$; R2: $0,37 \pm 0,12$). No entanto, o peso do fígado não diferenciou entre os grupos, sugerindo que os achados

referentes ao aumento do índice hepatossomático, relacionam-se à preservação da composição hepática, mesmo diante da redução no ganho de peso corporal, nos animais que formavam o grupo R3 (tratados com 100 mg/kg) (Figura 10).

Figura 10. Índice hepatossomático (%) em P36. A composição dos grupos é de acordo com a intervenção com riboflavina (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (salina, 0,9% NaCl, sem riboflavina): C (controle, n = 6); R1 (riboflavina, 1 mg/kg, n = 6); R2 (riboflavina, 10 mg/kg, n = 6); e R3 (riboflavina, 100 mg/kg, n = 6). Os dados são apresentados como média e desvio padrão da média e foram analisados por meio do teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post hoc de Dunnet. ^aC vs R1; ^bC vs R2; ^cC vs R3. *p<0,05.



Fonte: autora (2024).

8 DISCUSSÃO

Este estudo reúne os resultados sobre os efeitos do tratamento neonatal com diferentes doses de riboflavina sobre a ontogênese sensório-motora, a maturação somática, o crescimento murinométrico, a evolução de peso corporal e os parâmetros neuromotores em ratos. Nossos achados evidenciam que a intervenção com alta dose de riboflavina (100 mg/kg) antecipa a ontogênese de reflexos e a maturação somática, mas reduz o investimento energético para o crescimento físico e ganho de peso corporal. Além disso, a administração com alta dose de riboflavina atenua os parâmetros de gasto energético durante a marcha e a atividade locomotora, aprimora a coordenação motora e o equilíbrio, e aumenta o índice hepatossomático, um importante indicador de reservas de glicogênio no fígado (Enes, 2008). A realização deste estudo fornece a publicação de duas revisões sistemáticas sobre a riboflavina (Qualis A1 e A2), além da aprovação de um terceiro artigo, com os resultados originais (Qualis B1).

Em ratos, a ontogênese de reflexos requer a maturação das regiões centrais (Khalki *et al.*, 2012) e ocorre consoante à maturação somática e ao desenvolvimento rostral-caudal (Almli; Fisher, 1977). Os nossos resultados apoiam a ideia de que doses elevadas de riboflavina no período neonatal estimulam a ontogênese sensório-motora e a maturação somática em roedores. A intervenção com 100 mg/kg de riboflavina propiciou uma rápida maturação do reflexo de aversão ao precipício, uma resposta de evitamento a situações perigosas, como cair, que está relacionada ao desenvolvimento das habilidades cognitivo-motoras ao longo da vida (Le Gall *et al.*, 2019). Uma maturação precoce também foi observada para o reflexo de colocação pelas vibrissas; este é uma resposta cortical dependente da dopamina, cuja ontogênese resulta em um movimento sensório-motor de colocação dos membros sobre o plano, mediante à estimulação tátil das vibrissas (López-Ramos; Delgado-García, 2021).

Para além destes parâmetros, o reflexo de queda livre foi antecipado nos animais tratados com a dose mais elevada de riboflavina (100 mg/kg). O reflexo de queda livre, também conhecido como reflexo de endireitamento do corpo no ar, é um reflexo modulado pelo cerebelo, com participação dos núcleos vestibulares, e

controlado pela formação reticular, tendo Banasik (2009) defendido que o aparecimento precoce deste reflexo é um indicador da rápida diferenciação neuronal no córtex cerebelar. Segundo os nossos resultados, este mecanismo pode ser estimulado pela administração de altas doses de riboflavina. A deficiência gestacional de riboflavina e demais componentes do complexo B foi associada ao atraso do reflexo de queda livre em ratos e apoptose cerebral (Blaise *et al.*, 2007). Durante o período neonatal, a carência de vitaminas B ocasiona alterações no proteoma cerebral e produz a perda do reflexo de queda livre, o surgimento de convulsões e alterações cognitivas (Nunes *et al.*, 2018).

A recuperação de decúbito, por sua vez, é um reflexo de origem espinhal, cuja maturação está atribuída à diferenciação dos motoneurônios (neurônios motores) na região medular (Donnelly *et al.*, 2007). No nosso estudo, observou-se um desenvolvimento rápido deste reflexo nos animais tratados com 100 mg/kg de riboflavina, o que sugere que doses elevadas da vitamina B2 podem atuar na diferenciação dos motoneurônios. A perda progressiva dos motoneurônios é observada em crianças com deficiência no transportador de riboflavina (Niceforo *et al.*, 2021). Por outro lado, a suplementação com riboflavina atenua os danos nos neurônios motores (Niceforo *et al.*, 2021). Os neurônios motores podem ser subdivididos em neurônios braquiais, que são maiores em tamanho e densidade, e em neurônios lombares, que são caracterizados por potenciais de ação repetitivos e intensos (Cheng *et al.*, 1999). Na maturação do reflexo de recuperação de decúbito, os motoneurônios braquiais são mais diferenciados do que os motoneurônios lombares (Almli; Fisher, 1977). De acordo com os nossos resultados, foi observado um desenvolvimento rápido do reflexo de recuperação de decúbito em animais tratados com 100 mg/kg de riboflavina, propondo a hipótese de que doses elevadas da vitamina B2 atuam na diferenciação dos motoneurônios. Na doença de Brown-Vialetto, a suplementação com riboflavina permitiu a recuperação parcial dos neurônios motores degenerados, presentes na medula espinhal (Rizzo *et al.*, 2017).

A administração neonatal de 100 mg/kg de riboflavina também acelerou a maturação do reflexo de geotaxia negativa, que Fox (1965) descreveu como uma atividade motora precoce, unidirecional e orientada por estímulos, que move o corpo contra a gravidade. Ele acompanha o engatinhar e sugere a maturação e mielinização de regiões cerebrais envolvidas no comportamento motor do adulto, incluindo o córtex

e cerebelo (Fox, 1965; Sharma *et al.*, 2018). À semelhança dos nossos resultados, estudos pré-clínicos investigaram os efeitos precoces e tardios da carência ou suplementação de vitaminas B em fases críticas do desenvolvimento (Blaise *et al.*, 2007; 2009). Um desses estudos descreveu um rápido aparecimento do reflexo de geotaxia negativa em animais alimentados com dietas ricas em riboflavina durante a gestação e a lactação (Blaise *et al.*, 2009). Por outro lado, a deficiência de vitaminas do complexo B em roedores, incluindo folato, piridoxina e riboflavina, foi associada ao atraso na ontogênese do reflexo de geotaxia negativa (Ferguson *et al.*, 2005; Blaise *et al.*, 2007; Blaise *et al.*, 2009; Pourié *et al.*, 2015).

Em paralelo à ontogênese de reflexos, ocorre o aparecimento de marcos somáticos, que juntos sugerem um desenvolvimento rostrocaudal em roedores (Dobbing; Smart, 1974; Fox, 1965). Os nossos resultados indicam que doses elevadas de riboflavina promovem a rápida abertura dos olhos, erupção dos incisivos inferiores e erupção dos incisivos superiores em roedores. Não encontramos estudos semelhantes ao nosso, que analisassem o desenvolvimento somático após a administração de riboflavina. No entanto, dados já publicados demonstram que estímulos nutricionais podem ocasionar modificações metabólicas nos indivíduos (Farkas *et al.*, 2023). Os organismos tendem a adaptar-se a alterações no balanço energético, priorizando o investimento de energia para o desenvolvimento do SNC (Farkas *et al.*, 2023). Em contrapartida, o gasto de energia direcionado para o desenvolvimento dos segmentos corporais e ganho de peso corporal é reduzido (Kuzawa *et al.*, 2014). Nossos resultados apoiam estes constructos e demonstram que a intervenção com alta dose de riboflavina estimula a maturação sensorio-motora e somática (marcos de desenvolvimento do SNC em neonatos), mas reduz o crescimento murinométrico e o ganho de peso corporal.

Smart e Dobbing (1971) sugeriram o estudo dos eixos ântero-posterior e látero-lateral do crânio, do eixo longitudinal e do comprimento da cauda como parâmetros para analisar o crescimento em roedores. A literatura refere que a administração de doses elevadas de riboflavina estimula o crescimento somático em crianças com deficiência mitocondrial (Bugiani *et al.*, 2006). Além disso, a suplementação com riboflavina no período neonatal pode preservar as extremidades corporais (membros) e reduzir a mortalidade em roedores (Ogunleye; Odotuga, 1989). Crianças tratadas com riboflavina apresentaram uma normalização do perímetro cefálico após os danos

de uma lesão cerebral provocada pela privação de oxigênio (Lavrick *et al.*, 2016). Todavia, nossos resultados demonstram que adaptações metabólicas no início da vida podem direcionar o gasto energético para o desenvolvimento cerebral, reduzindo o investimento energético para o crescimento físico e ganho de peso corporal em neonatos (Silva-Araújo *et al.*, 2024b; dados em submissão).

O efeito da riboflavina no peso corporal não está totalmente esclarecido na literatura, mas os nossos resultados sugerem que os animais que receberam a dose mais elevada de riboflavina (100 mg/kg) tiveram um menor ganho de peso corporal com relação aos demais grupos. Na literatura, a energia investida no ganho de peso corporal foi inversamente associada àquela direcionada ao desenvolvimento cerebral (Kuzawa *et al.*, 2014). Em outros estudos, a suplementação com riboflavina foi associada à perda de peso (Debski *et al.*, 2006; Lewicka *et al.*, 2017), enquanto a sua deficiência relacionou-se ao ganho excessivo (Paterson *et al.*, 1990). Em um ensaio clínico com recém-nascidos pré-termo, a riboflavina foi suplementada a 0,34 mg/kg durante os primeiros 10 dias de vida, seguida de 0,53 mg/kg dos 11 aos 28 dias de idade (Porcelli *et al.*, 2000). A intervenção normalizou o ganho de peso entre os 11 e os 28 dias de idade, de acordo com o aumento da dose, mas registrou-se um ganho de peso excessivo nas crianças que não receberam a suplementação (Porcelli *et al.*, 2000). A atuação da riboflavina no balanço energético foi explorada em uma de nossas revisões sistemáticas, onde demonstramos o seu envolvimento com as mais diversas vias metabólicas, incluindo cascatas proteicas, gliconeogênese e oxidação de lipídios, que se associam à regulação do peso corporal (Silva-Araújo *et al.*, 2024a).

O presente estudo também avaliou parâmetros tardios relacionados ao desenvolvimento sensório-motor, dentre elas, parâmetros relacionados à locomoção. A aprendizagem da locomoção ocorre paralelamente e é influenciada pela maturação do sistema nervoso, que está integrado de forma complexa com todo o sistema musculoesquelético (Fragopoulou *et al.*, 2019; Westerga; Gramsbergen, 1993). A maneira na qual os animais se movimentam é o resultado de interações complexas entre elementos como nervos, músculos e tendões (Westerga; Gramsbergen, 1993). O tratamento com dose elevada de riboflavina otimizou os parâmetros de marcha, incluindo a diminuição do número de passos e do índice de cadência (um parâmetro equivalente ao número de passos percorridos por segundo). A redução desses indicadores está associada à redução do gasto energético durante a caminhada

(Teixeira *et al.*, 2008). O exercício físico, no geral, promove um estresse nas vias metabólicas que dependem da riboflavina, tiamina e vitamina B6 (Manoré *et al.*, 2000). As alterações metabólicas propiciadas pelo exercício, dentre elas, o aumento de enzimas mitocondriais e reparação de células e tecidos, podem modificar o gasto de energia e desempenho durante a atividade física (Manoré *et al.*, 2000). A restrição de riboflavina, tiamina e vitamina b6 comprometeu o desempenho físico em humanos, mediante à redução na potência aeróbica e no consumo de oxigênio (Van Der Beek *et al.*, 1994). Por outro lado, a suplementação com riboflavina associada a outros componentes do complexo B aumentou o desempenho locomotor, mas sem dados referentes ao gasto energético, em ratos submetidos à privação de oxigênio cerebral (Blaise *et al.*, 2009).

Em campo aberto, os ratos tratados com diferentes doses de riboflavina apresentaram um desempenho locomotor semelhante ao do grupo de controle, exceto no que se refere ao gasto energético médio (J), que foi reduzido/otimizado pela dose de 100 mg/kg de riboflavina. Logo, os animais tratados com a maior dose gastaram menos energia que os demais grupos para desempenhar uma atividade locomotora semelhante. Junto aos resultados de marcha locomotora, estes dados sugerem que a suplementação com doses elevadas de riboflavina durante o período neonatal melhora a eficiência metabólica durante a atividade física.

Uma de nossas explicações para os resultados discutidos acima baseia-se nas alterações metabólicas propiciadas pelo estímulo nutricional (tratamento com alta dose de riboflavina) durante o período neonatal. Em nosso artigo original, atualmente aceito para publicação, postulamos que a priorização do investimento energético para o desenvolvimento do SNC permanece após o tratamento com a vitamina B2 (Silva-Araújo *et al.*, 2024b; dados aceitos para publicação). Com isso, os animais tratados com riboflavina apresentavam parâmetros dinâmicos e estáticos da locomoção padronizados, melhor coordenação motora e equilíbrio, mas um gasto energético reduzido para a realização desses movimentos. Em contrapartida, quando a administração de riboflavina foi realizada em baixa concentração e associada a outros metabólitos e vitaminas, Vargiu *et al.* (2002) relataram resultados diferentes dos nossos, incluindo um aumento da velocidade máxima, do trabalho e da potência (parâmetros relacionados ao maior gasto energético durante o exercício).

Para além dos parâmetros acima descritos, um desempenho locomotor satisfatório requer fatores periféricos, como a estrutura anatômica e morfológica do sistema musculoesquelético (Miles; Sillar, 2011). A locomoção realizada pelos animais é organizada e resulta das conexões entre o sistema nervoso, o ambiente e o sistema musculoesquelético (Aoi; Funato, 2016). Os animais tratados com a dose mais elevada de riboflavina apresentaram um padrão de força muscular geral e relativa semelhante ao dos animais controle, embora o ganho de peso corporal tenha sido menor. Os resultados de força muscular juntamente à inalteração na ontogênese da preensão palmar confirmam a preservação da via cortico-espinal, não estimulada pelo tratamento. Além disso, foram observados pesos normalizados dos músculos sóleo e EDL entre os grupos experimentais. Estes resultados postulam que os efeitos da riboflavina no balanço energético não afetam a composição do tecido musculoesquelético, da força muscular e da via cortico-espinal. Por outro lado, um recente estudo referiu a perda de força muscular, associada à fadiga, em crianças com deficiência de riboflavina (Cornett *et al.*, 2018). A literatura explica que idosos que apresentam uma ingestão satisfatória de riboflavina possuem maior volume e força muscular (Borda *et al.*, 2024).

Nas barras paralelas, os parâmetros de coordenação motora e de equilíbrio foram melhorados em todos os animais tratados com riboflavina. Os animais tratados com 1 mg/kg e 10 mg/kg (R1 e R2) tiveram um tempo de movimento mais longo (segundos) e os animais tratados com 100 mg/kg tiveram menos erros de passo por segundo. Até o momento, não existem estudos que explorassem a relação entre a suplementação isolada de riboflavina e a coordenação motora. Em roedores, Sokolova *et al.* (2020) relataram efeitos positivos de tratamentos contendo 5 mg/kg de riboflavina associada a outros metabólitos (medicamento Citoflavina) na recuperação da coordenação motora e equilíbrio. Estudos em seres humanos que utilizaram este mesmo composto sugeriram uma rápida recuperação das funções sensório-motoras, incluindo visão, marcha e a coordenação, em indivíduos acometidos por lesões hipóxicas, dentre elas, o acidente vascular cerebral e a paralisia cerebral (Karakulova *et al.*, 2016; Odinak *et al.*, 2010; Rumiantseva *et al.*, 2010; Silva-Araújo *et al.*, 2023). A literatura também evidencia que a alta concentração de folato, uma outra vitamina que compõe o complexo B, pode auxiliar no desenvolvimento da coordenação motora fina em idosos (Chang *et al.*, 2009).

No nosso estudo, foram também medidos o peso dos tecidos recolhidos durante a eutanásia, mas não foram encontradas diferenças nos pesos dos órgãos entre os grupos experimentais. Contrariamente aos nossos resultados, a literatura refere que a suplementação com riboflavina em combinação com vitamina B6 e ácido fólico estimula a perda de peso nos pulmões, fígado e coração de roedores (Apryatin *et al.*, 2018), mas os efeitos da riboflavina isolada na densidade dos órgãos não são totalmente conhecidos.

A medição do peso dos tecidos permitiu igualmente calcular o índice hepatossomático, um indicador utilizado para avaliar o armazenamento de glicogênio no fígado (Enes *et al.*, 2008). Apesar do aumento observado, que pode sugerir atuação da riboflavina na composição hepática, o nosso estudo não realizou análises histológicas que confirmassem esta relação. No entanto, observamos que, apesar de reduzir o ganho de peso ponderal do corpo, o tratamento com alta dose de riboflavina preservou a densidade hepática e, por isso, ao relacionar o peso do fígado com o peso corporal, notou-se um aumento do índice hepatossomático. Por metabolizar lipídios, o fígado exerce funções importantes para a maturação do SNC, incluindo o fornecimento de altas quantidades de ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico no início da vida, ambos necessários para os intensos processos de mielinização (Innis, 1994).

9 CONCLUSÕES

A análise dos resultados apresentados acima permite as seguintes conclusões:

- O tratamento crônico com 100 mg/kg de riboflavina antecipa marcos de desenvolvimento sensório-motor e somático em ratos neonatos;
- A intervenção neonatal com 10 e 100 mg/kg de riboflavina promove um menor ganho de peso corporal em comparação aos animais controle;
- A maior dose de riboflavina (100 mg/kg) diminui parâmetros de gasto energético (cadência e steps) durante a marcha em CatWalk, e o gasto calórico (J) na atividade locomotora em campo aberto;
- Apesar de modificar o ganho de peso corporal, o tratamento neonatal com 100 mg/kg de riboflavina não modifica a força muscular, nem o peso do fígado ou dos músculos sóleo e EDL;
- Diferentes doses de riboflavina (1, 10 e 100 mg/kg) administradas durante período neonatal aumentam a coordenação motora e equilíbrio em fase jovem.

REFERÊNCIAS

- AGTE, V. V.; PAKNIKAR, K. M.; CHIPLONKAR, S. A. Effect of Riboflavin Supplementation on Zinc and Iron Absorption and Growth Performance in Mice. **Biological trace element research**, v. 65, n. 2, p. 109–115, nov. 1998.
- ALMLI, C. R.; FISHER, R. S. Infant Rats: Sensorimotor Ontogeny and Effects of Substantia Nigra Destruction. **Brain research bulletin**, v. 2, n. 6, p. 425–459, 1977.
- AOI, S.; FUNATO, T. Neuromusculoskeletal Models Based on the Muscle Synergy Hypothesis for the Investigation of Adaptive Motor Control in Locomotion via Sensory-Motor Coordination. **Neuroscience research**, v. 104, p. 88–95, mar. 2016.
- AOI, S.; OGIHARA, N.; FUNATO, T.; SUGIMOTO, Y.; TSUCHIYA, K. Evaluating Functional Roles of Phase Resetting in Generation of Adaptive Human Bipedal Walking with a Physiologically Based Model of the Spinal Pattern Generator. **Biological cybernetics**, v. 102, n. 5, p. 373–387, maio 2010.
- APRYATIN, S. A.; BEKETOVA, N. A.; VRZHESINSKAYA, O. A.; RIGER, N. A.; EVSTRATOVA, V. S.; TRUSOV, N. V.; SOTO, J. S.; MZHELKAYA, K. V.; SHUMAKOVA, A. A.; KODENTSOVA, V. M.; GMOSHINSKY, I. V. [Effect of B-vitamin deficiency on biochemical, immunologic markers and trace element status of rats and mice of various lines]. **Voprosy pitaniia**, v. 87, n. 4, p. 14–24, 2018.
- BANASIK, M. Comment on Gee and Moser (2008) “Acute postnatal exposure to brominated diphenylether 47 delays neuromotor ontogeny and alters motor activity in mice”. **Neurotoxicology and teratology**. United States. 2009.
- BARILE, M.; GIANCASPERO, T. A.; LEONE, P.; GALLUCCIO, M.; INDIVERI, C. Riboflavin Transport and Metabolism in Humans. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 39, n. 4, p. 545–557, jul. 2016.
- BEAUPORT, L.; SCHNEIDER, J.; FAOUZI, M.; HAGMANN, P.; HÜPPI, P. S.; TOLSA, J.-F.; TRUTTMANN, A. C.; FISCHER FUMEAUX, C. J. Impact of Early Nutritional Intake on Preterm Brain: A Magnetic Resonance Imaging Study. **The Journal of pediatrics**, v. 181, p. 29- 36.e1, fev. 2017.
- BERGMANN, R. L.; BERGMANN, K. E.; DUDENHAUSEN, J. W. Undernutrition and Growth Restriction in Pregnancy. **Nestle Nutrition workshop series. Paediatric programme**, v. 61, p. 103–121, 2008.
- BIEWENER, A. A. Locomotion as an Emergent Property of Muscle Contractile Dynamics. **The Journal of experimental biology**, v. 219, n. Pt 2, p. 285–294, jan. 2016.
- BLAISE, S. A.; NÉDÉLEC, E.; ALBERTO, J.-M.; SCHROEDER, H.; AUDONNET, S.; BOSSENMEYER-POURIÉ, C.; GUÉANT, J.-L.; DAVAL, J.-L. Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. **Experimental Neurology**, v. 216, n. 1, p. 231–238, 2009.
- BORDA, Miguel Germán et al. Nutrient Intake and Its Association with Appendicular

Total Lean Mass and Muscle Function and Strength in Older Adults: A Population-Based Study. **Nutrients**, v. 16, n. 4, p. 568, 2024.

BOURGONJE, A. R.; OTTEN, A. T.; SADAGHIAN SADABAD, M.; VON MARTELS, J. Z. H.; BULTHUIS, M. L. C.; FABER, K. N.; VAN GOOR, H.; DIJKSTRA, G.; HARMSEN, H. J. M. The effect of riboflavin supplementation on the systemic redox status in healthy volunteers: A post-hoc analysis of the RIBOGUT trial. **Free radical biology & medicine**, v. 190, p. 169–178, 2022.

BRONSING, R.; VAN DER BURG, J.; RUIGROK, T. J. H. Modulation of Cutaneous Reflexes in Hindlimb Muscles during Locomotion in the Freely Walking Rat: A Model for Studying Cerebellar Involvement in the Adaptive Control of Reflexes during Rhythmic Movements. **Progress in brain research**, v. 148, p. 243–257, 2005.

BUGIANI, M.; LAMANTEA, E.; INVERNIZZI, F.; MORONI, I.; BIZZI, A.; ZEVIANI, M.; UZIEL, G. Effects of Riboflavin in Children with Complex II Deficiency. **Brain & development**, v. 28, n. 9, p. 576–581, out. 2006.

CAPPELLINI, G.; SYLOS-LABINI, F.; DEWOLF, A. H.; SOLOPOVA, I. A.; MORELLI, D.; LACQUANITI, F.; IVANENKO, Y. Maturation of the Locomotor Circuitry in Children With Cerebral Palsy. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 998, 2020.

CASTRO, Josué de et al. Alimentação brasileira à luz da geografia humana. 1937.

CASTRO, Josué de. Geografia da fome: o dilema brasileiro. **Rio de Janeiro: O cruzeiro**, 1946.

CHANG, Namsoo et al. Folate nutrition is related to neuropsychological functions in the elderly. **Nutrition research and practice**, v. 3, n. 1, p. 43, 2009.

CHAVES NETO, A. H.; YANO, C. L.; PAREDES-GAMERO, E. J.; MACHADO, D.; JUSTO, G. Z.; PEPPELENBOSCH, M. P.; FERREIRA, C. V. Riboflavin and Photoproducts in MC3T3-E1 Differentiation. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 24, n. 7, p. 1911–1919, out. 2010.

CHAWLA, J.; KVARNBERG, D. **Hydrosoluble vitamins**. [s.l.: s.n.]v. 120891–914 p.

CHENG, G.; GAO, B.; VERBNEY, Y.; ZISKIND-CONHAIM, L. Ethanol Reduces Neuronal Excitability and Excitatory Synaptic Transmission in the Developing Rat Spinal Cord. **Brain research**, v. 845, n. 2, p. 224–231, out. 1999.

CORNETT, Kayla MD et al. Established and novel measures of upper limb impairment in children with Charcot-Marie-tooth disease type 1A and riboflavin transporter deficiency type 2. *Journal of the Peripheral Nervous System*, v. 23, n. 1, p. 29-35, 2018.

DARWIN'S, Charles. On the origin of species. **published on**, v. 24, p. 1, 1859.

DE NARDO, M. C.; PETRELLA, C.; DI CHIARA, M.; DI MARIO, C.; DELI, G.; TRAVAGLIA, E.; BALDINI, L.; RUSSO, A.; PARISI, P.; FIORE, M.; TERRIN, G. Early

nutritional intake influences the serum levels of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor in preterm newborns. **Frontiers in neurology**, v. 13, p. 988101, 2022.

DEBSKI, B.; BERTRANDT, J.; KLOS, A.; GRALAK, M. Influence of folic acid, vitamin B2 and B6 supplementation on feed intake, body and organs weight, and liver fatty acids composition in rats subjected to severe protein deprivation. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 9, n. 3, p. 185–190, 2006.

DEL CONT, Valdeir. Francis Galton: eugenia e hereditariedade. **Scientiae Studia**, v. 6, p. 201-218, 2008.

DEMERS, I.; MOFFET, H.; HÉBERT, L.; MALTAIS, D. B. Growth and Muscle Strength Development in Children with Developmental Coordination Disorder. **Developmental medicine and child neurology**, v. 62, n. 9, p. 1082–1088, set. 2020.

DOBBING, J.; SMART, J. L. Vulnerability of Developing Brain and Behaviour. **British medical bulletin**, v. 30, n. 2, p. 164–168, maio 1974.

DONNELLY, E. M.; QUACH, E. T.; HILLERY, T. M.; HEEKE, B. L.; SNYDER, B. R.; HANDY, C. R.; O'CONNOR, D. M.; BOULIS, N. M.; FEDERICI, T. Characterization of a Murine Model of SMA. **Neurobiology of disease**, v. 45, n. 3, p. 992–998, mar. 2012.

DUBOIS, J.; DEHAENE-LAMBERTZ, G.; KULIKOVA, S.; POUPON, C.; HÜPPI, P. S.; HERTZ-PANNIER, L. The Early Development of Brain White Matter: A Review of Imaging Studies in Fetuses, Newborns and Infants. **Neuroscience**, v. 276, p. 48–71, set. 2014.

ENES, P.; PANSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Hepatic Glucokinase and Glucose-6-Phosphatase Responses to Dietary Glucose and Starch in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*) Juveniles Reared at Two Temperatures. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 149, n. 1, p. 80–86, jan. 2008.

FERGUSON, Sherry A. et al. Behavioral effects of prenatal folate deficiency in mice. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 73, n. 4, p. 249-252, 2005.

FOX, W. M. Reflex-Ontogeny and Behavioural Development of the Mouse. **Animal behaviour**, v. 13, n. 2, p. 234–241, 1965.

FRAGOPOULOU, A. F.; QIAN, Y.; HEIJTZ, R. D.; FORSSBERG, H. Can Neonatal Systemic Inflammation and Hypoxia Yield a Cerebral Palsy-Like Phenotype in Periadolescent Mice? **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 10, p. 6883–6900, out. 2019.

GALTON, Francis. Hereditary talent and character. **Macmillan's magazine**, v. 12, n. 157-166, p. 318-327, 1865.

GALTON, Francis. Retrospect of work done at my anthropometric laboratory at South

Kensington. **The Journal of the Anthropological Institute of Great Britain and Ireland**, v. 21, p. 32-35, 1892.

GALTON, Francis. The comparative worth of different races. 1869.

GARCÍA ROBLES, Reggie; AYALA RAMÍREZ, Paola Andrea; PERDOMO VELÁSQUEZ, Sandra Paola. Epigenética: definição, bases moleculares e implicações para a saúde e evolução humana. **Revista Ciências da Saúde**, v. 10, não. 1 pág. 59-71, 2012.

GEISLER, H. C.; WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. Development of Posture in the Rat. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 53, n. 4, p. 517–523, 1993.

GEORGIEFF, M. K.; RAMEL, S. E.; CUSICK, S. E. Nutritional Influences on Brain Development. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 107, n. 8, p. 1310–1321, ago. 2018.

GIZA, C. C.; PRINS, M. L. Is Being Plastic Fantastic? Mechanisms of Altered Plasticity after Developmental Traumatic Brain Injury. **Developmental neuroscience**, v. 28, n. 4–5, p. 364–379, 2006.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the Past: Evolution, Development, and Patterns of Disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5691, p. 1733–1736, set. 2004.

GOUVEIA, Henrique JCB et al. Maternal exposure to busulfan reduces the cell number in the somatosensory cortex associated with delayed somatic and reflex maturation in neonatal rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 103, p. 101710, 2020.

HADDERS-ALGRA, M. Neural Substrate and Clinical Significance of General Movements: An Update. **Developmental medicine and child neurology**, v. 60, n. 1, p. 39–46, jan. 2018a.

HADDERS-ALGRA, M. Early Human Motor Development: From Variation to the Ability to Vary and Adapt. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 90, p. 411–427, jul. 2018b.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The Thrifty Phenotype Hypothesis. **British medical bulletin**, v. 60, p. 5–20, 2001.

HENRIQUES, B. J.; OLSEN, R. K.; BROSS, P.; GOMES, C. M. Emerging Roles for Riboflavin in Functional Rescue of Mitochondrial β -Oxidation Flavoenzymes. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 32, p. 3842–3854, 2010.

HEROLD, Sabine et al. CatWalk gait analysis in a rat model of multiple sclerosis. **BMC neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2016.

HIRANO, G.; IZUMI, H.; YASUNIWA, Y.; SHIMAJIRI, S.; KE-YONG, W.; SASAGIRI, Y.; KUSABA, H.; MATSUMOTO, K.; HASEGAWA, T.; AKIMOTO, M.; AKASHI, K.; KOHNO, K. Involvement of Riboflavin Kinase Expression in Cellular Sensitivity against Cisplatin. **International journal of oncology**, v. 38, n. 4, p. 893–902, abr.

2011.

JIN, C.; YONEZAWA, A.; YOSHIMATSU, H.; IMAI, S.; KOYANAGI, M.; YAMANISHI, K.; NAKAGAWA, S.; ITOHARA, K.; OMURA, T.; NAKAGAWA, T.; NAGAI, J.; MATSUBARA, K. Effect of riboflavin deficiency on development of the cerebral cortex in Slc52a3 knockout mice. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 18443, 2020.

JOSEPHSON, R. K. Dissecting Muscle Power Output. **The Journal of experimental biology**, v. 202, n. Pt 23, p. 3369–3375, dez. 1999.

KARAKULOVA, Y. V.; SELYANINA, N. V.; ZHELNIN, A. V.; FILIMONOVA, T. A.; CEPILOV, S. V. Effect of antioxidant therapy on neurotrophins and processes of rehabilitation after stroke. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova** 2016.

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

KHALKI, L.; BENNIS, M.; SOKAR, Z.; BA-M'HAMED, S. The Developmental Neurobehavioral Effects of Fenugreek Seeds on Prenatally Exposed Mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 672–677, jan. 2012.

KOMIYAMA, Tomoyoshi. Functional roles of spinal reflexes during human locomotor movements. **Brain and Nerve Shinkei Kenkyu no Shinpo**, v. 62, n. 11, p. 1129–1137, 2010.

LACERDA, D. C.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; FERRAZ-PEREIRA, K. N.; TOSCANO, A. E. Does L-Tryptophan Supplementation Reduce Chewing Deficits in an Experimental Model of Cerebral Palsy? **Nutritional neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 373–374, maio 2019.

LAVRICK, S. Y.; SHPRAKH, V. V.; DOMITRAK, S. V.; BORISOV, A. S. [Cytoflavin in the treatment of preschool and early school age children with the consequences of perinatal hypoxic brain damages]. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova**, v. 116, n. 10, p. 34–37, 2016.

LE GALL, A.; HILBER, P.; CHESNEAU, C.; BULLA, J.; TOULOUSE, J.; MACHADO, M. L.; PHILOXENE, B.; SMITH, P. F.; BESNARD, S. The critical role of vestibular graviception during cognitive-motor development. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 112040, 2019.

LEWICKA, A.; LEWICKI, S.; KŁOS, A.; DEBSKI, B.; KURYŁ, T.; BERTRANDT, J. Influence of protein deficient diet, vitamin B2 supplementation and physical training on serum composition of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in rats. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 2, p. 185–189, 2017.

LIENHART, W.-D.; GUDIPATI, V.; MACHEROUX, P. The Human Flavoproteome. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 535, n. 2, p. 150–162, jul. 2013.

LOPES DE SOUZA, Sandra et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1400-1408, 2008.

LÓPEZ-RAMOS, J. C.; DELGADO-GARCÍA, J. M. Role of the Motor Cortex in the Generation of Classically Conditioned Eyelid and Vibrissae Responses. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 16701, ago. 2021.

MADARSHAHIAN, S.; LETIZI, J.; LATASH, M. L. Synergic Control of a Single Muscle: The Example of Flexor Digitorum Superficialis. **The Journal of physiology**, v. 599, n. 4, p. 1261–1279, fev. 2021.

MANORE, Melinda M. Effect of physical activity on thiamine, riboflavin, and vitamin B-6 requirements. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 598S-606S, 2000.

MAYR, Ernst. **Evolution and the diversity of life: Selected essays**. Harvard University Press, 1997.

MENDEL, Gregor. Versuche uber pflanzen-hybriden. **Vorgelegt in den Sitzungen**, 1865.

MEYER, Otto A. et al. A method for the routine assessment of fore-and hindlimb grip strength of rats and mice. **Neurobehavioral toxicology**, v. 1, n. 3, p. 233-236, 1979.

MILES, G. B.; SILLAR, K. T. Neuromodulation of Vertebrate Locomotor Control Networks. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 26, n. 6, p. 393–411, dez. 2011.

MINASSIAN, K.; HOFSTOETTER, U. S.; DZELADINI, F.; GUERTIN, P. A.; IJSPEERT, A. The Human Central Pattern Generator for Locomotion: Does It Exist and Contribute to Walking? **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 23, n. 6, p. 649–663, dez. 2017.

MOSEGAARD, S.; DIPACE, G.; BROSS, P.; CARLSEN, J.; GREGERSEN, N.; OLSEN, R. K. J. Riboflavin Deficiency-Implications for General Human Health and Inborn Errors of Metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 11, maio 2020.

NUNES, Polliana Toledo et al. Thalamic proteome changes and behavioral impairments in thiamine-deficient rats. **Neuroscience**, v. 385, p. 181-197, 2018.

ODINAK, M. M.; SKVORTSOVA, V. I.; VOZNIUK, I. A.; RUMIANTSEVA, S. A.; STAKHOVSKAIA, L. V; KLOCHEVA, E. G.; NOVIKOVA, L. B.; IANISHEVSKIĬ, S. N.; GOLOKHVASTOV, S. I.; TSYGAN, N. V. Efficacy of cytoflavin in patients in the acute ischemic stroke. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova**, 2010.

OGUNLEYE, A. J.; ODUTUGA, A. A. The Effect of Riboflavin Deficiency on Cerebrum and Cerebellum of Developing Rat Brain. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 35, n. 3, p. 193–197, jun. 1989.

OROZCO-SÓLIS, Ricardo et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 3, p. 481-492, 2009.

PEREIRA, Sabrina da Conceicao et al. Fibroblast growth factor 19 as a countermeasure to muscle and locomotion dysfunctions in experimental cerebral

palsy. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 12, n. 6, p. 2122-2133, 2021.

PLAUT, G. W.; SMITH, C. M.; ALWORTH, W. L. Biosynthesis of Water-Soluble Vitamins. **Annual review of biochemistry**, v. 43, n. 0, p. 899–922, 1974.

PONTES, P. B.; TOSCANO, A. E.; LACERDA, D. C.; DA SILVA ARAÚJO, E. R.; COSTA, P. C. T. da; ALVES, S. M.; BRITO ALVES, J. L. de; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Effectiveness of Polyphenols on Perinatal Brain Damage: A Systematic Review of Preclinical Studies. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 12, jun. 2023.

POWERS, H. J. Riboflavin (Vitamin B-2) and Health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1352–1360, jun. 2003.

POWERS, H. J.; CORFE, B. M.; NAKANO, E. Riboflavin in Development and Cell Fate. **Sub-cellular biochemistry**, v. 56, p. 229–245, 2012.

QI, B.; KNIAZEVA, M.; HAN, M. A Vitamin-B2-Sensing Mechanism That Regulates Gut Protease Activity to Impact Animal's Food Behavior and Growth. **eLife**, v. 6, jun. 2017.

RICE, D.; BARONE, S. J. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental health perspectives**, v. 108 Suppl, n. Suppl 3, p. 511–533, jun. 2000.

RIZZO, Federica et al. Genome-wide RNA-seq of iPSC-derived motor neurons indicates selective cytoskeletal perturbation in Brown–Vialetto disease that is partially rescued by riboflavin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 46271, 2017.

ROBERTS, T. J. The Integrated Function of Muscles and Tendons during Locomotion. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 133, n. 4, p. 1087–1099, dez. 2002.

RUMIANTSEVA, S. A.; FEDIN, A. I.; BOLEVICH, S. B.; SILINA, E. V.; VASIL'EV, I. D.; MEN'SHOVA, N. I.; ILIUKHINA, O. A.; GOLUZOVA, I. N. Effect of early correction of energy and free-radical homeostasis on the clinical-morphological presentation of cerebral infarction. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni**, 2010.

SCHNEIDER, N.; GARCIA-RODENAS, C. L. Early Nutritional Interventions for Brain and Cognitive Development in Preterm Infants: A Review of the Literature. **Nutrients**, v. 9, n. 3, fev. 2017.

SCHURR, A.; RIGOR, B. M. Brain anaerobic lactate production: a suicide note or a survival kit? **Developmental neuroscience**, v. 20, n. 4–5, p. 348–357, 1998.

SEBAYANG, S. K.; DIBLEY, M. J.; KELLY, P.; SHANKAR, A. V; SHANKAR, A. H. Modifying effect of maternal nutritional status on the impact of maternal multiple micronutrient supplementation on birthweight in Indonesia. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 10, p. 1110–1117, 2011.

SHARMA, Pragati et al. Delayed myelination and neurodevelopment in male seizure-prone versus seizure-resistant rats. **Epilepsia**, v. 59, n. 4, p. 753-764, 2018.

SILVA-ARAÚJO, Eulália Rebeca da et al. Effects of riboflavin in the treatment of brain damage caused by oxygen deprivation: an integrative systematic review. **Nutritional Neuroscience**, p. 1-19, 2023.

SILVA-ARAÚJO, Eulália Rebeca da et al. Effects of deficiency or supplementation of riboflavin on energy balance: a systematic review with preclinical studies. **Nutrition Reviews**, 2024.

SOLOPOVA, Irina A. et al. Tapping into rhythm generation circuitry in humans during simulated weightlessness conditions. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 9, p. 14, 2015.

SUWANNASOM, N.; KAO, I.; PRUSS, A.; GEORGIEVA, R.; BÄUMLER, H. Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, jan. 2020.

SUZUKI, K. The Developing World of DOHaD. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 9, n. 3, p. 266–269, jun. 2018.

TEN, V.; GALKIN, A. Mechanism of mitochondrial complex I damage in brain ischemia/reperfusion injury. A hypothesis. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 100, p. 103408, 2019.

THOR, M.; STROHMER, B.; MANOONPONG, P. Locomotion Control With Frequency and Motor Pattern Adaptations. **Frontiers in neural circuits**, v. 15, p. 743888, 2021.

TORSVIK, I. K.; UELAND, P. M.; MARKESTAD, T.; MIDTTUN, Ø.; BJØRKE MONSEN, A.-L. Motor Development Related to Duration of Exclusive Breastfeeding, B Vitamin Status and B12 Supplementation in Infants with a Birth Weight between 2000-3000 g, Results from a Randomized Intervention Trial. **BMC pediatrics**, v. 15, p. 218, dez. 2015.

VAN DER BEEK, Eric J. et al. Thiamin, riboflavin and vitamin B6: impact of restricted intake on physical performance in man. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 13, n. 6, p. 629-640, 1994.

VERBRUGGEN, F.; BEST, M.; BOWDITCH, W. A.; STEVENS, T.; MCLAREN, I. P. L. The Inhibitory Control Reflex. **Neuropsychologia**, v. 65, p. 263–278, dez. 2014.

VISCO, D. B.; MANHÃES DE CASTRO, R.; DA SILVA, M. M.; COSTA DE SANTANA, B. J. R.; BEZERRA GOUVEIA, H. J. C.; DE MOURA FERRAZ, M. L. R.; DE ALBUQUERQUE, G. L.; LACERDA, D. C.; DE VASCONCELOS, D. A. A.; GUZMAN QUEVEDO, O.; TOSCANO, A. E. Neonatal kaempferol exposure attenuates gait and strength deficits and prevents altered muscle phenotype in a rat model of cerebral palsy. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, nov. 2022.

VOROSMARTI, A.; YAKTINE, A. L.; SCHNEEMAN, B. O. (ed.). **No Title**. [s.l.: s.n.]

WALLACE, Alfred Russel. Darwinism, an exponent of the theory of natural selection,

with some of its applications. **Macmillan and Company**, 1889.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative Adaptations, Speciation, and Phylogeny (A Review). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 5, p. 1388–1392, mar. 1986.

WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. Development of Locomotion in the Rat: The Significance of Early Movements. **Early human development**, v. 34, n. 1–2, p. 89–100, set. 1993.

WU, T.; LING, K.-Q.; SAYRE, L. M.; MCINTIRE, W. S. Inhibition of murine N 1-acetylated polyamine oxidase by an acetylenic amine and the allenic amine, MDL 72527. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 2, p. 483–490, 2005.

ZEHR, E. P.; KOMIYAMA, T.; STEIN, R. B. Cutaneous Reflexes during Human Gait: Electromyographic and Kinematic Responses to Electrical Stimulation. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, n. 6, p. 3311–3325, jun. 1997.

ZEHR, E. P.; STEIN, R. B. What Functions Do Reflexes Serve during Human Locomotion? **Progress in neurobiology**, v. 58, n. 2, p. 185–205, jun. 1999.

ZEHR, E. P.; STEIN, R. B.; KOMIYAMA, T. Function of Sural Nerve Reflexes during Human Walking. **The Journal of Physiology**, v. 507 (Pt 1), n. Pt 1, p. 305–314, fev. 1998.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 25 de abril de 2023

Ofício nº 35/23

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Raul Manhães de Castro

Departamento de Nutrição/CCS

Processo nº0014//2023

Certificamos que a proposta intitulada “**Nutrição e plasticidade fenotípica: eventuais efeitos do tratamento crônico com diferentes doses de riboflavina sobre o desenvolvimento somático e sensorio-motor em ratos neonato**”, Registrado com o nº 0014/2023 sob a responsabilidade de Prof. o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 25/04/2023

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Junho 2023 a janeiro 2024
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	34 Animais
Peso/Idade	220-250g/90-120 dias
Sexo	Macho (10) e Fêmea (24)
Origem: Biotério de Criação	Biotério de Criação do Departamento de Nutrição CCS/UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério de Criação do Departamento de Nutrição CCS/UFPE