



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

RITA DE CÁSSIA NORONHA MEDEIROS

**MECANISMOS MOLECULARES DA POLIOENCEFALOMALÁCIA INDUZIDA POR
PIRITIAMINA**

**ARAGUAÍNA - TO
2018**

RITA DE CÁSSIA NORONHA MEDEIROS

MECANISMOS MOLECULARES DA POLIOENCEFALOMALÁCIA INDUZIDA POR
PIRITIAMINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova.

ARAGUAÍNA - TO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M488m Medeiros, Rita de Cássia Noronha.
Mecanismo moleculares da poliencefalomalácia induzida por piritiamina. / Rita de Cássia Noronha Medeiros. – Araguaína, TO, 2018.
75 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2018.

Orientador: Fabiano Mendes Cordova

1. Saúde Pública. 2. Deficiência de tiamina. 3. Piritiamina. 4. Doenças neurodegenerativas. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RITA DE CÁSSIA NORONHA MEDEIROS

MECANISMOS MOLECULARES DA POLIOENCEFALOMALÁCIA INDUZIDA POR
PIRITIAMINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública, e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova.

Data da Aprovação 09 / 03 / 2018

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova - Orientador, UFT.



Prof.ª Dr.ª Helcileia Dias Santos - Examinadora, UFT.



Prof.ª Dr.ª Clarissa Amorim Silva de Cordova - Examinadora, UFT.

Dedico este trabalho a minha mãe, D. Domingas, minha grande amiga. Exemplo de força e determinação. Minha eterna gratidão por todo apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus pela oportunidade de realizar este mestrado e por colocar pessoas boas no caminho que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabiano Mendes de Córdova, pela oportunidade, confiança e incentivo. Por me ensinar e orientar com paciência e simplicidade. Muito orgulho de ter sido sua mestrande. Muito obrigada!!!

Agradeço à Prof. Dr^a. Elda Dias, responsável por apresentar o mestrado e ter incentivado a fazer a seleção. Obrigada pelo apoio e acolhida e por ter acreditado em mim.

À minha mãe por sempre me mostrar a importância dos estudos e do trabalho e pela forte amizade que temos. Minha grande incentivadora.

À tia Lúcia pelo apoio quando estive que ficar longe de casa, minha irmã Mariana pela torcida.

À Marina, por sempre estar comigo em todos os momentos, sejam bons ou ruins, por enfrentar comigo este desafio sempre me apoiando. Obrigada por tudo!

À Simone e Gardênia pelo incentivo a fazer este mestrado e ao Edilson pela disponibilidade em sempre me ajudar. Obrigada!!

Agradeço à Gabi, Juliani, Laiza, Gil, Vanessa pelas experiências compartilhadas, apoio e amizade.

À Leidiani (*in memoriam*), obrigada pelos sonhos compartilhados e pelas longas conversas e por ter tornado os meus dias em Araguaína mais leves e felizes.

À D. Rita pelo acolhimento, alegria e por todas as conversas compartilhadas.

À coordenadora de enfermagem da UTI do HGCC, Enf^a Silvana Feitosa por liberar os dias suficientes para que eu possa viajar e, assim, concluir o mestrado.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt) pela contribuição na minha formação durante o programa.

Aos bolsistas da iniciação científica pelo estudo, trabalho, apoio no laboratório de patologia.

Ao CNPq pelo apoio na realização deste projeto.

Ninguém vence sozinho!

Obrigada a todos!

RESUMO

A deficiência de tiamina resulta em disfunções bioquímicas e metabólicas que afetam várias regiões do encéfalo, originando prejuízos cognitivos e motores. A tiamina, vitamina B1, é um nutriente essencial para o tecido nervoso. Quando fosforilada, origina diferentes formas, como a tiamina pirofosfato, que atua como cofator de enzimas chaves no metabolismo energético celular. Beribéri, encefalopatia de Wernicke (EW) e síndrome de Wernicke-Korsacoff (SWK) são as principais doenças da deficiência em humanos. As lesões iniciais da EW são hemorragias na substância cinzenta ao redor do terceiro e quarto ventrículos e do aqueduto de Sylvius. As regiões do sistema nervoso central (SNC) envolvidas na poliencefalomalácia (PEM) são variadas e contraditórias, mas são afetadas desde áreas corticais até regiões profundas como mesencéfalo e tálamo. Nestes locais, tipicamente há degeneração e necrose neuronal, com envolvimento adjacente de alterações astrocitárias e inflamatórias. Pouco ainda se conhece sobre os mecanismos moleculares e celulares da degeneração e morte dos neurônios, entretanto, considera-se que o processo relacionado à deficiência de tiamina se inicia por defeitos metabólicos na mitocôndria, com consequente estabelecimento de estresse oxidativo. Neste trabalho objetivou-se determinar diferentes parâmetros relacionados à deficiência de tiamina no SNC em um modelo *in vivo*, com intuito de avaliar a associação de lesões e alterações comportamentais nos animais-modelo e o delineamento de estratégias neuroprotetoras eficientes. O modelo de deficiência dietética em associação com injeções do antagonista de tiamina, piritiamina, foi utilizado no estudo. Os animais foram tratados por 9 dias, divididos em 6 grupos de tratamento: controle (Cont), piritiamina (Ptd), piritiamina e trolox (Ptd+Tr), piritiamina e dimetilsulfóxido (Ptd+Dms), Trolox (Tr) e Dimetilsulfóxido (Dms). Os camundongos submetidos ao modelo de deficiência de tiamina (grupo Ptd) exibiram redução significativa no ganho de peso corporal e ingestão de ração, após 9 dias de tratamento. Os animais deficientes de tiamina apresentaram alterações comportamentais como redução na coordenação motora e atividade exploratória. Trolox e Dms atenuaram estes efeitos. No grupo Ptd ocorreu queda de viabilidade celular em áreas importantes, como o córtex cerebral, hipocampo e tálamo. Porém, à histopatologia, foram observadas lesões no tálamo e tronco encefálico, como hemorragia, vacuolização astrocitária e espongiose. Nos grupos Ptd+Tr e Ptd+Dms houve atenuação acentuada destas lesões. Nas avaliações de *western blot*, o grupo Ptd apresentou aumento na fosforilação de p38^{MAPK} no córtex cerebral e tálamo. O grupo Ptd+Tr bloqueou totalmente este efeito em ambas as estruturas encefálicas. E o grupo (Ptd+Dms) reduziu o aumento de fosforilação de p38^{MAPK}, porém, de forma menos intensa que o Trolox. Houve aumento na expressão de HO-1 no grupo Ptd, já no grupo Ptd+Tr e Ptd+Dms não ocorreu alteração a indução de aumento da expressão HO-1. Estes dados sugerem que no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina os animais desenvolvem alterações neurológicas e metabólicas, possivelmente associadas ao estresse oxidativo e inflamação.

Palavras-chave: Vitamina B1. Neurodegeneração. Neuroproteção. Comportamento. Estresse oxidativo. Inflamação.

ABSTRACT

Thiamine deficiency results in biochemical and metabolic dysfunctions that affect various regions of the brain, originating cognitive and motor impairments. Thiamin, vitamin B1, is an essential nutrient for nerve tissue. When phosphorylated, it gives rise to different forms, such as thiamine pyrophosphate, which acts as a key enzyme cofactor in cellular energy metabolism. Beriberi, Wernicke encephalopathy (EW) and Wernicke-Korsacoff syndrome (SWK) are the major deficiency diseases in humans. The initial lesions of EW are bleeding into the gray matter around the third and fourth ventricles and the Sylvius aqueduct. Central nervous system (CNS) regions involved in polyencephalomalacia (PEM) are varied and contradictory, but are affected from cortical areas to deep regions such as the midbrain and thalamus. At these sites, there is typically degeneration and neuronal necrosis, with adjacent involvement of astrocytic and inflammatory changes. Little is known about the molecular and cellular mechanisms of degeneration and death of neurons, however, it is considered that the process related to thiamine deficiency is initiated by metabolic defects in the mitochondria, with consequent establishment of oxidative stress. In this work we aimed to determine different parameters related to thiamine deficiency in the CNS in an in vivo model, in order to evaluate the association of lesions and behavioral changes in the model animals and the design of efficient neuroprotective strategies. The dietary deficiency model in combination with thiamine antagonist injections, pyriamine, was used in the study. The animals were treated for 9 days, divided into 6 treatment groups: control (Cont), pyriamine (Ptd), pyriamine and trolox (Ptd + Tr), pyritiamine and dimethylsulfoxide (Ptd + DmsO), Trolox (Tr) and Dimethylsulfoxide (DmsO). Mice subjected to the thiamine deficiency model (Ptd group) exhibited a significant reduction in body weight gain and feed intake after 9 days of treatment. Thiamine deficient animals presented behavioral alterations such as reduction in motor coordination and exploratory activity. Trolox and DmsO attenuated these effects. In the Ptd group there was a decrease in cell viability in important areas, such as cerebral cortex, hippocampus and thalamus. However, histopathology showed lesions in the thalamus and brain stem, such as hemorrhage, astrocytic vacuolization and spongiosis. In the groups Ptd + Trt and Ptd + DmsO there was a marked attenuation of these lesions. In the western blot evaluations, the Ptd group showed increased phosphorylation of p38MAPK in the cerebral cortex and thalamus. The Ptd + Tr group totally blocked this effect in both encephalic structures. And the group (Ptd + DmsO) reduced the increase in p38MAPK phosphorylation, but less intensely than Trolox. There was an increase in the expression of HO-1 in the Ptd group, already in the Ptd + Trt and Ptd + DmsO groups. No change occurred in the induction of increase in HO-1 expression. These data suggest that in the thiamine deficiency model with pyriamine, animals develop neurological and metabolic changes, possibly associated with oxidative stress and inflammation.

Keywords: Vitamin B1. Neurodegeneration. Neuroprotection. Behavior. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Teste do rotarod para avaliação de coordenação motora de camundongos submetidos ao modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.....	27
Figura 2 -	Teste do campo aberto dos camundongos submetidos ao modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.....	29
Figura 3 -	Avaliação da viabilidade celular em fatias encefálicas de camundongos deficientes em tiamina com piritiamina, através do método colorimétrico de redução do TTC.....	31
Figura 4 -	Teste do rotarod realizado nos camundongos tratados por 8 dias no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.....	35
Figura 5 -	Efeitos comportamentais em campo aberto nos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina tratados por 8 dias.....	36
Figura 6 -	Viabilidade celular no encéfalo de camundongos deficientes em tiamina com piritiamina.....	37
Figura 7 -	Histopatologia do tálamo de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.....	39
Figura 8 -	Histopatologia do tronco encefálico de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.....	42
Figura 9 -	Histopatologia do tálamo e tronco encefálico de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.....	44
Figura 10 -	Histopatologia do encéfalo de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.....	47
Figura 11 -	Histopatologia de vísceras de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.....	48
Figura 12 -	Efeitos da deficiência de tiamina com piritiamina na fosforilação de p38 ^{mapk}	50
Figura 13 -	Efeitos da deficiência de tiamina com piritiamina na fosforilação de p38 ^{MAPK}	53
Quadro 1 -	Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos do modelo de deficiência de tiamina com piritiamina, com duração de 9 dias.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ganho de peso corporal dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com pirritiamina.....	33
Tabela 2 -	Consumo de ração dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com pirritiamina.....	34

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BVR	Biliverdina redutase
CAT	Ácido tricarboxílico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
DT	Deficiência de tiamina
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EPM	Erro padrão por média
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
EW	Encefalopatia de Wernicke
HO-1	Heme oxigenase 1
HSP	Proteína do choque térmico
KGDHC	α -cetogluturato desidrogenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MKK	Quinase da proteína quinase ativada por mitógeno
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
p38 ^{MAPK}	Proteína quinase ativada por mitógeno de 38 kDa
RPM	Rotações por minuto
SAPK	Proteína ativada por estresse
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNC	Sistema nervoso central
SWK	Síndrome de Wernicke-Korssacoff
TDP	Tiamina difosfato
TMP	Tiamina monofosfato
TPP	Tiamina pirofosfato
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
TTC	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
TTP	Tiamina trifosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Objetivos	11
1.1.1 Objetivo geral	12
1.1.2 Objetivos específicos	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Bioquímica e fisiologia da tiamina e sua deficiência	13
2.2 Doenças causadas por deficiência de tiamina em humanos	15
2.2.1 Beribéri	15
2.2.2 Síndrome de Wernicke-Korsakoff	18
2.3 Disfunções neuroquímicas na deficiência de tiamina	19
2.4 Substâncias com ação antioxidante e anti-inflamatória	21
2.5 Modelos animais de deficiência em tiamina	23
3 MÉTODOS	25
3.1 Animais	25
3.2 Tratamentos <i>in vivo</i> - modelo de deficiência de tiamina	25
3.3 Análise comportamental	26
3.4 Coleta de amostra e análise histopatológica	29
3.5 Determinação da viabilidade celular	29
3.6 Procedimento das amostras e <i>Western Blot</i>	30
3.7 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Ganho de peso	32
4.2 Consumo de ração	32
4.3 Análise comportamental	33
4.4 Viabilidade celular	35
4.5 Histopatologia	37
4.6 <i>Western Blot</i>	43
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A deficiência de tiamina (DT) causa problemas neurológicos importantes, sendo responsável por induzir lesões em áreas específicas do encéfalo. A redução desta vitamina no organismo pode interferir em numerosos mecanismos celulares, desencadeando neurodegeneração e prejudicando funções cerebrais (MARTIN; SINGLETON; HILLER-STURMHOFEL, 2003).

A vitamina B1 é um nutriente essencial encontrado em altas concentrações em músculos, órgãos e tecido cerebral. É um importante cofator das enzimas piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, envolvidas no metabolismo de carboidratos e da transcetolase, enzima importante da via das pentoses (BETTENDORFF; WINS, 2013).

A tiamina encontra-se em várias formas: tiamina livre não fosforilada, tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato (TDP), tiamina pirofosfato (TPP) e tiamina trifosfato (TTP). Essas formam um conjunto de coenzimas que constituem parte do sistema de metabolismo da tiamina (MAKARCHIKOV et al., 2003).

Uma vez que os níveis de tiamina são diminuídos no encéfalo, as atividades dessas enzimas são afetadas, levando a alterações na atividade mitocondrial e gerando disfunções metabólicas (THOMSON; GUERRINI; MARSHALL, 2012). A TPP, forma ativa da tiamina, é um cofator necessário em duas vias do metabolismo de carboidratos, que são a via das pentoses e o ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico) (RESENDE, 2012). Com a ausência de TPP ocorre a diminuição de adenosina trifosfato (ATP). O ciclo de Krebs é uma via metabólica que completa a degradação oxidativa da glicose, dos ácidos graxos e dos aminoácidos. Este ciclo ocorre nas mitocôndrias das células que utilizam oxigênio e, quando ocorre disfunção na produção de energia pelas mitocôndrias, é gerado estresse oxidativo (RESENDE, 2012).

A mitocôndria é uma fonte importante de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e também um alvo de DT (FISCHER; MAIER, 2015) O tecido nervoso é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao alto consumo de oxigênio e à alta produção de EROs. Esta disfunção desempenha um papel importante na excitotoxicidade, causando danos axonais e morte neuronal (LIU; KE; LUO, 2016).

Estudos relatam que a depleção de tiamina no encéfalo causa doenças neurológicas envolvidas com o envelhecimento. A DT afeta os circuitos glutamatérgicos e gabaérgicos do sistema nervoso central (SNC), que estão relacionados com vários aspectos comportamentais. A neurodegeneração ocorre principalmente no tálamo e corpos mamilares, progredindo em uma linha de tempo bem estabelecida (LANGLAIS et al., 1992; SAVAGE et al., 2012).

A DT causa disfunções nos processos de liberação de neurotransmissores (BUENO, 2015). Os mecanismos pelos quais a privação de tiamina provoca neurodegeneração são múltiplos. A morte neuronal pode estar relacionada ao estresse oxidativo gerado por danos mitocondriais (PARK et al., 2000) ou por altas taxas de metabolismo oxidativo (PANNUNZIO et al., 2000). Outro possível mecanismo envolve a redução da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase, que culmina com aumento na concentração do glutamato extracelular e induz a excitotoxicidade (HAZELL et al., 1993).

O glutamato é o principal aminoácido envolvido em respostas sinápticas excitatórias no sistema nervoso central (SNC), pois na fenda pode se ligar aos receptores ionotrópicos, levando a um aumento nos níveis intracelulares de cálcio que pode ser captado pelas mitocôndrias, resultando em mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial e geração de EROs e estresse oxidativo (ROTH, 2009).

Adicionalmente, a excitotoxicidade glutamatérgica e o estresse oxidativo também podem ativar várias vias de sinalização intracelular, incluindo as vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (GRANT et al. 2001; ZHANG et al. 2006; ZEPEDA et al. 2008; CHEN et al. 2009; RAO et al, 2010).

Considerando que as proteínas cinases e seus alvos podem participar tanto de respostas citoprotetoras como de respostas relacionadas à morte celular (CHU et al., 2004; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2006; NAGAI et al., 2007; RAIVICH; BEHRENS, 2006; DELIVORIA-PAPADOPOULOS; ASHRAF; MISHRA, 2007) as implicações referentes à possível modulação e caracterização do envolvimento das vias de sinalização, como as MAPKs e seus alvos durante a deficiência de tiamina no SNC, não são conhecidas e necessitam ser investigadas.

Heme oxigenase - 1 consiste em uma enzima envolvida na resposta ao estresse oxidativo através da conversão do grupamento heme em pigmentos

biliares, biliverdina e bilirrubina, nos quais exercem função antioxidante (BELLAVÉR, 2015).

Apesar de vários estudos demonstrarem as diversas funções das vias de sinalização intracelular, são extremamente escassos os trabalhos que relacionam a participação destas vias na neurodegeneração induzida pela deficiência de tiamina. associada ao desencadeamento de apoptose neuronal seletiva na deficiência da vitamina (WANG, 2000).

As principais doenças causadas pela falta desta vitamina em humanos são beribéri, encefalopatia de Wernicke (EW) e a síndrome de Wernicke-Korssacoff (SWK). A doença beribéri está normalmente associada à população que têm como principal componente da dieta a mandioca, o arroz polido ou moído, e/ou a farinha de trigo, ou seja, alimentos pobres em tiamina. As manifestações clínicas iniciais são anorexia, desconforto abdominal, edema, irritabilidade e parestesias. Alcoólatras, grupo de risco para a EW, apresentam inibição da absorção da tiamina no organismo (BRASIL, 2012).

O consumo crônico de álcool e o estado nutricional gravemente prejudicado são consideradas as principais causas de EW (MARTIN et al., 2003). Nesse último caso, quando há perda irreversível de memória e psicose confabulatória associadas, a doença é conhecida como SWK (SECHI; SERRA, 2007).

Os sintomas da EW têm sido associados a uma tríade clássica, que incluem ataxia (perda do movimento muscular coordenado), nistagmo (movimento involuntário dos olhos) ou oftalmoplegia (paralisia dos movimentos dos olhos) e confusão mental (THOMSON et al., 2008).

A lesão polioencefalomalácia (necrose da substância cinzenta do encéfalo) termo utilizado para determinar a ocorrência de necrose em qualquer área do encéfalo onde há substância cinzenta (corpos neuronais) como, por exemplo, córtex cerebral, hipocampo, corpo estriado, globo pálido, cerebelo, núcleos do tronco e núcleos talâmicos (LEMOS et al., 2006).

O tratamento da DT é baseado na administração (oral, intramuscular e intravenosa) da vitamina, sendo capaz de prevenir, reduzir ou reverter sintomas em pacientes com beribéri e EW. O tratamento diário com comprimido é de 300 mg ou mais e não ocorre riscos de toxicidade relacionados ao tratamento com tiamina, sendo o excesso excretado pela urina (BRASIL, 2012).

Dada a importância da tiamina no SNC e os problemas ocasionados pela deficiência, têm-se buscado novas estratégias terapêuticas que, juntamente com a terapia padrão com tiamina, objetivam reduzir o surgimento de danos neurológicos permanentes (ABDOU; HAZELL, 2015).

Portanto, percebe-se, através de estudos apresentados, que a deficiência de tiamina é um fator de preocupação na saúde pública, determinados pelas condições de vida e trabalho, causados por uma alimentação inadequada, carência nutricional de vitamina B1, ocorrendo aparecimento de sintomas e distúrbios neurológicos, que podem levar conseqüentemente a morte.

Assim, devido ao fato das lesões neurológicas na deficiência de tiamina serem controversas ao desconhecimento dos mecanismos moleculares de morte celular envolvidos no processo. A abordagem terapêutica eficiente proporciona uma melhor intervenção para prevenir ou diminuir o desenvolvimento de grandes lesões no Sistema Nervoso Central (SNC).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi determinar diferentes parâmetros morfológicos, moleculares, comportamentais e metabólicos em camundongos experimentalmente submetidos à DT com piritiamina, com intuito de avaliar a ocorrência de alterações celulares e o delineamento de estratégias neuroprotetoras eficientes, a fim de determinar protocolos terapêuticos futuros.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil metabólico sistêmico dos animais submetidos ao modelo experimental de DT com piritiamina, através da avaliação do consumo de ração e ganho de peso corporal;
- b) Caracterizar as alterações comportamentais motoras e cognitivas nos camundongos submetidos à DT induzida por piritiamina;
- c) Identificar e quantificar, dentro do modelo *in vivo* de DT com piritiamina, as áreas encefálicas afetadas através do método de viabilidade celular da redução do TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio), utilizando fatias encefálicas dos camundongos tratados;
- d) Determinar as lesões histológicas em vísceras e no SNC dos animais, e as áreas encefálicas específicas afetadas pela DT com piritiamina;
- e) Determinar possíveis alterações em termos de estresse oxidativo, pela avaliação da expressão de heme-oxigenase 1 como biomarcador, e a modulação das vias de sinalização das MAPKs, em áreas encefálicas de camundongos em resposta à DT induzida por piritiamina;
- f) Caracterizar a possível ação neuroprotetora do agente antioxidante Trolox e do anti-inflamatório DMSO, nos animais com DT induzida por piritiamina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioquímica e fisiologia da tiamina e sua deficiência

A tiamina é uma vitamina essencial, conhecida também como vitamina B1, serve para manter a integridade das células nervosas (ABDOU; HAZELL, 2015). Esta vitamina é um cofator de enzimas do metabolismo de carboidratos, em particular transcetolase, α -cetoglutarato desidrogenase e piruvato desidrogenase, que desempenham um papel essencial na conversão de piruvato em acetil-CoA durante a glicólise (DERVAUX, 2016). É uma molécula crucial, indiretamente envolvida em vários passos metabólicos da cadeia de transporte de elétrons, contribuindo para a extração de energia de fontes de carboidratos, onde atua como coenzima na conversão de glicose em adenosina trifosfato (ATP), molécula que armazena energia proveniente da respiração celular, e na catalisação da conversão de vários esqueletos de carbono no ciclo de Krebs (MANZETTI; ZHANG; DAVID, 2014).

A vitamina B1 foi descoberta, pela primeira vez, por dois químicos holandeses, Jansen e Donath em 1926, e foi isolada, purificada e sintetizada por Robert R. Williams em 1936 (WOOLEY, 2008). É um micronutriente essencial para os seres humanos (PACAL et al., 2014), encontrada em carnes, vísceras, ovos, peixe, germe de trigo, grão integrais, legumes e nozes (BRASIL, 2012).

A tiamina é hidrossolúvel, o fosfato de tiamina é hidrolisado por fosfatases intestinais, absorvida por difusão e transporte ativo no jejuno-íleo e é fosforilada na parede intestinal em TPP, forma ativa e cofator de importantes complexos enzimáticos. Segundo Suzuki et al. (2017), a concentração de tiamina no sangue é coordenada principalmente pela absorção do intestino delgado, eliminação urinária e reabsorção. Aproximadamente 53% da tiamina é excretada através da urina.

O fígado e a maioria dos outros órgãos absorvem tanto a tiamina como o TMP, e são capazes de fosforilar essas formas para di e trifosfato (BENDER, 2003). Assim, esta molécula é essencial para o metabolismo completo da glicose e sua privação nutricional retarda o fluxo através do ciclo do ácido tricarbóxico, diminuindo a entrada de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (NELSON; COX; LEHNINGE, 2005).

O cofator pirofosfato de tiamina (TPP), forma da tiamina biologicamente ativa, é constituído pela coenzima difosfato de tiamina em combinação com o fósforo, que

serve como cofator para quatro complexos enzimáticos: complexo de piruvato desidrogenase, um conjunto enzimático organizado que conecta a glicólise com o ciclo do ácido tricarboxílico (CAT); complexo da α -cetoglutarato desidrogenase (KGDHC), imunocomponente do complexo imune associado ao ciclo TCA e transcetolase, participante chave na derivação de fosfato de pentose envolvida em biossíntese de ácido nucleico e lipídios (ALSTRUP; SCHIOTT, 2008).

Substâncias com atividade anti-tiamina podem estar presentes em folhas fermentadas e extratos de folhas de chá, nozes de certos tipos de árvores, peixe cru, mariscos e café (cafeinado e descafeinado) (BENDER, 2003). Estas substâncias contêm a enzima tiaminase, que degrada a tiamina.

Com a depleção corporal da tiamina pode ocorrer disfunção metabólica, gerando estresse oxidativo, neuroinflamação, redução da neurogênese, interferência na permeabilidade da barreira hematoencefálica, acidose metabólica e alterações na integridade funcional dos astrócitos (BLACKMORE; QUELLET, 2014; HAZELL; TOOD, 1998). A DT pode resultar em diferentes síndromes: beribéri, encefalopatia de Wernicke (EW) e Síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK) (SAÚDE, 2012).

A falta desta vitamina resulta em lesões cerebrais, sendo a lesão neurológica irreversível no beribéri. Quando ocorre degeneração mielínica os sintomas podem regredir com o tratamento, mas geralmente retornam algum tempo depois, pois a administração de tiamina não cura a lesão já estabelecida, apenas evita que ocorra mais desmielinização. Outras consequências são a vasodilatação periférica, edemas e insuficiência cardíaca (BRASIL, 2012).

O órgão mais afetado na DT é o encéfalo, onde a função metabólica da tiamina é como cofator de enzimas envolvidas no metabolismo de glicose (BÂ, 2008) e síntese de neurotransmissores (MULHOLLAND, 2006). Esta coenzima influencia por várias vias bioquímicas no SNC, desempenhando um papel essencial no metabolismo intermediário de carboidratos, metabolismo lipídico e neurotransmissão (MANZO et al., 1994).

Diversas alterações bioquímicas ocorrem na célula devido à DT. Inicialmente, é observada diminuição da atividade de α -cetoglutarato desidrogenase (α -KGDH) em astrócitos, após cerca de 4 dias, resultando em edema citotóxico e aumento de volume celular (HAZELL et al. 2003), Após 7-10 dias, há baixa atividade da transcetolase, com diminuição difusa no uso de glicose e consequente comprometimento de funções relacionadas aos astrócitos, como o controle da

concentrações extracelulares de glutamato, manutenção de gradientes iônicos através da membrana celular e da permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE) (HAZELL et al., 1998). Além disso, há aumento da produção de óxido nítrico (NO), devido à disfunção das células endoteliais, levando ao desenvolvimento de edema vasogênico e disfunção da BHE (SECHI; SERRA, 2007).

A tiamina é considerada um composto essencial na homeostase das células e o SNC é altamente sensível à DT. O conhecimento sobre o metabolismo desta vitamina e das consequências de sua falta são essenciais para compreender a regulação e os processos que envolvem a interação da coenzima, os distúrbios comportamentais e neurodegenerativos na DT.

2.2 Doenças causadas por deficiência de tiamina em humanos

As complicações ocasionadas pela DT geram distúrbios severos e irreversíveis no SNC, como o beribéri e a síndrome de Wernicke-Korsakoff. Além disso, sugere-se que a falta de tiamina também está relacionada ao Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica, porém, os fatores associados a estas doenças ainda não são claros.

2.2.1 Beribéri

O termo *beribéri* provém da expressão “eu não posso, eu não posso”, do cingalês, língua originária da Índia. Trata-se de uma doença causada pela DT que, apesar de facilmente tratável, pode levar a óbito (BARRETO; BARRETO, 2016).

Nos países do oriente, o beribéri é conhecido desde antes de Cristo. O primeiro relato científico foi feito por Bontius (1592-1631), que descreveu casos observados no sudeste asiático. Era uma doença comum em muitas partes do sudeste da Ásia no século XVIII, causando elevada taxa de mortalidade e permanecendo como um importante problema de saúde naquela região, até a década de 1930 (BRASIL, 2012). Somente no século XX, graças à emergente ciência da nutrição, descobriu-se que se tratava de uma hipovitaminose (MAGALHÃES, 2014).

A busca da etiologia do beribéri levou à identificação e ao estudo das vitaminas. Portanto, esta doença não foi apenas uma causa de enorme sofrimento

humano e morte, mas também uma das doenças mais importantes para o desenvolvimento da ciência (MEAD, 1995).

Segundo Magalhães (2014), no Brasil, os primeiros que relataram sobre os casos de beribéri foram pesquisadores baianos, muito antes da descoberta científica da tiamina. As primeiras referências datam do final do século XVIII, por Alexandre Rodrigues Ferreira, naturalista baiano que relatou casos de acometidos por “intensa fraqueza, perturbações circulatórias, edemas e polineurite” na região amazônica (BRASIL, 2012).

Em 1994, foi registrado um surto de beribéri com três óbitos e dezenas de casos, entre cortadores de cana no município de Presidente Figueiredo, no estado do Amazonas, que foi totalmente erradicado com a reposição de tiamina (BARRETO; BARRETO, 2016).

Em 2006, foram notificados casos recentes no Maranhão, em Tocantins e em Roraima, com hipóteses diagnósticas iniciais de doença de etiologia desconhecida, intoxicação por agrotóxicos ou por bebida alcoólica e síndrome de Guillain-Barré (BARRETO; BARRETO, 2016).

Em janeiro de 2008, no estado de Roraima, ocorreu um surto de beribéri em homens de 20 a 60 anos, residentes em 20 comunidades ameríndias no município de Uiramutã (CERRONI et al., 2010). A DT foi causada nesta população de índios devido ao esforço físico, elevado consumo de carboidratos e álcool (BARRETO; BARRETO, 2016).

Em nível mundial, o beribéri não é mais uma doença largamente difundida na população. Apenas focos isolados têm sido observados nos últimos 20 anos, entre refugiados e comunidades restritas (BRASIL, 2012). Os surtos de beribéri associam-se às condições de pobreza e fome, relacionando-se às situações graves de insegurança alimentar e nutricional, alcoolismo e alimentação monótona baseada em arroz polido.

Pessoas com sobrepeso ou obesidade também podem apresentar esta doença (BRASIL, 2012). Uma revisão de dados representativos da literatura, indica que mais de 90% são casos relatados de cirurgia bariátrica em pacientes do sexo feminino. A maioria dos pacientes desenvolve beribéri em um período de 4 a 12 semanas após a cirurgia bariátrica (STROH; MEYER; MANGER, 2014). A maioria dos pacientes desenvolve DT nos três primeiros meses de pós-operatório, causada por hiperêmese.

Os pacientes com cirurgia bariátrica devem ser basicamente tratados com suplementos de vitamina B para evitar complicações (STROH; MEYER; MANGER, 2014). Um diagnóstico tardio ou ausente pode levar a danos irreversíveis do SNC, com resultados fatais. O conhecimento sobre o assunto, incluindo o desenvolvimento da DT, sintomatologia e tratamento de emergência, pode ser considerado essencial para o prognóstico (STROH; MEYER; MANGER, 2014).

. O organismo humano não consegue manter reservas duradouras e, se não houver ingestão diária, sua saturação tecidual tem duração máxima 2 a 3 meses (BARRETO; BARRETO, 2016).

O beribéri está relacionado às situações que aumentam a demanda metabólica de tiamina ou que interferem em sua biodisponibilidade (BRASIL, 2012)..

A deficiência grave resulta em lesões neurológicas, irreversíveis no beribéri. Quando ocorre degeneração mielínica os sintomas podem regredir com o tratamento, mas geralmente retornam algum tempo depois, pois a administração de tiamina não cura a lesão já estabelecida, apenas evita que ocorra progressão (SAÚDE, 2012).

Outra consequência da DT é a vasodilatação periférica, com aumento nos *shunts* arteriovenosos e alteração significativa da microcirculação (CERRONI, 2008). No beribéri, estudos de condução nervosa mostram geralmente neuropatia axonal predominantemente sensorial (FAIGLE; MOHME; LEVY, 2012). Os sintomas motores são principalmente latentes e podem ser agravados pela miopatia associada à DT. A neuropatia aguda do beribéri é similar à síndrome de Guillain-Barré e deve ser considerada como risco de DT (RIahi et al, 2017).

O diagnóstico de beribéri é clínico e o tratamento é feito com reposição de tiamina. Entretanto, a resposta clínica ao tratamento empírico com tiamina é usada para confirmar o diagnóstico. Após o tratamento com a vitamina, observa-se melhora rápida do quadro clínico (BRASIL, 2012).

Beribéri é uma doença que apresenta graves problemas à saúde pública e exige maior vigilância aos órgãos públicos responsáveis. Conforme Leonzo (2012), o retorno do beribéri expõe a miséria cotidiana principalmente dos trabalhadores brasileiros esquecidos em longínquos espaços do território nacional. São a ela vulneráveis, igualmente, gestantes, crianças, alcoólatras e pessoas que exercem atividades extenuantes. A importância da contínua vigilância dos órgãos públicos torna-se decisiva para sua prevenção e tratamento.

O Ministério da Saúde (2012) afirma que o beribéri é um importante problema de saúde pública, determinado pelas condições de vida e trabalho. Contudo, esclarece que a doença não pode ser combatida apenas com políticas de saúde, mas necessita-se de políticas sociais.

2.2.2 Síndrome de Wernicke-Korsakoff

Pela primeira vez, em 1881, foi descrita uma doença de início súbito, caracterizada por paralisia dos movimentos oculares, marcha atáxica e confusão mental. Esta descrição foi feita por Carl Wernicke, que observou esses sintomas em três pacientes, dois alcoolistas e uma paciente com vômitos persistentes após ingestão de ácido sulfúrico, que se apresentaram com estupor progressivo, evoluindo para o coma e morte (ZUBARAN, 1996).

As alterações patológicas descritas por Wernicke foram hemorragias na substância cinzenta ao redor do terceiro e quarto ventrículos e do aqueduto de Sylvius, quando denominou a doença de “polioencephalitis hemorrhagica superioris” (WERNICKE, 1981).

A doença de Wernicke é uma emergência neuropsiquiátrica aguda, devido à DT. Ocorre principalmente em pacientes dependentes de álcool desnutridos ou como consequência de desnutrição por outras causas (LATT; DORE, 2014). A doença tem sido historicamente associada a uma tríade clássica de sintomas neurológicos agudos: confusão, ataxia e oftalmoplegia (SULLIVAN; FAMA, 2012).

A EW quando não cuidada, evolui para SWK, que é caracterizada por um transtorno comportamental patológico, observado em pessoas desnutridas e alcoolistas crônicos. Os pacientes apresentam uma variedade de danos neuropsicológicos, que vão desde pequenos comprometimentos na memória, passando por moderados déficits cognitivos, até a completa demência (RESENDE, 2012).

O Ministério da Saúde (2012) descreve que a encefalopatia de Wernicke envolve o sistema nervoso central e se manifesta frequentemente por confusão mental, desorientação, oftalmoplegia (paralisia dos músculos oculares), nistagmo (oscilação rítmica dos globos oculares), diplopia (visão dupla), ataxia (insegurança nos movimentos de mãos e pés). Pode ocorrer paralisia do nervo causando estrabismo convergente.

Os sintomas que comprometem o aprendizado e a memória são manifestações da doença de Wernicke, e são apropriadamente designados de SWK (BUTTERWORTH; KRIL; HARPER, 1993). A SWK é um distúrbio neuropsiquiátrico que se caracteriza por amnésia anterógrada densa e perda de memória a curto prazo, associada à confabulação compensatória, com preservação relativa da memória de longo prazo e outras habilidades cognitivas (KERNS; ARUNDEL; CHAWLA, 2015). Ocorre disfunção do lobo frontal e distúrbios afetivos (SULLIVAN; FAMA, 2012).

A SWK caracteriza-se por lesões da base do cérebro, hipotálamo, tálamo e corpos mamilares, com proliferação glial, dilatação capilar e hemorragia perivascular.

Os mecanismos da neurodegeneração ainda não são claros. O estresse oxidativo é considerado um elemento significativo da fisiopatologia, ligada à produção de EROs, peroxidação lipídica, falha energética celular, acidose láctica e excitotoxicidade (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

Portanto faz-se necessário um intenso estudo sobre o papel do estresse oxidativo nestas alterações e as disfunções neurológicas causadas pela DT.

2.3 Disfunções neuroquímicas na deficiência de tiamina

A depleção de tiamina interfere em mecanismos celulares, resultando em alterações que levam à neurodegeneração e disfunções do SNC (MKRTCHYAN et al., 2016). Alterações funcionais nos sistemas de neurotransmissão e lesões morfológicas geralmente antecedem a morte neuronal produzida pela DT (LANGLAIS; ZHANG, 1997; GIBSON; ZHANG, 2002; TODD; BUTTERWORTH, 1999). A tiamina desempenha outras funções específicas em algumas regiões do SNC e, a diminuição, mesmo que parcial dessa vitamina, desencadeia alterações que antecedem a morte celular causada pela queda de ATP, molécula indispensável para as células (MKRTCHYAN et al., 2016).

A falta de tiamina ocasiona estresse oxidativo e perda neuronal específica em determinadas regiões do encéfalo de animais e humanos (MKRTCHYAN et al., 2016). Algumas regiões encefálicas estão fortemente interligadas, e os achados comportamentais sugerem que o hipocampo, os núcleos talâmicos anteriores e os corpos mamilares dependem um do outro para a aquisição de algumas tarefas espaciais (AGGLETON, 2008).

Trabalhos demonstram que a DT pode causar perturbações nos circuitos colinérgico (PIRES et al. 2001; 2005; VETRENO et al., 2008; ROLAND et al., 2010), serotoninérgico (NAKAGAWASAI et al., 2007; VIGIL et al., 2010), dopaminérgico, noradrenérgico, glutamatérgico (TODD; BUTTERWORTH, 1998; SAVAGE et al., 1999; KAWAKAMI et al., 2010) e gabaérgico (BUTTERWORTH et al., 1979; BUTTERWORTH, 1989; ROLAND; SAVAGE, 2009). A redução na atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase pode levar a um aumento na concentração do glutamato extracelular e induzir a morte neuronal por um mecanismo de excitotoxicidade (HAZELL et al., 1993). Neurônios colinérgicos são particularmente sensíveis à excitotoxicidade do glutamato. Os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico foram implicados no processo fisiopatológico da SWK. As disfunções neuroquímicas resultam à perda de memória (NARDONE et al., 2013).

De acordo com Salinska e Stafiej (2003), o glutamato é o principal neurotransmissor envolvido em respostas sinápticas excitatórias no sistema nervoso central, distribuído de maneira ampla e uniforme, participando de vários processos fisiológicos como neurogênese, migração celular, plasticidade neuronal e processos de aprendizado e memória.

O glutamato desempenha um papel significativo no desenvolvimento de lesões na DT. A excitotoxicidade glutamatérgica é considerada o principal mecanismo de morte celular na DT, associada à amnésia diencefálica (HAZELL et al., 1993). Na DT, ocorre excitotoxicidade mediada pelo glutamato, disfunção mitocondrial com alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo no tálamo, corpos mamilares e estruturas do diencefalo (TODD; BUTTERWORTH, 1999).

Na via $p38^{MAPK}$, espécies reativas de oxigênio ativam membros da subfamília MKK3 ou MKK6, que são altamente específicos para $p38^{MAPK}$. MKK6 fosforila todas as isoformas de p38 ($p38\alpha$, $p38\beta$, $p38\delta$ e $p38\gamma$), enquanto que MKK3 é seletiva para as isoformas $p38\alpha$, $p38\delta$ e $p38\gamma$. MKK3/6 transmitem esse sinal à p38 que é translocada do citoplasma para o núcleo, ativando fatores de transcrição que controlam a expressão de enzimas envolvidas em rotas antioxidantes, na proliferação, diferenciação, inflamação e apoptose (SON et al, 2013).

O envolvimento do glutamato na doença de Parkinson (DP) é destacado devido aos efeitos benéficos em relação aos bloqueadores do receptor de glutamato

ou drogas que aumentam a captação do aminoácido, no qual têm efeitos positivos em modelos experimental de DP (VALLI;SOBRINHO, 2014).

Os astrócitos são sensíveis à DT e são responsáveis em regular a ação do glutamato (SUZUKI et al., 2017). Estudos em modelos experimentais de DT demonstram acidose láctica, anormalidades em processos oxidativos, edema cerebral, perda seletiva de neurônios, hemorragia, excitotoxicidade mediada pelo glutamato e disfunção astrocitária nas regiões vulneráveis do encéfalo (SUZUKI et al., 2017). Alterações no metabolismo de tiamina levam à neurodegeneração e determinam o estresse oxidativo. Elevação nos níveis de indicadores de estresse oxidativo, como aumentos da expressão de heme oxigenase-1 e da molécula de adesão celular intracelular-1, foi demonstrada no encéfalo de ratos com DT (GIBSON; ZHANG, 2002).

O sistema heme oxigenase/biliverdina redutase (HO/ BVR) é um dos primeiros a apresentar regulação positiva no estresse oxidativo, funcionando como neuroprotetor (AMANO, 2011).

As proteínas do choque térmico protegem células e tecidos dos efeitos deletérios da inflamação, o que ocorreria através da prevenção da quebra de cadeias de DNA induzida por EROS e peroxidação lipídica, bem como através de proteção da estrutura e função das mitocôndrias (MEYER; SILVA, 1999).

Os efeitos neuroinflamatórios também são cruciais para o aumento de EROs e ocorrem comumente dentro de áreas de neurodegeneração, causando perdas neuronais e lesões endoteliais (SARKAR et al., 2016).

O entendimento dos mecanismos moleculares associados à DT é fundamental para desenvolver terapias eficientes, particularmente em doenças neurodegenerativas.

2.4 Substâncias com ação antioxidante e anti-inflamatória

A DT resulta em processos patológicos neurológicos com profundas consequências. Substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias podem ter potencial para ser usadas como adjuvantes na terapia da DT, com a finalidade de amenizar os efeitos deletérios neurodegenerativos, como possíveis estratégias de neuroproteção.

Antioxidantes agem como protetores celulares, que impedem a formação e/ou as ações de EROs. Espécies reativas de oxigênio são continuamente geradas em

condições fisiológicas. Baixas concentrações de EROs podem ser benéficas, ou até mesmo indispensáveis, em processos como a sinalização intracelular e defesas contra microrganismos. No entanto, quando as defesas antioxidantes naturais do organismo são dominadas por uma produção excessiva de EROs, em uma situação de "estresse oxidativo", macromoléculas celulares e extracelulares (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) podem sofrer danos oxidativos, resultando em lesão tecidual (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SERKEDJIEVA, 2010). O radical hidroxila (OH^-) é o produto mais reativo de ERO, formado por sucessivas reações no metabolismo celular. É o principal responsável pelos efeitos citotóxicos observados em organismos aeróbios (YANG et al., 2001).

O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) é um potente antioxidante hidrossolúvel sintético, análogo à vitamina E (KIM et al., 2002; WU et al., 1991). O mecanismo de ação do Trolox é semelhante ao da vitamina E, ou seja, envolve a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI; ABUJA, 1999). Estudos demonstram que o Trolox reduz radicais livres, atuando de forma eficiente sobre EROs (WU et al., 1990; SAGACH et al., 2002; WANG et al., 2002).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é uma substância orgânica de fórmula química $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$, com um domínio altamente polar e dois grupos apolares, tornando-se solúvel tanto em meio aquoso quanto orgânico (ROSENBAUM; HERSCHLER; JACOB, 1965). DMSO é um composto conhecido desde a segunda metade do século XIX como um solvente orgânico potente. Em 1980 foram descobertas suas propriedades anti-inflamatória e citoprotetora (BLYTHE et al., 1986; BRAYTON, 1986). Tornou-se um dos agentes farmacológicos mais estudados, porém, um dos menos compreendidos, pois possui versatilidade de mecanismos de ação (JACOB; HERSCHLER, 1983).

O DMSO é mais eficaz na inflamação aguda. Atua na cascata do ácido araquidônico (STONE, 1993) e sobre o fator de agregação plaquetária (BRAYTON, 1986). Além disso, possui eficácia na remoção de radicais livres produzidos por neutrófilos, envolvidos na evolução do distúrbio circulatório que precede a necrose (BLYTHE et al., 1986). DMSO também tem propriedade diurética, com potencial ação em reverter alterações neurológicas em casos de pressão intracraniana decorrentes de traumatismos cranianos. (BLYTHE et al., 1986). O DMSO é indicado para remoção de radicais livres envolvidos na lesão de reperfusão (STONE, 1993).

2.5 Modelos animais de deficiência em tiamina

O uso de modelos animais de DT possibilita o estudo da neurodegeneração em diferentes regiões do encéfalo e as alterações cognitivas associadas (RESENDE, 2012). Sistemas como o encéfalo do rato, por exemplo, são modelos úteis para o entendimento dos princípios e fundamentos básicos dessa interação (RIBEIRO; PEREIRA, 1998). Os roedores de laboratório proporcionam uma pesquisa experimental profunda, nos aspectos anatômicos, fisiológicos, neuroquímicos e moleculares.

Os roedores com DT apresentam diversas alterações, como: alopecia, hipersensibilidade a estímulos, perda do tônus muscular, ataxia, perda do apetite, perda do reflexo de endireitamento e convulsões, podendo evoluir para a morte caso o processo não seja revertido rapidamente (MOUSSEAU et al., 1996; CICCIA; LANGLAIS, 2000).

A associação de uma dieta DT com injeções de piritiamina (um análogo químico da tiamina, com atividade antagonista funcional) acelera o aparecimento dos sinais neurológicos (WITT, 1985; VETRENO et al., 2012). Neurodegeneração ocorre principalmente no tálamo e corpos mamilares, progredindo em uma linha de tempo bem estabelecida (LANGLAIS et al., 1992, SAVAGE et al., 2012). Este modelo reproduz as lesões cerebrais e os déficits comportamentais encontrados nos indivíduos com a SWK (WITT, 1985; VETRENO et al., 2011). Após o episódio de DT, roedores apresentam déficits motores e cognitivos, incluindo déficits na aprendizagem e memória espacial.

As alterações neuropatológicas induzidas por piritiamina são idênticas às que foram descritas e provocadas pelo glutamato, gerando lesões excitotóxicas (ZHANG et al., 1995). Excitotoxicidade e, possivelmente apoptose, são mecanismos que podem mediar a degeneração neuronal em modelos de DT, com indução por piritiamina (NARDONE et al., 2013). Estudos em modelos de DT em roedores demonstram que estas alterações podem ser associadas com estresse oxidativo (VETRENO et al., 2012). Há produção prejudicada de glutathiona com acúmulo de peróxido de hidrogênio, desenvolvimento de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, com danos neuronais (FERNANDES et al., 2017).

O bem estabelecido modelo com piritiamina em roedores, tem sido usado para obter informações sobre as regiões do encéfalo envolvidas na SWK, críticas no

estabelecimento de amnésia (ANZALONE et al., 2010). Os modelos experimentais de DT são úteis não só para estudar os mecanismos da EW, mas também para a compreensão dos processos neurodegenerativos associados às doenças do envelhecimento (SCHWAB et al., 1996; GIBSON; ZHANG, 2001; PARK et al., 2001).

No modelo de DT com dieta deficiente, os animais são alimentados com ração deficiente em tiamina, que pode ser manipulada no próprio laboratório, ou adquirida de empresas especializadas. Neste tratamento, os animais demonstram indução de sinais neurológicos associados à DT após várias semanas, como: redução no comportamento de auto limpeza (*grooming*), seguido por ataxia, perda do reflexo de endireitamento e convulsão (TRONCOSO et al., 1981; WITT, 1985). Entretanto, somente nove dias em dieta DT são necessários para reduzir neurogênese hipocampal nos roedores (ZHAO et al., 2008).

Além disso, depois de 14 dias, há evidência de redução no número de neurônios colinérgicos no prosencéfalo (ZHAO et al., 2008) e, após 30 dias, os níveis de acetilcolinesterase e fibras colinérgicas estão reduzidos no córtex e hipocampo (PIRES et al., 2007; NAKAGAWASAI et al., 2007). Nesse período, déficits de memória espacial são observados (PIRES et al., 2007). Entretanto, o uso do modelo dietético de DT associado a injeções de piritiamina, abrevia o tempo de surgimento das alterações para 7-10 dias, com subsequente estabelecimento de estado comatoso após 11-14 dias e morte, entre 14-16 dias (NARDONE et al., 2013, VETRENO et al., 2012).

3 MÉTODOS

3.1 Animais

No modelo para estudo da DT foram utilizados camundongos Swiss machos com idade pós-natal de 50 dias. Os animais foram produzidos em biotério próprio no Laboratório de Patologia Experimental da UFT, e mantidos, manipulados e eutanasiados, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFT (CEUA-UFT, processo nº 23101.000284/2014-13).

3.2 Tratamentos *in vivo* - modelo de deficiência de tiamina

Foi utilizado um modelo de deficiência dietética de tiamina em conjunto com injeções intraperitoneais (i.p) do antagonista de tiamina, piritiamina. No modelo experimental, os animais foram divididos em seis grupos e submetidos a diferentes tratamentos (Quadro 1), durante nove dias. Dentre os grupos, três eram grupos controle, que receberam solução salina (NaCl 0,9%) ou substâncias neuroprotetoras (Trolox e dimetilsulfóxido) e três eram grupos deficientes, que receberam piritiamina seguida ou não de substâncias neuroprotetoras.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos do modelo de deficiência de tiamina com piritiamina, com duração de 9 dias.

GRUPO EXPERIMENTAL	TRATAMENTO
Grupo 1 – Controle (Cont)	Solução salina
Grupo 2 – Deficiente (Ptd)	Piritiamina
Grupo 3 – Deficiente com Trolox (Ptd+Tr)	Piritiamina, associada ao Trolox
Grupo 4 – Deficiente com DMSO(Ptd+Dmso)	Piritiamina, associada ao dimetilsulfóxido
Grupo 5 – Controle Trolox (Tr)	Trolox
Grupo 6 – Controle DMSO (Dmso)	Dimetilsulfóxido

Os grupos 1, 5 e 6 receberam ao longo de todo o tratamento ração padrão AIN-93M (PRAG Soluções Biociências, SP, Brasil), segundo o *American Institute of Nutrition* (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Esta formulação foi proposta com o

intuito de padronizar dietas-testes para facilitar a interpretação de resultados e garantir a reprodutibilidade destes e tem sido amplamente utilizada em estudos com roedores. Os grupos 2, 3 e 4 receberam ração deficiente em tiamina AIN-93DT (PRAG Soluções Biociências, SP, Brasil) durante o período de tratamento. Os constituintes da dieta DT eram idênticos aos da dieta padrão, exceto a falta da vitamina.

Os grupos receberam água e ração *ad libitum* e, diariamente, injeções intraperitoneais (i.p.) de solução salina (NaCl 0,9%; controles, Grupo 1), pirritiamina (deficientes, 5 mg/kg; Grupos 2, 3 e 4; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e/ou os neuroprotetores Trolox (1 mg/kg; Grupos 3 e 5; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) ou DMSO (1 ml/kg em solução 10% em salina; Grupos 4 e 6; Amresco, OH, EUA). Os volumes injetados foram ajustados para 0,1 ml/10g de peso corporal (CALINGASAN et al., 1996; CORDOVA et al., 2012).

Durante os tratamentos, foram controlados diariamente o ganho de peso e o consumo de ração.

3.3 Análise comportamental

Para as avaliações de comportamento, os animais foram testados em campo aberto e no rotarod, para investigar os efeitos dos tratamentos de DT e/ou substâncias neuroprotetoras (Trolox e DMSO) nos comportamentos motor e cognitivo dos animais.

Os testes comportamentais foram realizados no 8º dia de tratamento, devido ao rápido desenvolvimento de distúrbios neurológicos nos animais, observados em períodos subsequentes (depressão acentuada e imobilidade, decúbito lateral, opistótono e convulsão). Os animais foram habituados à sala de ensaio durante uma hora antes de iniciar os testes comportamentais, durante a fase clara do ciclo circadiano (10h00-17h00).

O teste do rotarod, que teve por objetivo avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a coordenação motora e equilíbrio dos animais, consistiu em duas etapas: condicionamento (treino) e teste (JIANG et al., 2004; CORDOVA et al., 2012). Primeiramente, os animais foram condicionados no aparelho de Rotarod (Insight Equipamentos, SP, Brasil) sobre o cilindro estacionário durante 30 segundos, seguido por um período de 90 s no cilindro com rotação fixa em 5 RPM (rotação por

minuto). Os animais que falharam nesta primeira etapa, foram submetidos à no máximo duas sessões adicionais de condicionamento. A falha na terceira sessão foi critério de exclusão para as sessões de teste. Trinta minutos após a última sessão de condicionamento, os animais foram testados no rotarod, e o tempo de latência para queda foi gravado para determinar o grau de coordenação motora. O teste consistiu de duas sessões diárias com duração máxima de 5 min, intervalos de 30 min entre as duas sessões, iniciando à velocidade de 5 RPM e com aumento de 0,1 RPM/s (Figura 1). Os resultados obtidos são expressos em segundos \pm E.P.M.(Erro Padrão da Média)



Figura 1 - Teste do rotarod para avaliação de coordenação motora de camundongos submetidos ao modelo de deficiência de tiamina com piritiamina. Fonte: acervo do autor, 2017.

O campo aberto foi desenvolvido para o estudo comportamental de ratos e consiste em expor o animal a um novo ambiente, observando parâmetros como os movimentos locomotores, que são os deslocamentos entre um ponto a outro da arena, os movimentos de exploração (ou não locomotores) que são aqueles que o animal pode realizar sem a necessidade de deslocamento, como por exemplo atividade de levantamento e autolimpeza. Em experimentos com roedores, estes

comportamentos são essenciais para avaliar efeitos psicoestimulantes, ansiedade e depressão (PRUT; BELZUNG, 2003).

Os testes de campo aberto foram realizados em arena circular de 300 mm de diâmetro, com base acrílica branca dividida em 12 quadrantes e parede cilíndrica de acrílico transparente (Bonther, SP, Brasil). Os testes tiveram duração de 10 min e foram avaliados os seguintes parâmetros: distância percorrida (número de quadrantes ultrapassados com os quatro membros), número de bolos fecais, número de levantamentos (*rearing*; levantamentos completos dos dois membros anteriores) e número de movimentos de limpeza (*grooming*) (AGUIAR et al., 2009; CORDOVA et al., 2012). Os ensaios de campo aberto foram realizados em duas etapas. A primeira etapa (dia zero) foi realizada no primeiro dia de tratamento dos animais e, a segunda realizada no 8º dia de tratamento (dia 8) (Figura 2). O desempenho dos animais foi registrado em vídeo, para posterior análise dos parâmetros. Os resultados obtidos são expressos em porcentagem das aferições do dia 8 em relação ao dia zero (considerado 100%) \pm E.P.M.



Figura 2 - Teste do campo aberto dos camundongos submetidos ao modelo de deficiência de tiamina com piritiamina. Fonte: acervo do autor, 2017.

3.4 Coleta de amostra e análise histopatológica

Realizados os tratamentos, no 9º dia as vísceras (fígado, rim, pulmão e coração) e os encéfalos dos camundongos foram coletados para avaliação histopatológica. As amostras foram obtidas durante exame pós-mortal dos animais e acondicionadas em frascos contendo formol tamponado a 10%. Após uma semana de fixação, as amostras foram encaminhadas para processamento histológico. Os tecidos foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol e embebidos em parafina, seguindo-se microtomia (espessura de 5 µm) e coloração por hematoxilina e eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada através de microscópio óptico trinocular Biotika B20T, acoplado a uma câmera digital ISH500 CMOS-5.0 colorida (Tucsen Photonics, Fujian, China). As imagens foram projetadas em monitor e capturadas pelo software ISCapture® v.3.6.7. (Tucsen Photonics, Fujian, China) em objetiva de 40x. As lesões encontradas foram classificadas quanto às localizações anatômicas e número de animais acometidos (em porcentagem).

3.5 Determinação da viabilidade celular

Foi utilizado o teste colorimétrico de redução do 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) para o estudo de viabilidade celular. O TTC entra na cadeia respiratória mitocondrial no lugar do oxigênio, é reduzido a um pigmento insolúvel (formazan vermelho) por desidrogenases mitocondriais e assim, a quantidade de pigmento formado é diretamente proporcional à atividade metabólica celular, evidenciando a integridade funcional e estrutural da célula (AMUTHA et al., 2007; SHELINE; WEI, 2006). Assim, porções vivas de tecidos ou mesmo células individuais adquirem coloração avermelhada. A finalidade deste método é determinar uma possível interferência da DT na viabilidade celular, focando a mitocôndria.

Para os ensaios, as fatias foram preparadas conforme Cordova et al. (2004). Os encéfalos dos camundongos tratados foram retirados a 4 °C e fatiados na espessura de 500 µm, utilizando-se matriz de corte para encéfalos de camundongos.

Posteriormente, as fatias foram pré-incubadas em tampão HEPES-salina (124 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO₄, 25 mM de HEPES, 12 mM de glicose e 1 mM de CaCl₂, pH 7.4) em temperatura ambiente por 30 min e em seguida, incubadas por 30 min no mesmo tampão com TTC 1% a 37 °C (GAO et al., 2008).

Após a incubação, o tampão foi removido e as fatias lavadas com solução salina (NaCl 0,9%) e em seguida fixadas em solução de paraformaldeído a 4%. As fatias foram escaneadas utilizando a impressora multiprofissional HP Deskjet 3050 e a viabilidade celular foi determinada pela mensuração da densidade óptica (D.O) do cromógeno produzido nas estruturas de interesse – córtex cerebral, corpo estriado, tálamo e hipocampo – através do programa Image J (*National Institute of Health*, MD, EUA) (Figura 3). Os dados são expressos em porcentagens em relação ao controle (considerado 100%) e os valores são expressos como média \pm E.P.M.

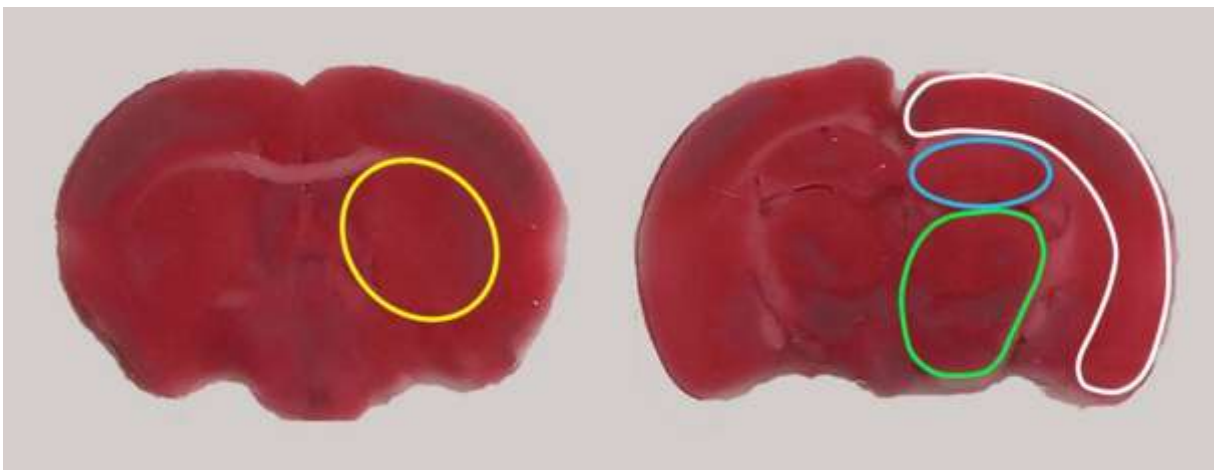


Figura 3. Avaliação da viabilidade celular em fatias encefálicas de camundongos deficientes em tiamina com pirritiamina, através do método colorimétrico de redução do TTC. As áreas encefálicas de interesse foram delimitadas e avaliadas pela D.O. do cromógeno vermelho produzido. Foram analisados o corpo estriado (linha amarela), tálamo (linha verde), hipocampo (linha azul) e córtex cerebral (linha branca). Fonte: acervo do autor, 2017.

3.6 Processamento das amostras e *Western Blot*

As estruturas de interesse (primariamente córtex cerebral e tálamo) foram homogeneizadas ao final dos tratamentos, conforme descrito por Cordova et al. (2012). Para o preparo dos homogenatos as estruturas foram homogeneizadas em Tampão de Amostra (200 mM de Tris, 40 mM de EDTA, 4% de SDS, pH 6,8) em relação p/v de 0,25 g tecido/ml. O homogenato foi fervido por 5 min. E, sobre essa solução de amostra, foi adicionado Tampão de Diluição na proporção de 1:4 (40% glicerol, 50 mM de Tris e azul de bromofenol) e β -mercaptoetanol na concentração final de 5% (v/v). As proteínas totais das amostras foram dosadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977).

As amostras foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para nitrocelulose em sistema *wet* e as formas totais e fosforiladas de p38^{MAPK} e a expressão de HO-1 identificadas através do uso de anticorpos específicos (CORDOVA et al., 2004, 2012). A revelação dos *immunoblottings* foi realizada através de método com cromógeno (3,3'-diaminobenzidina; DAB) (CORDOVA et al., 2011) e a densitometria das bandas determinada com o uso do programa Image J® (National Institutes of Health, EUA). Os níveis de fosforilação de p38^{MAPK} foram obtidos pela relação das densidades ópticas das formas fosforilada/total (POSSER et al., 2007; CORDOVA et al., 2012). Os resultados da fosforilação de p38^{MAPK} e da expressão de HO-1 são expressos em porcentagem em relação ao controle (considerado 100%) e os valores são expressos como média \pm E.P.M.

3.7 Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm E.P.M. e a significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado (CORDOVA et al., 2012). Os resultados são considerados significativos quando $p \leq 0,05$ ($n = 6$).

4 RESULTADOS

4.1 Ganho de peso

Os animais que receberam a dieta deficiente em tiamina em associação com a administração de pirritiamina (grupo Ptd), mostraram significativa redução de ganho de peso corporal comparados ao controle ($p = 0,005$), após nove dias de tratamento (Tabela 1). As substâncias protetoras Trolox e Dmso, não impediram a diminuição de ganho peso corporal nos animais (Ptd+Tr, $p = 0,240$; Ptd+Dmso, $p = 0,573$; em relação ao grupo Ptd). Porém, Trolox e DMSO *per se* não influenciaram no ganho de peso corporal, comparados ao grupo controle (Tr, $p = 0,176$; Dmso, $p = 0,372$).

Tabela 1 - Ganho de peso corporal dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com pirritiamina.

	Peso (g) - dia zero	Peso (g) - dia 9	Ganho de peso (g)
Controle	39,34 ± 1,17	41,61 ± 1,10	2,27 ± 0,55
Ptd	36,67 ± 1,29	35,29 ± 1,78	-1,38 ± 1,03 ^a
Ptd+Tr	40,89 ± 1,30	38,09 ± 1,13	-2,80 ± 0,82 ^a
Ptd+Dmso	39,96 ± 0,95	39,26 ± 1,13	-0,70 ± 0,99 ^a
Tr	41,34 ± 1,11	45,36 ± 1,17	4,01 ± 0,29
Dmso	39,32 ± 0,93	42,67 ± 0,60	3,35 ± 0,76

Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. ^a $p \leq 0,05$ em relação ao controle, $n = 6$. Grupo Ptd (pirritiamina), Ptd+Tr (pirritiamina com trolox), Ptd+Dmso (pirritiamina com Dimetilsulfóxido), Tr (Trolox) e Dmso (Dimetilsulfóxido). Fonte: acervo do autor, 2017.

4.2 Consumo de ração

Os animais com deficiência de tiamina (grupo Ptd) apresentaram redução do consumo de ração em relação aos controles (Tabela 2) após nove dias de tratamento ($p = 0,002$). O antioxidante Trolox e o anti-inflamatório DMSO não interferiram na redução de consumo de ração nos animais deficientes (grupo Ptd+Tr, $p = 0,609$; grupo Ptd+Dmso, $p = 0,457$; em relação ao grupo Ptd).

Trolox e o Dmso não alteraram o consumo de ração, comparados ao controle (grupo Tr, $p = 0,524$; grupo Dmso, $p = 0,640$).

Tabela 2 - Consumo de ração dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina.

	Consumo (g) - dia zero	Consumo (g) - dia 9	Varição (g)
Controle	6,15 ± 0,09	4,84 ± 0,15	-1,31 ± 0,24
Ptd	6,62 ± 0,17	1,45 ± 0,66	-5,17 ± 0,83 ^a
Ptd+Tr	5,98 ± 0,38	1,34 ± 0,50	-4,65 ± 0,87 ^a
Ptd+Dmsso	5,90 ± 0,37	1,54 ± 0,79	-4,36 ± 1,15 ^a
Tr	6,44 ± 0,43	4,48 ± 0,01	-1,97 ± 0,41
Dmsso	6,05 ± 0,66	5,22 ± 0,47	-0,83 ± 0,19

Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. ^a $p \leq 0,05$ em relação ao controle, $n = 6$. Grupo Ptd (piritiamina), Ptd+Tr (piritiamina com trolox), Ptd+Dmsso (piritiamina com Dimetilsulfóxido), Tr (Trolox) e Dmsso (Dimetilsulfóxido). Fonte: acervo do autor, 2017.

4.3 Análise comportamental

No teste do rotarod (Figura 4), os animais deficientes tratados por oito dias apresentaram redução significativa do tempo de latência para queda, com média de 101,50 s ± 16,52, comparado ao controle, com média de 194,43 s ± 17,99 ($p = 0,0003$). De forma interessante, tanto o Trolox (grupo Ptd+Tr, 209,83 s ± 20,82, $p = 0,0001$ comparado ao grupo Ptd) quanto o DMSO (grupo Ptd+Dmsso, 151,83 s ± 9,82, $p = 0,025$ comparado ao grupo Ptd), reverteram os efeitos de diminuição de coordenação motora observados nos animais deficientes. Porém, o grupo Ptd+Dmsso apresentou reversão da perda de coordenação motora menos intensa, comparado ao grupo Ptd+Tr ($p = 0,019$).

Adicionalmente, o antioxidante Trolox e o anti-inflamatório DMSO não influenciaram a coordenação motora durante os tratamentos de 8 dias (Figura 4).

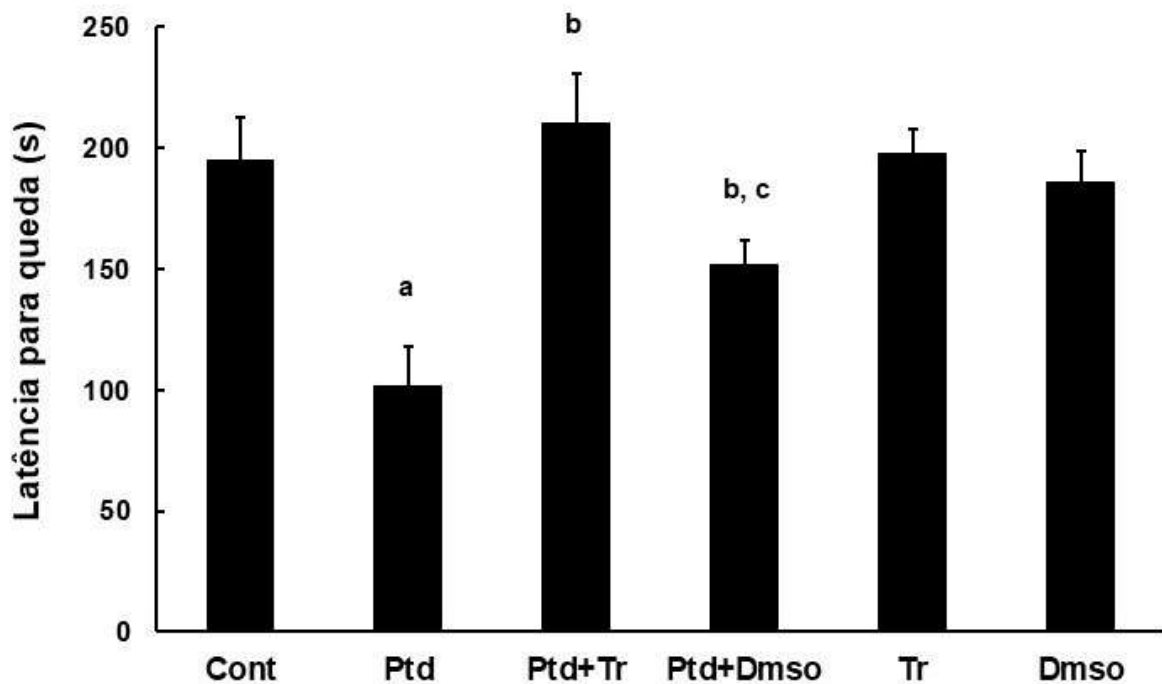


Figura 4 - Teste do rotarod realizado nos camundongos tratados por 8 dias no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina. Os animais foram testados no cilindro com rotação inicial de 5 RPM, com aceleração de 0,1 RPM/s. Os camundongos foram tratados com ração AIN-93M e salina (Cont; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e piritiamina (Ptd), ração AIN-93DT e piritiamina com Trolox (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e piritiamina com DMSO (Ptd+Dms), ração AIN-93M e Trolox (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dms). Resultados representam a média \pm E.P.M. dos tempos (em segundos) das avaliações realizadas no 8º dia de tratamento. Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. ^a $p \leq 0,05$ comparado ao controle, ^b $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Ptd, ^c $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Ptd+Tr; n= 6.

Na avaliação de campo aberto (Figura 5), os animais DT (grupo Ptd) apresentaram uma redução de 28,43% na distância percorrida quando comparados aos controles ($p = 0,003$) e redução de 30,09% na frequência de levantamentos ($p = 0,003$).

Os animais DT que foram tratados com Trolox (grupo Ptd+Tr) apresentaram reversão total dos efeitos da DT, com valores próximos ou acima ao dos controles, com aumento de 13,45% na distância percorrida em relação ao controle ($p = 0,0001$ em relação ao grupo Ptd) e aumento de 25,44% nos levantamentos comparados ao controle ($p = 0,00002$ em relação ao grupo Ptd; $p = 0,010$ em relação ao grupo controle).

O grupo (Ptd+Dms) não apresentou efeito contra a redução da distância percorrida induzida pela DT (Figura 5), com redução de 30,75% em relação ao controle ($p = 0,002$), sendo capaz apenas de reverter os efeitos sobre as atividades de levantamento ($p = 0,006$).

As atividades de limpeza e produção de bolos fecais não foram alteradas pelos tratamentos (Figura 5).

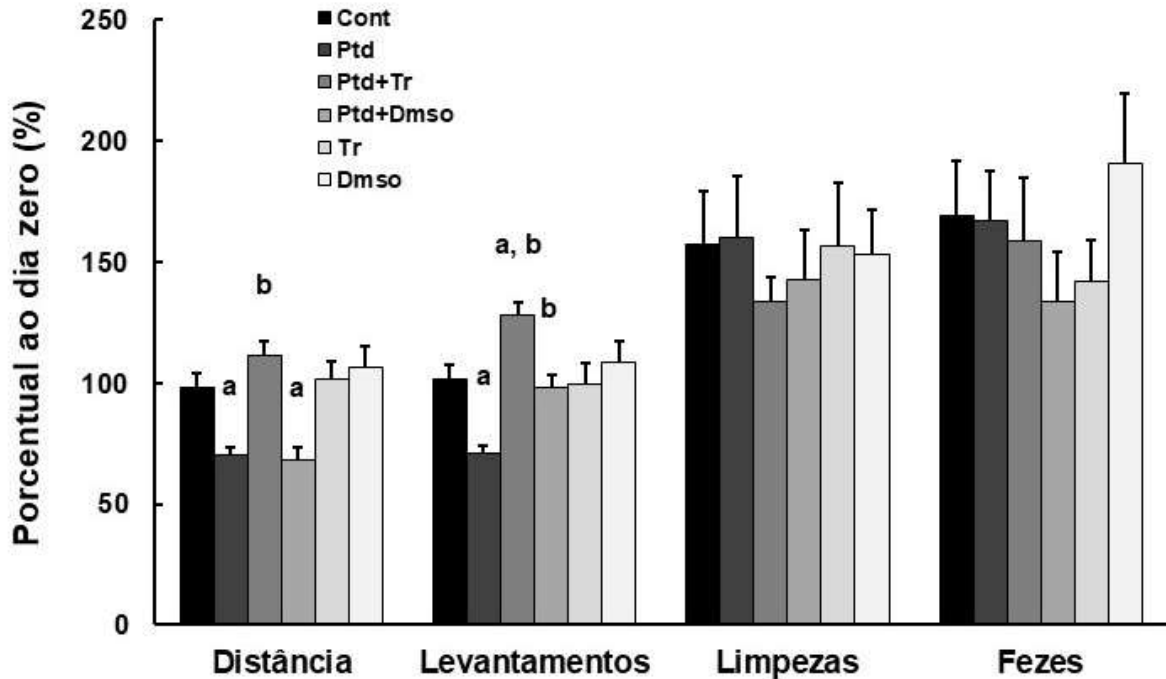


Figura 5 - Efeitos comportamentais em campo aberto nos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com pirritiamina tratados por 8 dias. Os animais foram testados no campo aberto para avaliação de distância percorrida, levantamentos, frequência de limpezas e eliminação de bolos fecais. Os camundongos foram tratados com ração AIN-93M e salina (Cont; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e pirritiamina (Ptd), ração AIN-93DT e pirritiamina com Trolox (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e pirritiamina com DMSO (Ptd+Dms0), ração AIN-93M e Trolox (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dms0). Resultados representam a média \pm E.P.M. das porcentagens das avaliações realizadas no dia 8 em relação ao dia zero (considerado 100%) Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. ^a $p \leq 0,05$ comparado ao controle, ^b $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Ptd, $n = 6$.

4.4 Viabilidade celular

Avaliamos a viabilidade celular no SNC de camundongos expostos ao modelo de DT com pirritiamina. O teste baseia-se na relação direta entre a atividade mitocondrial e a intensidade de cor gerada. Nos animais DT (grupo Ptd) tratados durante nove dias (Figura 6), houve redução de 8,45% na viabilidade celular no hipocampo ($p = 0,003$), 10,86% no córtex cerebral ($p = 0,0001$) e de 8,41% no tálamo ($p = 0,012$).

O Trolox (grupo Ptd+Tr) reverteu a queda de viabilidade celular no hipocampo ($p = 0,013$, em relação ao grupo Ptd) e no córtex cerebral ($p = 0,0005$, comparado ao grupo Ptd). Entretanto, o DMSO (grupo Ptd+Dms0) impediu a redução de viabilidade

celular somente no córtex cerebral ($p = 0,005$, comparado ao grupo Ptd). De forma interessante, ambas as substâncias neuroprotetoras, Trolox e DMSO, não interferiram na redução de viabilidade celular no tálamo (grupo Ptd+Tr, $p = 0,088$; grupo Ptd+DmsO, $p = 0,086$, em relação ao grupo Ptd).

No estriado, nenhum grupo de tratamento apresentou alterações em relação à queda da viabilidade celular (Figura 6).

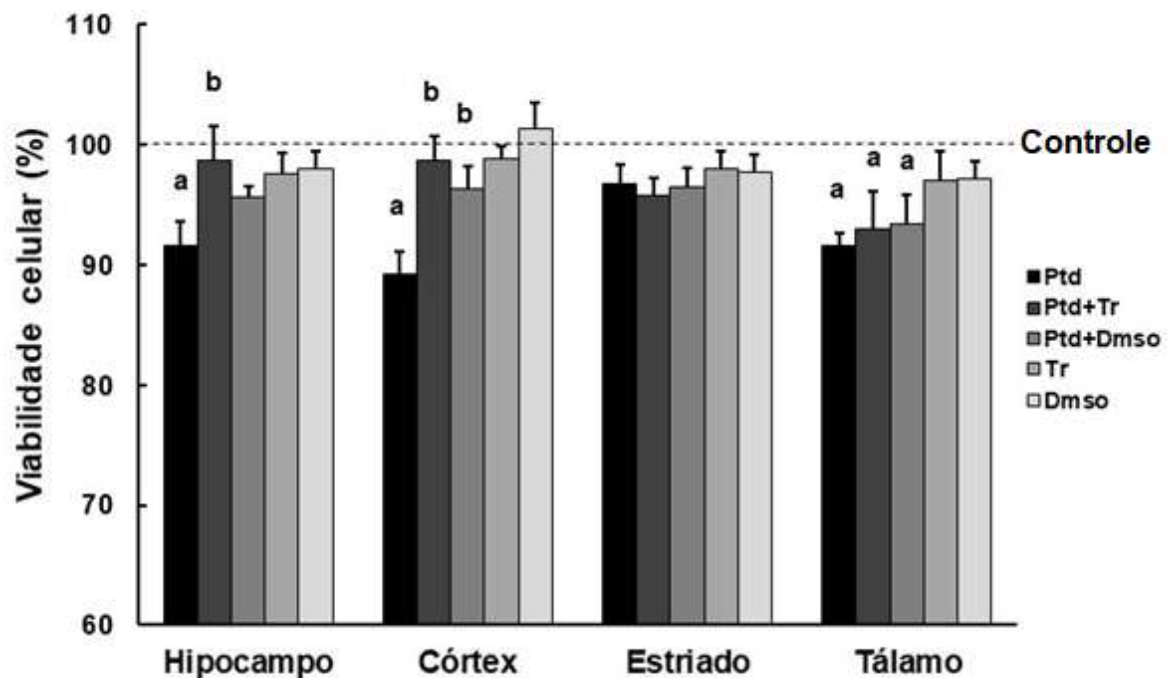


Figura 6 - Viabilidade celular no encéfalo de camundongos deficientes em tiamina com pirritiamina. Os resultados representam a viabilidade celular das diferentes regiões encefálicas de camundongos tratados por 9 dias com ração AIN-93M e salina (controle; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e pirritiamina (Ptd), ração AIN-93DT e pirritiamina com Trolox (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e pirritiamina com DMSO (Ptd+DmsO), ração AIN-93M e Trolox (Tr) e ração AIN-93M e DMSO (DmsO). A linha pontilhada representa o grupo controle. As fatias foram incubadas com TTC por 30 min, escaneadas e as densidades ópticas (D.O.) das regiões encefálicas foram mensuradas por programa específico. Resultados representam a média \pm E.P.M das porcentagens das D.O. em relação ao controle (considerado 100%). Resultados analisados por ANOVA seguido do teste de Duncan. ^a $p \leq 0,05$ comparado ao controle; ^b $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Ptd, $n = 6$.

4.5 Histopatologia

À histopatologia, os camundongos do grupo Ptd apresentaram lesões no tálamo (Figura 7) e tronco encefálico (Figura 8). As lesões foram semelhantes e encontradas em quase todos os animais do grupo ($n = 6$): hemorragias parenquimatosas e subpiais (nos espaços de Virchow-Robin), vacuolização astrocitária e espongirose. A região diencefálica apresentou lesões mais intensas nas áreas talâmicas dorsais, e lesões mais brandas nas áreas hipotalâmicas. Dorsalmente, foram encontradas hemorragias e vacuolização astrocitária em 66,66% dos animais (4/6) e espongirose em 50% (3/6) nas porções centrais, laterais e mediais do núcleo talâmico mediodorsal e no núcleo talâmico central lateral. No hipotálamo, foram identificadas hemorragias em 50% dos animais (3/6), vacuolização astrocitária em 33,33% (2/6) e espongirose em 16,66% (1/6) no núcleo hipotalâmico dorsomedial e no núcleo hipotalâmico ventromedial, nas porções dorsomediais, centrais e laterais.

No tronco encefálico, foram encontradas lesões de hemorragia, vacuolização astrocitária e espongirose em estruturas bulbares e pontinas de 50% dos animais do grupo Ptd (3/6). Foram afetados os núcleos cuneiforme acessório, trigeminal espinal dorsomedial, paratrigeminal, vestibular espinal e trato trigeminal espinal (Figura 8).

De forma interessante, os animais deficientes que receberam paralelamente Trolox (grupo Ptd+Tr) ou DMSO (grupo Ptd+DmsO) apresentaram acentuada redução das lesões no tálamo e tronco encefálico, com a maioria dos animais dos grupos apresentando ausência total de alterações (Figura 9).

No grupo Ptd+Tr, foram observadas hemorragias em 33,33% (2/6) dos animais e vacuolização e espongirose em apenas um animal (16,66%), nas áreas talâmicas dorsais e, apenas um animal (16,66%) apresentou somente espongirose nas áreas hipotalâmicas (Figura 7). No tronco encefálico, um animal (16,66%) apresentou hemorragia e vacuolização astrocitária e em dois animais (33,33%) foi encontrado espongirose.

Nos animais do grupo Ptd+DmsO, houve ausência total de lesões (0/6 animais) nas áreas hipotalâmicas (Figura 9). Porém, 66,66% dos animais (4/6) ainda apresentaram hemorragia e 33,33% (2/6) vacuolização astrocitária e espongirose, no tálamo dorsal (Figura 7). No tronco encefálico, foram encontradas hemorragia em

um animal (16,66%), vacuolização astrocitária em três animais (50%) e espongirose em dois (33,33%) (Figura 8).

Nas outras áreas do SNC – cerebelo, estriado, hipocampo, córtex cerebral – apesar da queda de viabilidade celular no hipocampo e córtex cerebral, observada no teste de redução do TTC, não foram identificadas alterações histológicas (Figura 10). Além disso, não foram observadas alterações no SNC nos controles Trolox (grupo Tr) e DMSO (grupo DmsO) (Figuras 7 a 10).

Paralelamente à avaliação do SNC, investigamos possíveis efeitos dos diferentes tratamentos nas vísceras dos camundongos: coração, pulmão, fígado e rim. Nos animais submetidos ao modelo de DT, não foram observadas alterações morfológicas nestes locais (Figura 11).

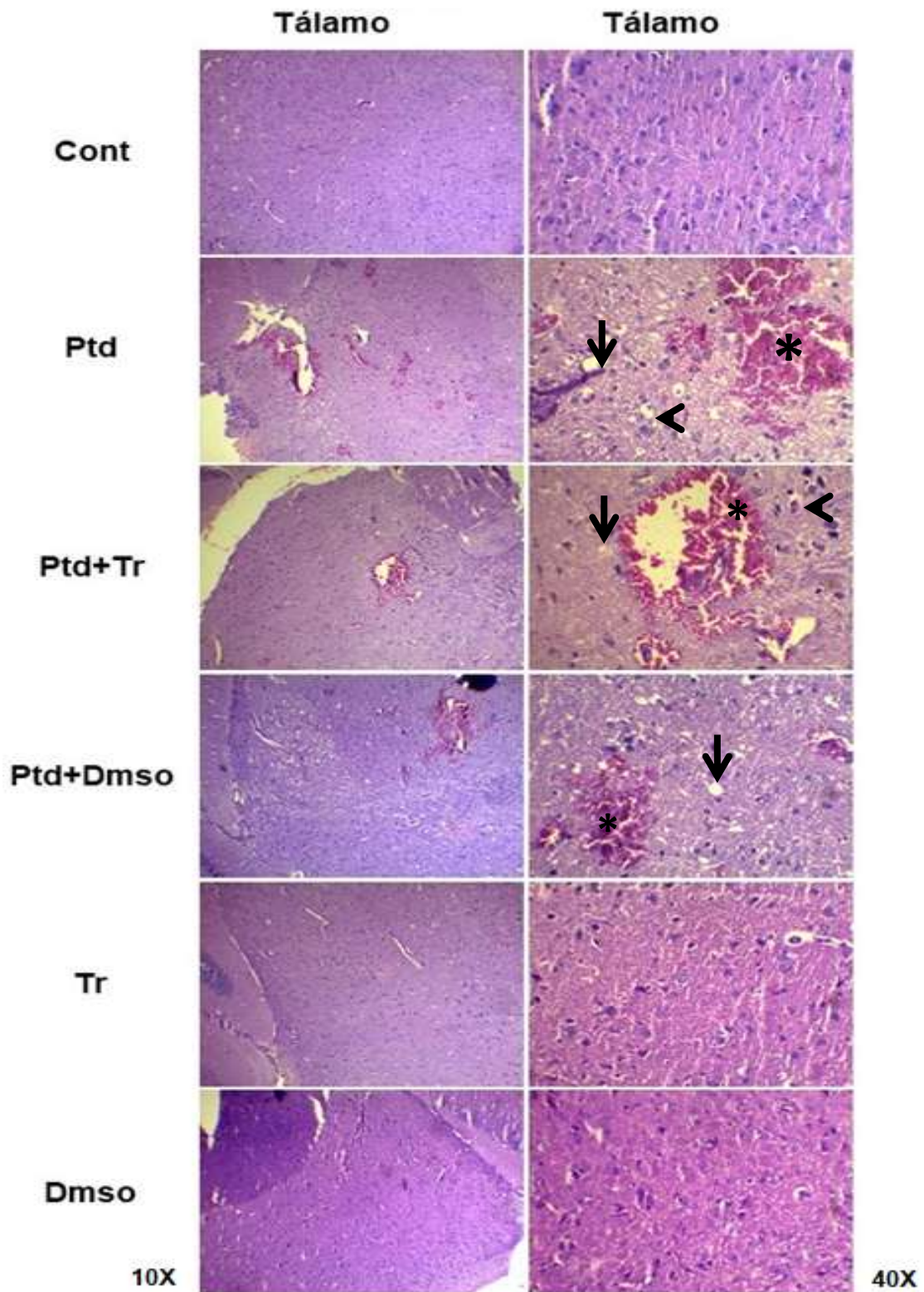


Figura 7 - Fotomicrografia do tálamo de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com pirritiamina. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas de áreas talâmicas dorsais de camundongos tratados por 9 dias do grupo (controle) com ração AIN-93M e salina. Grupo (Ptd), ração AIN-93DT e pirritiamina, apresenta hemorragias (asteriscos), vacuolização astrocitária (cabeça de seta) e espongiose (seta). Grupo (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e pirritiamina com Trolox, com hemorragias (asteriscos). Grupo (Ptd+Dmsso), ração AIN-93DT e pirritiamina com DMSO, hemorragias(asteriscos), espongiose (seta). Grupo (Tr) ração AIN-93M e Trolox ou grupo (Dmsso) ração AIN-93M e DMSO, sem alterações histopatológicas. HE, objetivas 10x e 40x.

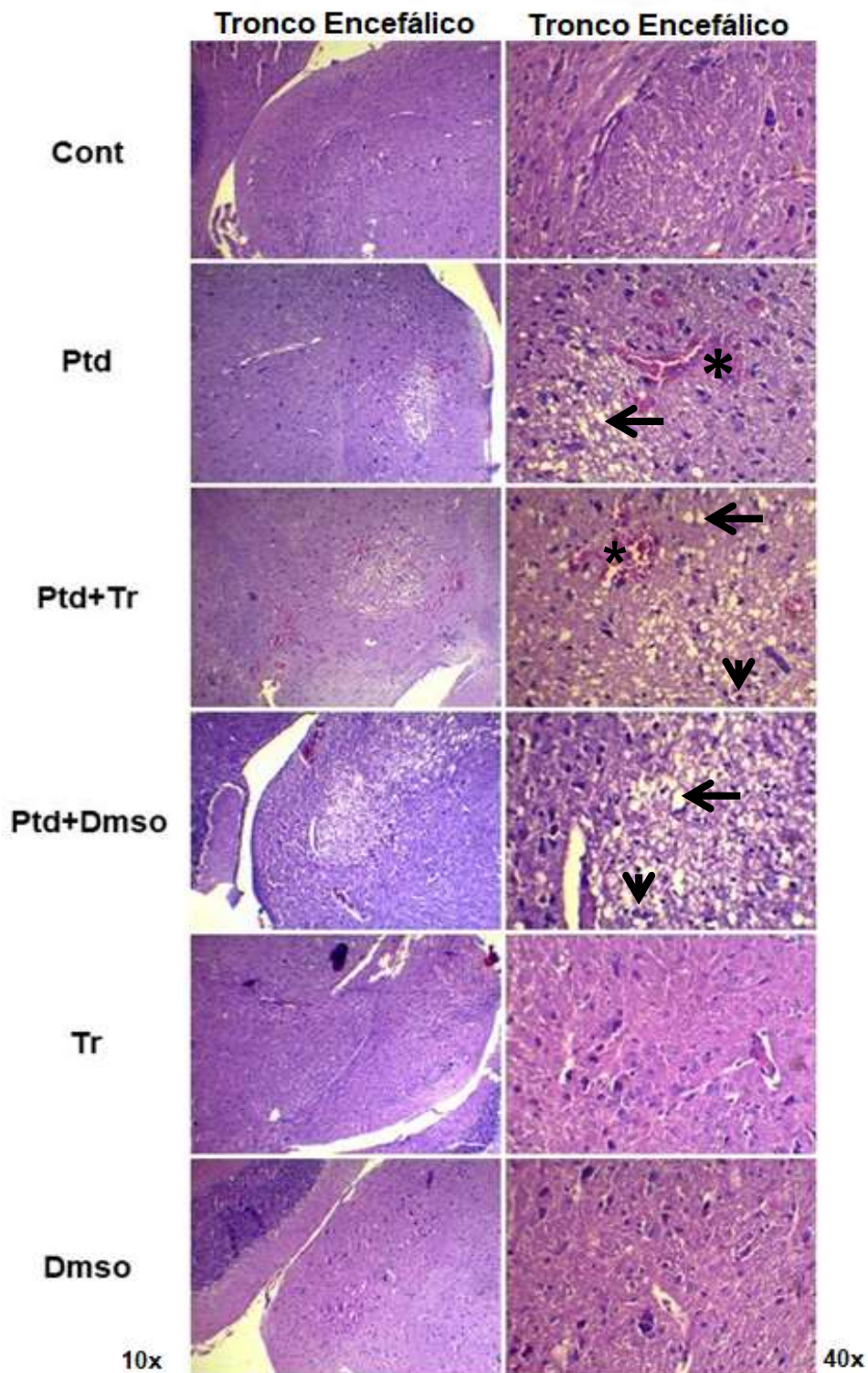


Figura 8 - Fotomicrografia do tronco encefálico de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com piritiamina. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas do tronco encefálico de camundongos tratados por 9 dias do grupo (controle) com ração AIN-93M e salina. Grupo (Ptd), ração AIN-93DT e piritiamina, com hemorragias (asteriscos), vacuolização astrocitária (cabeça de seta), espongiose (seta). Grupo (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e piritiamina com Trolox, com hemorragias (asteriscos), vacuolização (cabeça de seta), espongiose (seta). Grupo (Ptd+Dms0), ração AIN-93DT e piritiamina com DMSO, com vacuolização (cabeça de seta), espongiose (seta). Grupo (Tr), ração AIN-93M e Trolox (Tr) ou grupo (Dms0) ração AIN-93M e DMSO (Dms0), sem lesões. HE, objetivas 10x e 40x.

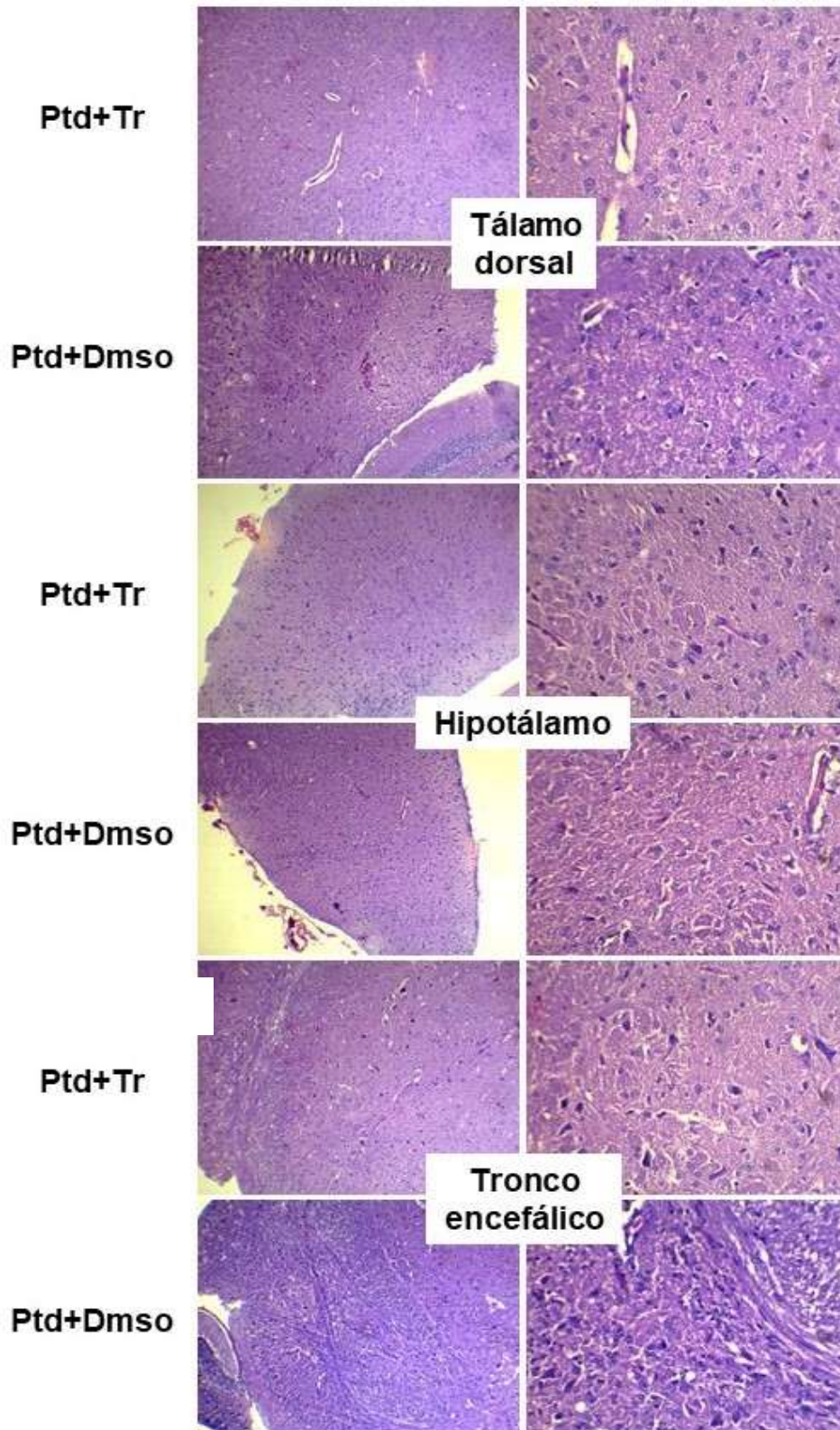


Figura 9 - Fotomicrografia do tálamo e tronco encefálico de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com pirritiamina. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas nas áreas talâmicas dorsais, do hipotálamo e do tronco encefálico de camundongos dos grupos Ptd+Tr e Ptd+Dms0, tratados com ração AIN-93DT e Trolox ou DMSO por 9 dias que não apresentaram lesões. HE, objetivas 10x e 40x.

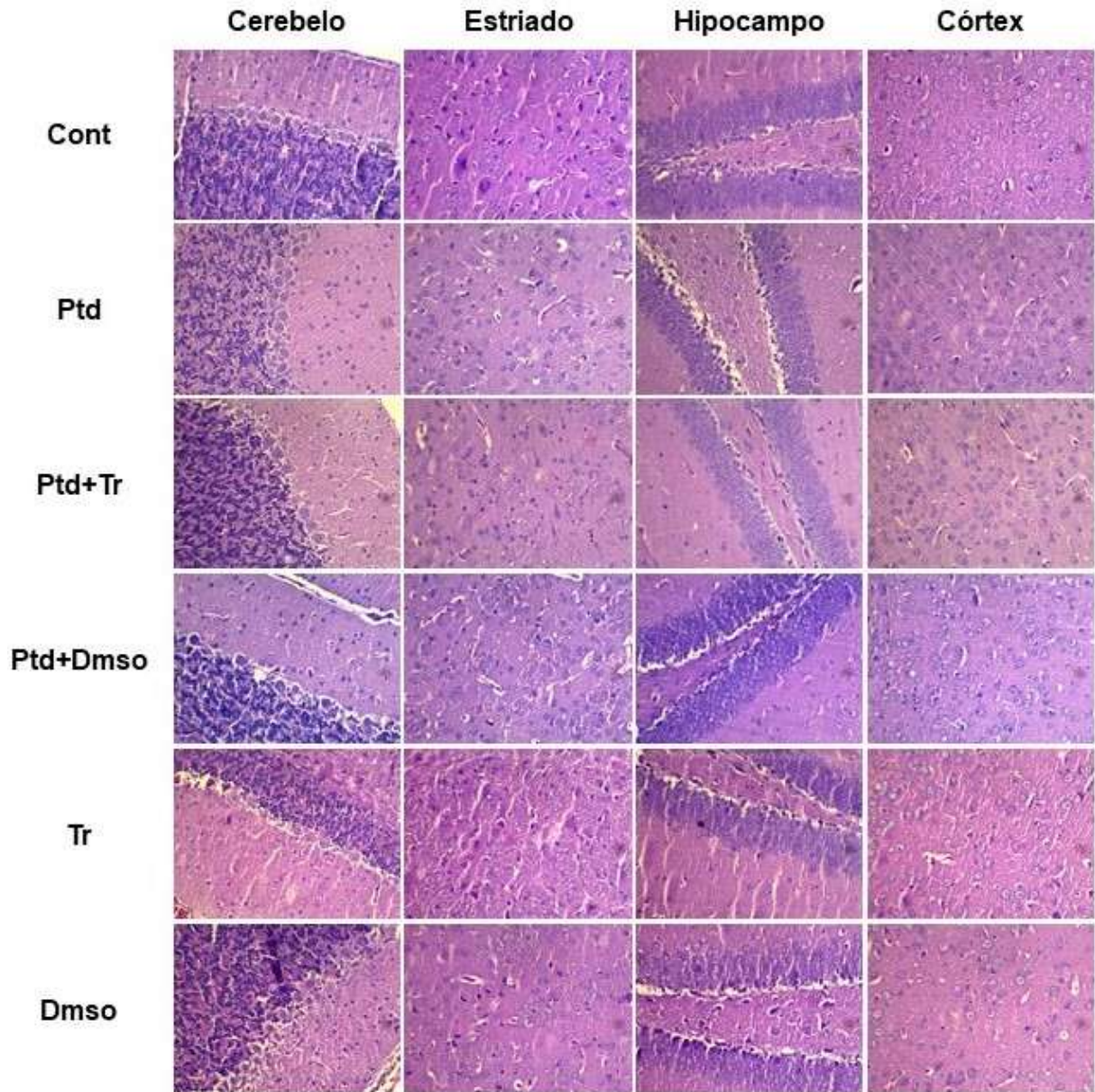


Figura 10 - Fotomicrografia do encéfalo de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com pirritiamina. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas no cerebelo, estriado, hipocampo e córtex cerebral de camundongos tratados por 9 dias com ração AIN-93M e salina (controle), ração AIN-93DT e pirritiamina (Ptd), ração AIN-93DT e pirritiamina com Trolox (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e pirritiamina com DMSO (Ptd+Dmsso), ração AIN-93M e Trolox (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dmsso), que não apresentaram lesões. HE, objetiva 40x.

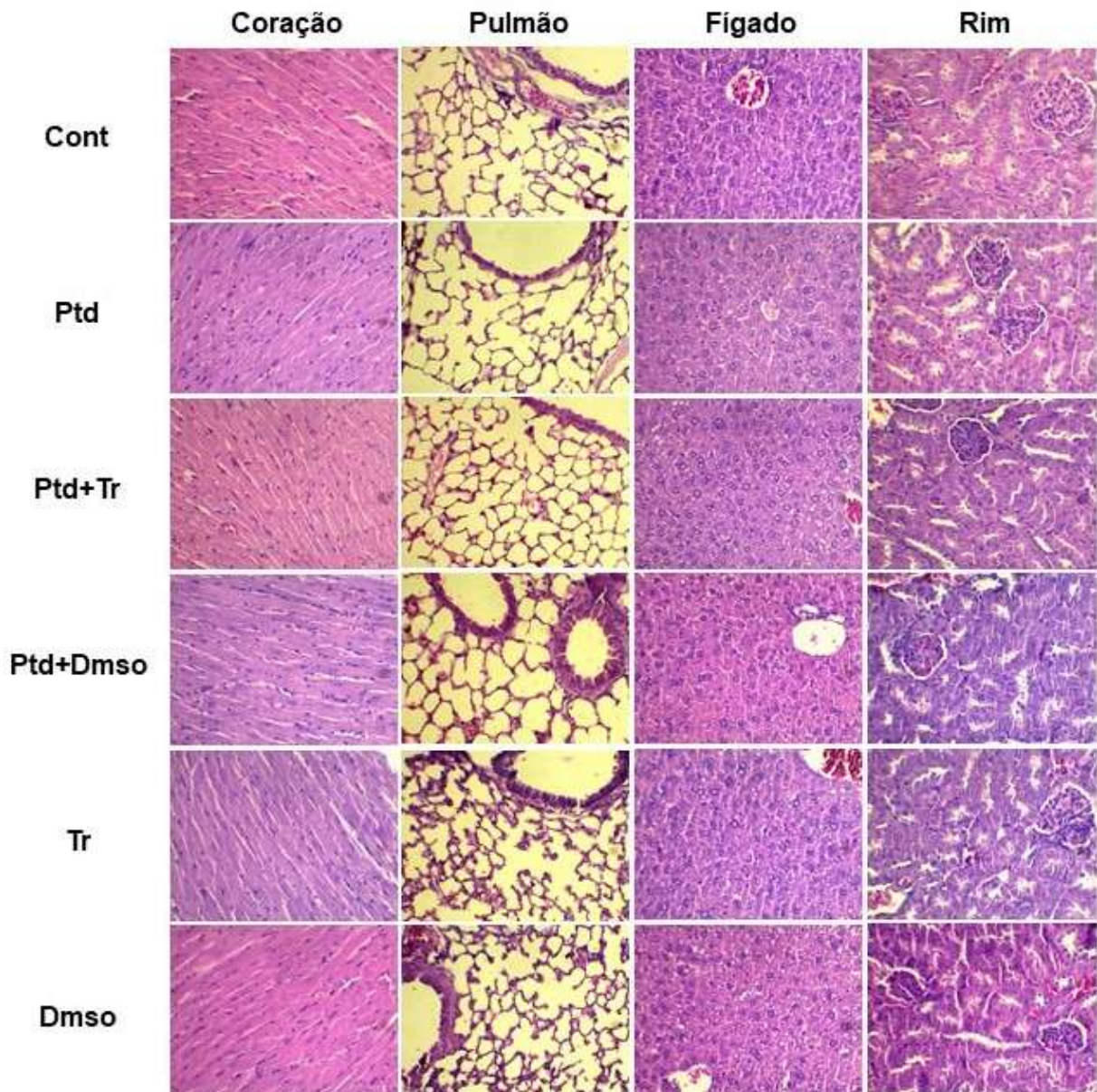


Figura 11 - Histopatologia de vísceras de camundongos no modelo de deficiência de tiamina com pirritiamina. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas sem alterações no coração, pulmão, fígado e rim de camundongos tratados por 9 dias com ração AIN-93M e salina (controle), ração AIN-93DT e pirritiamina (Ptd), ração AIN-93DT e pirritiamina com Trolox (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e pirritiamina com DMSO (Ptd+Dmsso), ração AIN-93M e Trolox (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dmsso), que não apresentaram lesões. HE, objetiva 40x.

4.6 Western Blot

Nas avaliações de *western blot*, investigamos a modulação da fosforilação de $p38^{\text{MAPK}}$ e a expressão de HO-1. Nos tratamentos de 9 dias no modelo de DT com pirritiamina, observamos que os animais do grupo Ptd apresentaram aumento de 185,4% na fosforilação de $p38^{\text{MAPK}}$ (Figura 12A) no córtex cerebral ($p \leq 0,05$, em relação ao controle) e de 147,4% no tálamo ($p \leq 0,05$, comparado ao controle). De

forma interessante, o Trolox (grupo Ptd+Tr) bloqueou totalmente este efeito ($p \leq 0,05$, em relação ao grupo Ptd) em ambas as estruturas encefálicas. O DMSO reduziu o aumento de fosforilação de $p38^{MAPK}$ (grupo Ptd+Dms) no córtex cerebral e no tálamo ($p \leq 0,05$, em relação ao controle), porém, de forma menos intensa que o Trolox ($p \leq 0,05$, comparados ao grupo Ptd+Tr). Adicionalmente, Trolox e DMSO *per se* não alteraram a atividade de $p38^{MAPK}$ (Figura 12A).

A expressão de HO-1, nos animais do grupo Ptd (Figura 12B) aumentou 29,4% no córtex cerebral e 22,8% no tálamo ($p \leq 0,05$, comparados ao controle). Surpreendentemente, tanto o Trolox (grupo Ptd+Tr) quanto o DMSO (grupo Ptd+Dms) não alteraram a indução de aumento de expressão de HO-1, no córtex cerebral e no tálamo. Além disso, Trolox e DMSO, *per se*, não alteraram a expressão de HO-1.

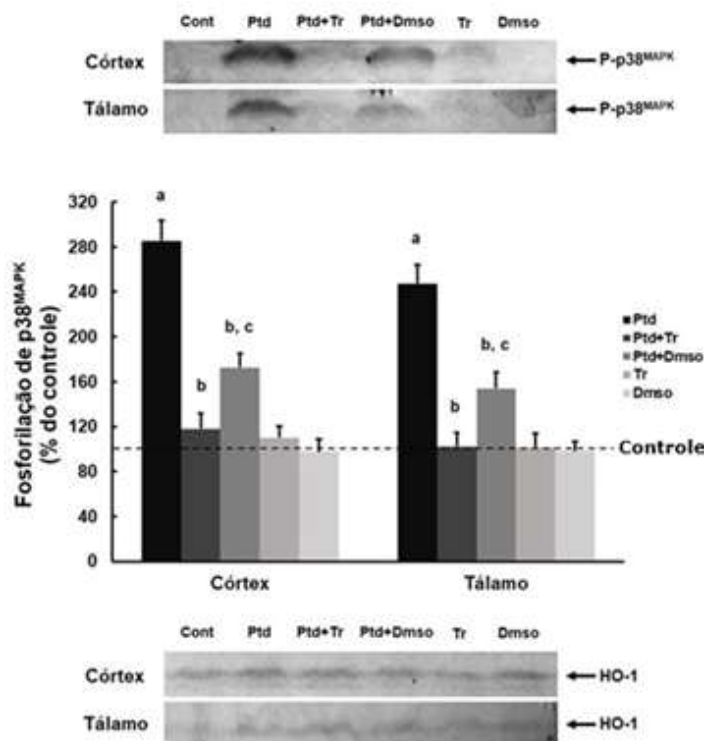


Figura 12 - Efeitos da deficiência de tiamina com piridoxina na fosforilação de $p38^{MAPK}$. O painel mostra *immunoblotting* representativo e quantificações da fosforilação de $p38^{MAPK}$ de camundongos tratados com ração AIN-93M e salina (Cont; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e piridoxina (Ptd), ração AIN-93DT e piridoxina com Trolox (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e piridoxina com DMSO (Ptd+Dms), ração AIN-93M e Trolox (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dms). Formas fosforiladas e totais das proteínas foram detectadas por anticorpos específicos e reveladas pelo método do cromógeno com DAB. O nível de fosforilação foi determinado pela relação da D.O. das bandas fosforiladas/D.O. das totais e os dados são expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado 100%). Valores representam média \pm E.P.M. ($n = 6$). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. ^a $p \leq 0,05$ comparado ao controle, ^b $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Ptd e ^c $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Ptd+Tr.

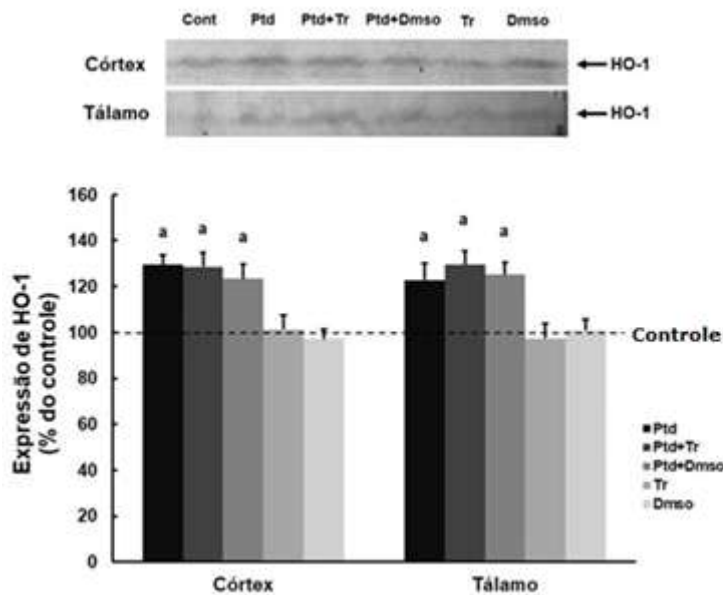


Figura -13 Efeitos da deficiência de tiamina com pirritiamina na expressão de HO-1. O painel mostra *immunoblotting* representativo e quantificação da expressão de HO-1 de camundongos tratados com ração AIN-93M e salina (Cont; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e pirritiamina (Ptd), ração AIN-93DT e pirritiamina com Trolox (Ptd+Tr), ração AIN-93DT e pirritiamina com DMSO (Ptd+Dms), ração AIN-93M e Trolox (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dms). Formas totais das proteínas foram detectadas por anticorpos específicos e reveladas pelo método do cromógeno com DAB. A expressão de HO-1 foi determinado pela relação da D.O. total e os dados são expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado 100%). Valores representam média \pm E.P.M. (n = 6). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. ^a $p \leq 0,05$ comparado ao controle, ^b $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Ptd e ^c $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Ptd+Tr.

5 DISCUSSÃO

A DT pode desencadear disfunções bioquímicas no SNC, que culminam em lesões em algumas regiões do encéfalo, causando hipoatividade motora e prejuízos cognitivos, como ocorre na SWK, no beribéri e em processos neurodegenerativos associados ao envelhecimento (LANGLAIS et al., 1992; LANGLAIS; SAVAGE, 1995; PITKIN; SAVAGE, 2004).

Os modelos experimentais de DT foram desenvolvidos para investigar os mecanismos da SWK (SCHWAB et al., 1996; GIBSON; ZHANG, 2001; PARK et al., 2000). Os antagonistas de tiamina amprólio, oxitiamina e piritiamina têm sido usados em modelos para indução de DT (CHORNY et al., 2017). O modelo de DT induzido por piritiamina tem se mostrado bastante útil nos estudos de mecanismos relacionados à neurodegeneração e também em investigações das bases neurobiológicas de aspectos comportamentais (BUENO, 2015). Os antagonistas da tiamina interferem nos mecanismos metabólicos da tiamina e suas funções. Todos inibem competitivamente o transporte de tiamina, entretanto, a piritiamina é considerada mais eficiente (CHORNY et al., 2017).

Neste estudo, foi utilizada a piritiamina, um inibidor da pirofosfocinase, enzima que converte a tiamina na sua forma ativa, para induzir a deficiência. Ao término dos tratamentos, os animais demonstraram sinais neurológicos clássicos da DT, como perda de peso, ataxia, decúbito lateral e convulsão. Quando a DT é induzida através do consumo de ração com ausência de vitamina B1, sem o uso do antagonista piritiamina, a cinética do processo neurodegenerativo é muito mais lenta, sendo necessário aproximadamente 60 dias para aparecimento dos sinais neurológicos (BUENO, 2015).

De acordo com Mosseau et al. (1996) e Ciccia et al. (2000), os sinais de alopecia, hipersensibilidade a estímulos, perda do tônus muscular, ataxia, perda do apetite, perda do reflexo de endireitamento e convulsões, funcionam como evidências de que os animais atingiram um estado de deficiência grave de tiamina. Nosso estudo demonstra que os camundongos DT apresentaram queda significativa no ganho de peso. Porém, as substâncias protetoras Trolox e DmsO, não impediram a diminuição de ganho peso corporal nos animais.

O baixo consumo de ração e a queda de peso geram aumento de radicais livres, ocasionados pelo estresse oxidativo devido às disfunções na produção de

energia. Esses resultados são consequências do papel fundamental da tiamina no processo de produção de ATP e indicam uma alteração grave no estado energético de todo organismo (VAZQUEZ et al., 2015).

O baixo consumo de ração e, conseqüentemente, a perda de peso, são os primeiros sinais da DT. Segundo Bâ (2012), a tiamina tem papel fisiológico crucial na programação da homeostase do peso corporal, incremento e ponto de ajuste em roedores. Animais privados de tiamina são inicialmente mais tolerantes à glicose, mas a tolerância diminui a partir da terceira semana, quando começam a perder peso. Estas alterações têm várias implicações em seres humanos e animais, dentre elas está a perda de apetite e desnutrição (VAZQUEZ et al., 2016).

O encéfalo é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao alto consumo de oxigênio e, conseqüentemente, à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). O estresse oxidativo desempenha papel importante na excitotoxicidade, danos axonais e morte neuronal (CHIURCHIU; ORLACCHIO; MACCARRONE, 2016) e está envolvido no início e na progressão de várias doenças neurodegenerativas. Possivelmente, o Trolox como antioxidante, atue de forma eficiente contra o estresse oxidativo causado pela DT. Estudos demonstram que em modelos de animais DT há claramente aumento de produção de EROs, com conseqüente estresse oxidativo no organismo e, particularmente, nas células neuronais (LIU; KE; LUO, 2016).

A neuroinflamação pode alterar o potencial de membrana mitocondrial e a função muscular, resultando em aumento dos EROs. Contudo, o estresse oxidativo também pode induzir neuroinflamação (LIU; KE; LUO, 2016). O DMSO é mais eficaz na inflamação aguda, é um potente vasodilatador e neutraliza radicais livres na lesão tecidual (ROSE; HODGSON, 1993). O DMSO possui vários mecanismos farmacológicos, com capacidade de agir profundamente no tratamento de lesões localizadas em tecidos densos ou de acesso difícil, além de proporcionar elevada segurança e baixa toxicidade (ORLATO, 2006). Sugere-se que o DMSO possua ação eficaz em curtos períodos de tempo, no início do desenvolvimento das lesões.

O teste do rotarod representa, juntamente com o campo aberto, a principal abordagem visual para caracterização motora em modelos animais (BROOKS; DUNNET, 2009). Observamos que os tempos de latência para queda nos animais deficientes que receberam Trolox (grupo Ptd+Tr) ou DMSO (grupo Ptd+Dms), aumentaram significativamente, atingindo valores similares aos animais controle. É

possível que nos animais que apresentaram déficit de desempenho motor no rotarod (grupo Ptd), houve redução na produção de ATP nas células musculares, por disfunções no metabolismo energético celular, bem como, por alterações em áreas vulneráveis do encéfalo (RESENDE, 2012).

A atividade reduzida de enzimas associadas ao metabolismo energético, devido à DT, pode levar a uma redução na síntese de ATP, que por sua vez, pode causar danos e/ou morte celular. Se o mecanismo responsável pelas disfunções e lesões observadas no processo neurodegenerativo causado pela DT estivesse relacionado apenas com uma redução na síntese de ATP, seria esperado que todos os neurônios, por serem aeróbicos, seriam afetados e todas as regiões cerebrais seriam igualmente comprometidas. No entanto, a DT induz a morte neuronal em regiões específicas do SNC que incluem principalmente o tálamo e os corpos mamilares (LANGLAIS et al., 1992).

Portanto, supõe-se que a tiamina e/ou seus derivados desempenham outras funções específicas em algumas regiões do SNC e, a restrição, mesmo que parcial dessa vitamina, desencadeia mecanismos envolvidos com a morte neuronal, os quais antecederiam os efeitos causados por diminuição de ATP (REZENDE, 2012).

Ataxia de marcha e perda de reflexo são características de modelos experimentais de SWK. Tanto em modelos experimentais como em seres humanos, episódios de DT causam, entre outros efeitos, hipoatividade motora e prejuízos cognitivos (BUENO, 2015).

A participação do GABA e do glutamato, importantes neurotransmissores do SNC, tem sido investigada em atividades relacionados às funções motoras (RAMIREZ et al., 2005). Estudos demonstram que a DT reduz significativamente o tempo de permanência dos animais no rotarod, com redução significativa da transmissão glutamatérgica e gabaérgica no cerebelo (PEREIRA-CAIXETA, 2011).

Foi também demonstrado que estas alterações neurológicas são apresentadas por animais DT três meses após o início da deficiência, em modelos com ração sem tiamina (REZENDE, 2012). Em nosso estudo, os animais rapidamente apresentaram sinais neurológicos, caracterizando o clássico modelo de DT com pirritiamina. Dessa forma, os dados aqui apresentados indicam que a tiamina e/ou seus derivados parecem desempenhar um papel específico na manutenção dos níveis de GABA e glutamato em algumas regiões do SNC.

Os grupos Ptd+Tr e Ptd+Dmso apresentaram resultados positivos em relação aos animais Ptd, sugerindo que o estresse oxidativo e a inflamação são mecanismos importantes associados à neurodegeneração induzida por DT.

Os níveis do glutamatos e/ou GABA em regiões cerebrais específicas do cérebro, afetam a motricidade dos animais (PEREIRA-CAIXETA, 2011). Sugere-se que a deficiência de tiamina afeta diretamente os sistemas de equilíbrio e coordenação motora, levantando a hipótese, também, de ajustes neuroquímicos compensatórios na tentativa de amenizar os prejuízos causados pela deficiência de tiamina.

O estabelecimento destas alterações em importantes vias neuronais, pode culminar com o aparecimento de distúrbios comportamentais. De acordo com Freeman et al. (1987), a diminuição do comportamento exploratório dos animais DT no teste de campo aberto, tanto no que diz respeito à distância percorrida quanto ao número de levantamentos sobre as patas traseiras, pode indicar, além de disfunção no componente motivacional, alterações no comportamento motor dos animais.

Nos testes de campo aberto, o Trolox (grupo Ptd+Tr) apresentou ação protetora mais eficaz que o DMSO. Este anti-inflamatório não reduziu de forma tão efetiva a ação do antagonista piritiamina.

Observamos em nosso modelo experimental de DT, redução na viabilidade celular no encéfalo dos camundongos em áreas importantes, como o córtex cerebral, hipocampo e tálamo. De maneira interessante, o corpo estriado não apresentou alteração, pois possui grande complexidade na neurotransmissão glutamatérgica, gabaérgica e dopaminérgica, e está envolvido na regulação do comportamento motor.

Em nossas análises, o estriado não apresentou lesão histológica, porém, o tálamo foi a região cerebral mais afetada, tanto pela queda da viabilidade celular, como também, pelas lesões morfológicas evidenciadas na região. Estes achados justificam a falta de coordenação motora e equilíbrio dos animais, pois esta região é responsável pelos sinais motores e sensitivos.

O tálamo tem funções sensitivas e funções relacionadas à emoção, à motricidade, à ativação cortical (MAZZOLA et al., 2013) e às funções cognitivas (VIGIL et al., 2010). É provável que a vulnerabilidade seletiva para a DT em algumas regiões encefálicas, seja o resultado de uma interação complexa entre as propriedades neuroquímicas, celulares e metabólicas próprias destas regiões (WITT,

1985). Há relatos de morte celular no hipocampo e tálamo, umas das áreas cerebrais mais afetadas em ratos e seres humanos DT (LANGLAIS; ZHANG, 1997).

Observamos que o DMSO atuou parcialmente no impedimento da queda da viabilidade celular (somente no córtex cerebral), ao contrário do Trolox, que apresentou uma melhor atuação prevenindo contra a queda da viabilidade celular no hipocampo e córtex cerebral. O anti-inflamatório DMSO se constitui agente importante no complexo bioquímico da inflamação, ocupando posição de destaque na fisiopatologia da injúria de reperfusão, com propriedade de neutralizar a ação lesiva dos radicais hidroxil após isquemia mitocondrial (ARDEN et al., 1989; ROSE; HODGSON, 1993).

Apesar da queda da viabilidade celular no córtex cerebral e hipocampo, não observamos alterações morfológicas celulares ou tissulares nesta região. Porém, no tálamo dorsal, hipotálamo e tronco encefálico, foram evidenciadas lesões extensas.

O tratamento com pirritiamina tem efeito inflamatório, e a indução de DT com este antagonista prejudica a função celular gerando estresse oxidativo e excitotoxicidade (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009). A morte neuronal em regiões específicas do encéfalo de roedores DT, tem sido associada ao processo inflamatório devido à presença de microglia ativada, da indução da óxido nítrico sintase endotelial, de alterações na barreira hematoencefálica e do acúmulo microglial (KE; GIBSON, 2004).

À histopatologia, observamos variabilidade significativa nos grupos experimentais no comprometimento das regiões encefálicas entre os animais DT e dos grupos com as substâncias protetoras. Foram encontrados nos seis animais, ou seja, em todos os animais submetidos à depleção de tiamina, lesões semelhantes no tálamo e tronco encefálico, como hemorragias parenquimatosas e subpiais, vacuolização astrocitária e espongirose. Os dados sugerem alta sensibilidade vascular e astrocitária à DT, fenômenos possivelmente relacionados à prejuízos na BHE.

Os astrócitos são importantes para a homeostase do tecido nervoso, mantendo a permeabilidade da BHE e na remoção do glutamato no espaço extracelular (NARDONE et al., 2013; VETRENO et al., 2012). Estudos demonstram que a pirritiamina induz alterações na BHE, componente essencial para a função metabólica normal, gerando hemorragias focais com extravasamento das hemácias

(SARKAR et al., 2016). Posteriormente, estas alterações desencadeiam a ativação microglial, resultando em neuroinflamação (NARDONE et al., 2013).

A DT induz perda de células em várias regiões encefálicas, sendo o tálamo uma das áreas mais afetadas. Estudos têm evidenciado que o tálamo está envolvido em processos de aprendizagem e memória, devido às suas conexões com o hipocampo (BUENO, 2015). As lesões ocorridas no tálamo são importantes para compreender os mecanismos responsáveis pela neurodegeneração. Segundo Sarkar et al. (2016), é observada tumefação ventricular e aumento de água extracelular no tálamo, resultante da neurodegeneração.

O acúmulo de sódio no líquido intracelular atrai, por efeito osmótico, a água para o interior da célula, aumentando o volume celular e as alterações morfológicas encontradas no sistema nervoso central de animais acometidos pela DT (MACHADO et al, 2017).

De acordo com Butterworth (2003), o cerebelo é umas das regiões que apresentam mais seletividade e maior susceptibilidade à DT. Porém, neste estudo não foram evidenciadas lesões, sugerindo que seu envolvimento pode ser mais intenso em um momento tardio da doença. As alterações no tronco encefálico foram menos intensas do que no tálamo, porém há correlação com sinais encontrados nos animais deficientes.

Observamos que os efeitos do antioxidante Trolox e do anti-inflamatório DMSO foram significativos, promovendo proteção de forma considerável às atividades comportamentais dos animais, e na redução do número de animais com lesões histológicas. Estes achados evidenciam o envolvimento de distúrbios que geram estresse oxidativo e processos inflamatórios na DT.

As principais EROS vinculadas ao estresse oxidativo são: o radical ânion superóxido ($O^{\cdot-} 2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($\cdot OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Estes por sua vez são neutralizados por um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído de enzimas tais como a catalase, superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, além de inúmeros sistemas de defesas não enzimáticas incluindo as vitaminas A, E e C (ALEXI et al., 1998; GIANNI et al., 2004).

Os resultados deste trabalho contribui para o entendimento da modulação de vias de sinalização celular das MAPKS, especialmente as $p38^{MAPK}$ e a expressão das proteínas do choque térmico (HSP), especificamente a enzima heme oxigenase

1 (HO-1) diante de um estresse oxidativo gerado pela deficiência de tiamina induzida por pirritiamina.

As proteínas cinases p38^{MAPK}, também conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), são ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, estando frequentemente relacionadas a estresse e morte celular (MIELKE; HERDEGEN, 2000; COWAN; STOREY, 2003). Entretanto as p38^{MAPK} também regulam o desenvolvimento do SNC e a neuroplasticidade (WAETZIG; HERDEGEN, 2004).

Os resultados obtidos das avaliações de *western blot* apresentaram aumento de fosforilação de p38^{MAPK} no córtex e tálamo dos animais deficientes (Grupo Ptd). Estudos relatam altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) no tálamo e córtex cerebral de animais com deficiência de tiamina (LANGLAIS et al., 1997).

Um repertório de diferentes estímulos, como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, podem desencadear a fosforilação em cascata de moléculas efetoras e/ou ativadoras da sinalização p38^{MAPK} (CUNHA, 2014). A p38^{MAPKS} é ativada no estresse oxidativo durante a apoptose (PINTO; RESENDE, 2014).

Este trabalho demonstra a correlação entre a geração de EROS/ estresse oxidativo com o aumento da fosforilação da p38 no modelo de DT com pirritiamina, sugerindo assim, a modulação das vias de sinalização das MAPKS *in vivo* na deficiência de tiamina.

As proteínas da família MAPKS são transdutoras de sinais que controlam múltiplos processos celulares essenciais para o desenvolvimento de um organismo, incluindo crescimento celular, proliferação, diferenciação, apoptose, estresse oxidativo e imunidade inata (SEGER; KREBS, 1995). As MAPKs ativadas por estresse são as proteínas quinases p38^{MAPKS} (SAPK2) (CORDOVA, 2002).

Nosso resultado sugere que o aumento da fosforilação da p38^{MAPK} em animais DT induzidos por pirritiamina (grupo Ptd) está relacionado com a indução de morte celular, sendo evidenciado pela viabilidade celular e a análise histopatológica deste estudo.

Neste trabalho o tálamo foi à região cerebral mais afetada tanto na viabilidade celular como no desenvolvimento de lesões histológicas. O córtex cerebral apresentou queda da viabilidade celular. Dada à hipótese de que danos

mitocondriais ocasionados pelo estresse oxidativo decorrentes da DT podem estar relacionados em áreas mais vulneráveis ou sensíveis do cérebro. Sugerindo assim, maior sensibilidade/vulnerabilidade do tálamo.

A morte celular excitotóxica pode ser tanto necrótica quanto apoptótica e envolve a ativação de diversas vias de sinalização celular entre elas a quinase ativada por mitógenos p38^{MAPK}. Na necrose, ocorre ruptura da membrana plasmática e depleção dos níveis de ATP (MOLZ, 2003).

O influxo de Ca²⁺ regula a excitabilidade da membrana e a intensidade da transmissão sináptica através da ativação de cascatas de sinalização intracelular dependentes deste íon. Concentrações excessivas de Glutamato na fenda sináptica resultam na superestimulação de seus receptores e entrada de Ca²⁺ excessiva no terminal pós-sináptico, que somadas à liberação do Ca²⁺ das reservas intracelulares, elevam a concentração de Ca²⁺ acima do limiar ativador de mecanismos regulatórios, ativando os mecanismos intracelulares de excitotoxicidade que culminam na morte neuronal (SATTLER; TYMIANSKI, 2000).

Os neurônios possuem mecanismos homeostáticos especializados na manutenção intracelular tanto da localização dos íons Ca²⁺ quanto da concentração destes, através de uma complexa relação entre o influxo, efluxo, captação e armazenamento no retículo endoplasmático e mitocôndria (SATTLER; TYMIANSKI, 2000). Altos níveis de Ca²⁺ podem contribuir para processos de excitotoxicidade, exacerbando a morte neuronal (Orrenius et al., 2003). Demonstra-se que a elevação do cálcio ionizado causada pela excitotoxicidade ativa as MAPKS.

Sugere-se que a excitotoxicidade glutamatérgica ocasionados pela sensibilidade dos astrócitos à DT que ativam as proteínas quinases p38 induz o aumento do nível de fosforilação.

O trolox (Grupo Ptd + Tr) e DmsO (Grupo Ptd + DmsO) bloqueou a fosforilação de p38^{MAPK} no tálamo e córtex cerebral, pode-se sugerir que o antioxidante, ao combater o estresse oxidativo, inibe a produção de espécies reativas de oxigênio, e assim, promove a diminuição da fosforilação de p38^{MAPK}.

A mitocôndria é a principal fonte de produção de ATP e ROS, no qual, desempenha um papel crítico na regulação balanço redox intracelular (PHENSY et al, 2017).

O aumento de EROS pode levar a ativação das proteínas cinases e para evitar o surgimento de um episódio de estresse oxidativo existem sistemas

antioxidantes de defesa, constituídos por antioxidantes não enzimáticos, tais como, as vitaminas A, E e pró-betacarotenos e sistemas enzimáticos (TELES *et al*, 2015)

A atuação do DMSO (Ptd+DmsO) reduziu o aumento da fosforilação da p38 MAPK no córtex e tálamo, porém não foi tão eficiente quanto o trolox. Como observado anteriormente, o anti-inflamatório agiu parcialmente no impedimento da queda de viabilidade celular somente no córtex cerebral. O córtex não apresentou lesões morfológicas, porém teve diminuição da atividade mitocondrial maior que o tálamo, ao contrário, a região cerebral do tálamo apresentou intensas lesões histológicas.

A diminuição da atividade da piruvato desidrogenase, devido a depleção de tiamina, aumenta a produção de radicais livres e promove a acidificação extracelular, pelo acúmulo de piruvato, gerando injúrias neuronais. O NO pode interagir com o radical livre superóxido e resultar na formação de peroxinitrito, um potente oxidante associado com toxicidade e dano celular (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009). É interessante ressaltar que tanto o NO quanto o peroxinitrito podem inibir a atividade da α - cetoglutarato desidrogenase, que conseqüentemente pode exacerbar a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo (PARK *et al.*, 1999; HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

A resposta ao estresse oxidativo ocorre quando as células são expostas as EROS. Estas substâncias podem danificar macromoléculas biologicamente ativas e fundamentais, como o DNA e outras proteínas. A célula responde aumentando a expressão heme-oxigenase 1 (HO-1) (MEYER; SILVA, 1999).

A HO-1 é uma proteína do choque térmico (HSP), também conhecida por HSP-32, induzidas por diversos estímulos, dentre eles a hipóxia, endotoxinas e EROS (AMANO, 2011).

Diversos tipos de estresse metabólico (exposição ao calor, metais pesados, diversos ionóforos, análogos de aminoácidos e venenos metabólicos que afetam a produção de ATP resultam em alterações similares na expressão de genes, levando ao acúmulo de HSP (MEYER; SILVA, 1999).

No SNC é observado efeito benéfico da indução da expressão de proteínas do choque térmico, em ratos, protegendo contra lesão induzida por isquemia/reperfusão e por estimulação com glutamato (MEYER; SILVA, 1999).

As regiões do córtex e tálamo dos animais (Grupo Ptd) apresentaram aumento da expressão de HO-1. Já os grupos Ptd+Tr e Ptd+DmsO com o uso de

antioxidante e anti-inflamatório, não alteraram a indução de aumento de expressão de HO-1 pela DT.

Portanto, dados deste trabalho sugerem que a DT com pirritiamina induziu o aumento da expressão HO-1 como marcador biológico para ocorrência de estresse oxidativo, já que a enzima heme oxigenase – 1 não protegeu o grupo Ptd.

Além disso, lesão causada por estresse oxidativo parece ser fator patogênico comum nas diversas doenças neurológicas. A exposição ao peróxido de hidrogênio pode ser utilizada como modelo de processos que resultam em danos oxidativos no SNC (VALLI; SOBRINHO, 2014)

Em paralelo às alterações do SNC, avaliamos os aspectos histopatológicos das vísceras dos animais tratados. De forma interessante, não observamos interferência do modelo no coração, rim, fígado e pulmão. Pode-se considerar que a pirritiamina é um antagonista que induz em poucos dias a DT, sendo o SNC muito sensível a esta depleção da vitamina B1.

Ainda permanece como tratamento de fase aguda da DT, a administração de altas doses de vitamina B1, porém, para casos mais prolongados e recorrentes, ainda não há intervenção eficaz para reduzir os prejuízos neurológicos.

Portanto, com os dados obtidos neste trabalho, foi possível identificar as áreas encefálicas afetadas, utilizando o método de avaliação de viabilidade celular do TTC, conjuntamente com a avaliação histopatológica e determinar as alterações psicomotoras nos animais deficientes. O Trolox e o DMSO, além de seu uso como ferramenta para investigação da patogenia da DT, abrem um leque de possibilidades para possíveis intervenções terapêuticas em distúrbios neurológicos.

Trata-se de um estudo inédito *in vivo* ao demonstrar o envolvimento das vias de sinalização MAPKS pela p38^{MAPKS} na morte das células neuronais, contribuindo para o entendimento de processos neurodegenerativos, metabólicos, como também, a avaliação do aumento da expressão da HO-1 na ocorrência de estresse oxidativo como mecanismo chave na patogenia do distúrbio.

Este trabalho abre um leque de novas investigações farmacológicas, como também, desenvolvimento de novas pesquisas sobre o papel da via de sinalização na deficiência de tiamina induzida por pirritiamina.

6 CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados, além de contribuir para o esclarecimento sobre os componentes dos mecanismos neuroquímicos subjacentes às alterações neurológicas em condições de deficiência de tiamina, também abrem um novo caminho para se entender, em futuros estudos, as bases moleculares e a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas causadas pela depleção de tiamina, além de desenvolver ações terapêuticas através da compreensão dos mecanismos celulares e moleculares.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, concluímos que a DT induzida por piritiamina em camundongos:

a) Ocasinou alterações metabólicas, verificadas através da diminuição do ganho de peso e consumo de ração após nove dias de tratamento, não revertidas pela ação do Trolox e DMSO;

b) Promoveu redução da distância percorrida e levantamento dos animais em 8 dias, porém, o Trolox foi capaz de reverter esse quadro e, o DMSO, conseguiu reverter apenas os efeitos da diminuição de levantamentos, sem efeito sobre a distância percorrida.

c) Reduziu o tempo de latência para queda dos animais no Rotarord, sendo que o Trolox e o DMSO revertem o efeito de diminuição de coordenação motora, com maior efetividade do Trolox;

d) Promoveu queda da viabilidade celular do hipocampo, córtex cerebral e tálamo em 9 dias de tratamento, sendo que o Trolox reverteu a queda no hipocampo e córtex;

e) Induziu o desenvolvimento das lesões no tálamo dorsal, hipotálamo e tronco encefálico, com hemorragias parenquimatosas e subpiaais, vacuolização astrocitária e espongirose. Trolox e DMSO atenuaram o quadro. Nas vísceras, o coração, pulmão, fígado e rim não foram encontradas lesões;

f) Demonstrou pelo aumento da expressão da HO-1 a ocorrência do estresse oxidativo como fonte principal do desenvolvimento da patologia da DT.

g) Envolveu possivelmente a modulação de p38^{MAPKS} na indução de morte celular no tratamento *in vivo*. Trolox bloqueou totalmente o aumento da fosforilação p38^{MAPKS}.

REFERÊNCIAS

- AARTS, M. M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 2, p.137- 47, 2004.
- ABDOU, E.; HAZELL, A. S. Thiamine Deficiency: An Update of Pathophysiologic Mechanisms and Future Therapeutic Considerations. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 2, p. 353-361, 2015.
- AGGLETON, J. P. Understanding anterograde amnesia: disconnections and lesions. **Quarterly Journal of Experimental Psychology**, v. 61, v. 10, p. 1441-1471, 2008.
- AGUIAR JR. et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 452-457, 2009.
- ALBERTINI, R.; ABUJA, P. M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v. 30, n. 3, p. 181-188, 1999.
- ALSTRUP, L.; BIRGIT, S. Study of solvation effects on the tautomeric equilibrium and catalytic ylide generation of thiamin models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 1037-1047, 2008.
- AMANO, Mariane Tami. **O papel da heme-oxigenase-1 na modulação de células dendríticas levando à proteção da lesão por isquemia e reperfusão**. 2011. 20f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.
- AMUTHA, R. et al. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotype for high temperature stress. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 245-251, 2007.
- ANZALONE, S. Cortical cholinergic abnormalities contribute to the amnesic state induced by pyriithiamine-induced thiamine deficiency in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 5, p. 847-858, 2010.
- ARDEN, W. A. et al. Effects of ischemia and dimethyl sulfoxide on equine jejunal vascular resistance, oxygen consumption, intraluminal pressure, and potassium loss. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 3, p. 380-387, 1989.

- BÂ, A. Effects of thiamine deficiency on food intake and body weight increment in adult female and growing rats. **Behavioral Pharmacology**, v. 23, n. 5 and 6, p. 575-581, 2012.
- BÂ, A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, n. 7, p. 923-31, 2008.
- BAKER K. G. et al. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. **Neuroscience**, v. 91, n. 2, p. 429-438, 1999.
- BARRETO, M. A. C. B., BARRETO, F. Caracterização dos casos de beribéri entre indígenas no norte do Brasil. **SANARE**, v. 15, n. 02, p. 104-111, 2016.
- BENDER, David A. **Nutritional Biochemistry of the Vitamins**. 2 ed. New York: Cambridge University Press, 2003.
- BERNTSEN, S. et al. **Alcohol consumption and mortality in patients with mild Alzheimer's disease**: a prospective cohort study. *BMJ Open* 5: e007851, 2015.
- BETTENDORFF, L.; WINS, P. Mechanism of thiamine transport in neuroblastoma cells. Inhibition of a high affinity carrier by sodium channel activators and dependence of thiamine uptake on membrane potential and intracellular ATP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 20, p.14379-14385, 1994.
- BETTENDORFF, L.; WINS, P. **Biochemistry of thiamine and thiamine phosphate compounds**. vol. 1 ed. Oxford: Encyclopedia of biological chemistry, 2013.
- BLACKMORE, C. et al. Prevention of delirium in trauma patients: are we giving thiamine prophylaxis a fair chance? **Canadian Journal of Surgery**, v. 57, n. 2, p. 78-81, 2014.
- BLYTHE, L.L. et al. Intravenous use of dimethylsulfoxide (DMSO) in horses: clinical and physiologic effects. **Proceedings of Annual Convention of Association of Equine Practitioners**. v. 32, p. 441-446, 1986.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria Especial de Saúde indígena. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Consulta para

Vigilância Epidemiológica, Assistência e Atenção Nutricional dos Casos de Beribéri
Guia de consulta para Vigilância Epidemiológica, Assistência e Atenção Nutricional dos casos de Beribéri. Brasília. 2012, 66p.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Vet.** v. 76, n. 1, p. 61-90, 1986.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 519-529, 2009.

BUENO, K. O. **Déficit cognitivo espacial está relacionado com alteração na concentração do canal aniônico dependente de voltagem no tálamo de ratos deficientes em tiamina.** 2015. 113f. Tese. (Doutorado em Neurociências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

BUTTERWORTH, R F.; HEROUX, M. Effect of pyriithiamine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes. **Neurochemistry**, v. 52, p. 1079-1084, 1989.

BUTTERWORTH, R. F.; KRIL, J. J.; HARPER, C. G. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke–Korsakoff syndrome. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 17, n. 5, p. 1084-1088, 1993.

CALINGASAN, N. Y. et al. Novel neuritic clusters with accumulations of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 immunoreactivity in brain regions damaged by thiamine deficiency. **American Journal of Pathology**, v. 149, n. 3, p. 1063-1071, 1996.

CAIXETA. A. R. P. **Deficiência de tiamina e isolamento social afetam aspectos do comportamento motor e níveis centrais de GABA e glutamato.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação de Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

CERRONI, M. P. et al. Outbreak of Beriberi in an Indian Population of the Upper Amazon Region, Roraima State, Brazil, 2008. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1093-1097, 2010.

CHEN, J. et al. GluR6-containing KA receptor mediates the activation of p38 MAP kinase in rat hippocampal CA1 region during brain ischemia injury. **Hippocampus**. v. 19, p. 79-89, 2009.

CHIURCHIU, V.; ORLACCHIO, A.; MACCARRONE, M. Is modulation of oxidative stress an answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 7099380, 2016.

CHORNY, S. et al. Thiamine antagonists trigger p53-dependent apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells. **Scientific Report**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

CHU, C.T., et al. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 2060-2066, 2004.

CICCIA R. M.; LANGLAIS P. J. An examination of the synergistic interaction of the ethanol and thiamine deficiency in the development of neurological signs and long-term cognitive and memory impairments. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 24, n. 5, p. 622-634, 2000.

COOK, C. C.; HALLWOOD, P. M.; THOMSON A. D. B vitamin deficiency and neuropsychiatric syndromes in alcohol misuse. **Alcohol and Alcoholism**, v. 33, n. 4, p. 317-336, 1998.

CORDOVA, C. A. S.; LOCATELLI, C.; ASSUNÇÃO, L. S.; MATTEI, B.; MASCARELLO, A.; WINTER, E.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2025-2034, 2011.

CORDOVA, F. M. et al. In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.

CORDOVA, F. M.; RODRIGUES, A. L. S.; GIACOMELLI, M. B. O.; OLIVEIRA, C. S.; POSSER, T.; DUNKLEY, P. R.; LEAL, R. B. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Research**, v. 998, n. 1, p. 65-72, 2004.

CORDOVA, F.M. **Vias de sinalização celular no hipocampo envolvidas na resposta ao estresse produzida por chumbo e cádmio**. 2002. 116f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

CRUZ, J. S. et al. Thiamine deficiency in vitro accelerates A-type potassium current inactivation in cerebellar granule neurons. **Neuroscience**, v. 221, p. 108-114, 2012.

CUNHA, T. F. **Contribuição do estresse oxidativo para a ativação das vias NF – kB, FOXO e MAPK na atrofia muscular associada à insuficiência cardíaca: efeito do treinamento físico aeróbico**. 2014. 89f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, 2014.

DAY, E. et al. Thiamine for prevention and treatment of Wernicke - Korsakoff Syndrome in people who abuse alcohol. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, n. 7, p. 1-5, 2013.

DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; ASHRAF, Q.M.; MISHRA, O.P. Differential expression of apoptotic proteins following hypoxia-induced CREB phosphorylation in the cerebral cortex of newborn piglets. **Neurochemical Research**. v. 32, p. 1256-1263, 2007.

DERVAUX, A.; LAQUEILLE, X. Le traitement par thiamine (vitamin B1) dans l'alcoolodépendance. **La Presse Médicale**, v. 20, n. 10, p. 1-6, 2016.

FAIGLE R.; MOHME M.; LEVY, M. Dry beriberi mimicking Guillain-Barre syndrome as the first presenting sign of thiamine deficiency. **European Journal of Neurology**, v. 19, n. 2, p. 14-15, 2012.

FERNANDES, L. P. M. Thiamine deficiency, oxidative metabolic pathways and ethanol-induced neurotoxicity: how poor nutrition contributes to the alcoholic syndrome, as Marchiafava–Bignami disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 580-586, 2017.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, p. 1-18, 2015.

FOSTER, A.C.; KEMP, J. A. Glutamate-and GABA-based CNS therapeutics. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 6, n. 1, p. 7-17, 2006.

FREEMAN, G. B.; NIELSEN. P. E.; GIBSON, G. E. Effect of age on behavioral and enzymatic changes during thiamin deficiency. **Neurobiology of Aging**, v. 8, n. 5, p. 429-434, 1987.

GALVIN, R. et al. EFNS guidelines for diagnosis, therapy and prevention of Wernicke encephalopathy. **European Journal of Neurology**. v. 17, n. 12, p. 1408-1418, 2010.

GAO, X. et al. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 3, p. 943-55, 2008.

GIACALONE, M. et al. Rapid reversal of severe lactic acidosis after thiamine administration in critically ill adults: a report of 3 cases. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 1, p. 104-110, 2015.

GIBSON, G. E., ZHANG, H. Abnormalities in oxidative processes in non-neuronal tissues from patients with Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 3, n. 3, p. 329-338, 2001.

GIBSON, G. E.; ZHANG, H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. **Neurochemistry International**, v. 40, n. 6, p. 493-504, 2002.

GONG, Y. S. et al. Chronic Ethanol Consumption and Thiamine Deficiency Modulate β -Amyloid Peptide Level and Oxidative Stress in the Brain. **Alcohol and Alcoholism**, v. 52, n. 2, p. 159-164, 2016.

GRANT, E. R. et al. Protection against glutamate toxicity through inhibition of the p44/42 mitogen activated protein kinase pathway in neuronally differentiated P19 cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 62, p. 283-296, 2001.

GREENGARD, P. et al. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science**, v. 259, n. 5096, p. 780-785, 1993.

GUIMARÃES, L. A. M. et al. **Saúde Mental e Trabalho**. Dissertação (Dissertação em administração) – UGV. Rio de Janeiro, p. 45. 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HAZELL, A. S. et al. Mechanisms of neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy. **Metabolic Brain Disease**, v. 13, n. 2, p. 97-122, 1998.

HAZELL, A. S. Thiamine deficiency results in downregulation of the GLAST glutamate transporter in cultured astrocytes. **Glia**, v. 43, n. 2, p. 175-184, 2003.

HAZELL, A. S.; BUTTERWORTH, R. F.; HAKIM, A. M. Cerebral vulnerability is associated with selective increase in extracellular glutamate concentration in experimental thiamine deficiency. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 3, p. 1155-1158, 1993.

HAZELL, A. S.; BUTTERWORTH, R. F. Update of Cell Damage Mechanisms in Thiamine Deficiency: Focus on Oxidative Stress, Excitotoxicity and Inflammation. **Alcohol and Alcoholism**, v. 44, n. 2, p. 141–147, 2009.

HAZELL, A. S.; TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F. Mechanisms of neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy. **Metabolic Brain Disease**, v. 13, n. 2, p. 97-122, 1998.

INABA, H. et al. Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke–Korsakoff syndrome. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 12, p. 2425-2436, 2016.

IRLE, E.; MARKOWITSCH, H. J. Widespread neuroanatomical damage and learning deficits following chronic alcohol consumption or vitamin-B1 (thiamine) deficiency in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 9, n. 3, p. 277-294, 1983.

JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Introductory remarks: Dimethyl sulfoxide after twenty years. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 411, p. 13-17, 1983.

JENKINS, I. H. et al. Motor sequence learning: a study with positron emission tomography. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 3775-3790, 1994.

JIANG, C. et al. Dopaminergic Properties and Experimental Anti-Parkinsonian Effects of IPX750 in Rodent Models of Parkinson Disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 27, n. 2, 2004.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, p. 1911-2, 2002.

KE, Z.; GIBSON, G. E. Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 2, p. 361-369, 2004.

KERNS, J. C.; ARUNDEL, C.; CHAWLA, L. S. Thiamin deficiency in people with obesity. **Advances in Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 147-153, 2015.

KIM, D. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3713-3717, 2002.

KRIL, J. J. Neuropathology of thiamine deficiency disorders. **Metabolic Brain Disease**, v. 11, n. 1, p. 9-17, 1996.

LANGLAIS, P. J. et al. Diencephalic lesions, learning impairments, and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. **Behavioral Brain Research**, v. 48, n. 2, p. 177-185, 1992.

LANGLAIS, P. J.; SAVAGE, L. M. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. **Behavioral Brain Research**, v. 68, n. 1, p. 75-89, 1995.

LANGLAIS, P. J.; ZHANG, S.; SAVAGE, L. M. Neuropathology of thiamine deficiency: An update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. **Metabolic Brain Disease**, v. 11, n. 1, p. 19-37, 1997.

LATT, N.; DORE G. Thiamine in the treatment of Wernicke encephalopathy in patients with alcohol use disorders. **Internal Medicine Journal**, v. 44, n. 9, p. 911-915, 2014.

LEMOS, A. A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2. ed. São Paulo: Varela. v. 2. p. 547-553, 2006.

LEONZO, N. A propósito do Beribéri. **Revista Territórios e Fronteiras**, Cuiabá, v. 5, n. 2, p. 86-93, 2012.

LIU, D.; KE, Z.; LUO, J. Thiamine Deficiency and Neurodegeneration: the Interplay Among Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5440-5448, 2016.

MACHADO, M., et al. Polioencefalomalacia em ruminantes: aspectos etiológicos, clínicos e anatomopatológicos. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. v. 14, n. 28, p. 1 - 16.

MAGALHÃES, S. M. Beribéri: doença misteriosa no Brasil Oitocentista. **História Unisinos**, v. 18, n. 1, p. 158-169, 2014.

MAKARCHIKOV A.F., et al. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 1477-1488, 2003.

MANZETTI, S.; ZHANG, J.; SPOEL, D. Thiamin Function, Metabolism, Uptake, and Transport. **Biochemistry**, v. 53, n. 5, p. 821-835, 2014.

MANZO, L. Nutrition and alcohol neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 15, p. 555-565, 1994.

MARTIN, P. E. R.; SINGLETON, C. K.; HILLER, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Research and Health**, v. 27, n. 2, p. 134-142, 2003.

MAZZOLA V. Effects of Emotional Contexts on Cerebello-Thalamo-Cortical Activity during Action Observation. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-10, 2013.

MEAD, M. The Cambridge world history of human disease. **Medical History Cambridge**, Cambridge University Press, v. 39, n. 2, p. 606-612, 1995.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Rev Ass Med Brasil**. v. 45, v. 2, p. 181 - 8, 1999.

MKRTCHYAN, G. et al. Cellular thiamine status is coupled to function of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase. **Neurochemistry International**. v. 101, p. 2016.

MOLZ, Simone. **Estudo da morte celular induzida por glutamato e sua modulação por guanosina-5'-monofosfato em fatias de hipocampo de ratos**. 2003. 95f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Faculdade Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

MOUSSEAU, D. D.; RAO, V. L.; BUTTERWORTH, R. F. Alterations in serotonin parameters in brain on thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 3, p. 1113-1123, 1996.

MULHOLLAND, P. Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. **Cerebellum**, v. 5, n. 1, p. 55-63, 2006.

MUÑOZ, G. et al. Low concentrations of ethanol protect against synaptotoxicity induced by A β in hippocampal neurons. **Neurobiology of Aging**, v. 36, n. 2, p. 845-856, 2015.

NAGAI, H., et al. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. **Journal Biochemistry and Molecular Biology**. v. 40, p. 1-6, 2007.

NAKAGAWASAI, O. et al. Preventive effect of kami-untan-to on performance in the forced swimming test in thiamine-deficient mice: Relationship to functions of catecholaminergic neurons. **Behavioural Brain Research**, v. 177, n. 2, p. 315-32, 2007.

NARDONE, R. et al. Thiamine Deficiency Induced Neurochemical, Neuroanatomical, and Neuropsychological Alterations: A Reappraisal. **The Scientific World Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2013.

NAVARRO, D.; ZWINGMANN, C.; BUTTERWORTH, R. F. Impaired oxidation of branched-chain amino acids in the medial thalamus of thiamine-deficient rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 23, n. 4, p. 445-455, 2008.

NELSON, D. L. et al. **Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: WH Freeman, 2005.

NICHOLLS, D. G. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 2, p. 149-77, 2004.

ORLATO, D. **Efeitos do DMSO (dimetilsulfóxido), administrado por via intravenosa, sobre as funções renal e hepática, perfil hidrossalino e hemograma de cães sadios**. 2006. 52f. Dissertação Mestrado em cirurgia Veterinária - Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

PACAL, L.; KURICOVA, K.; KANKOVA, K. Evidence for altered thiamine metabolism in diabetes: is there a potential to oppose gluco and lipotoxicity by rational supplementation? **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 3, p. 288-295, 2014.

PANNUNZIO, P. et al. Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an in vitro model for the study of cell death mechanisms in Wernicke's encephalopathy. **Journal of Neuroscience Research**, v. 62, n. 2, p. 286-292, 2000.

PANTALEÃO C.; LUCHS A. Apoptose e modelos *in vivo* para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno. **Revendo Ciências Básicas**. v. 8, n. 4, p. 495 - 7.

PARK, L. C. et al. Mitochondrial impairment in the cerebellum of the patients with progressive supranuclear palsy. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, n. 5, p. 1028-1034, 2000.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.

PHENSY, A., et al. Antioxidant treatment in male mice prevents mitochondrial and synaptic changes in an nmda receptor dysfunction model of schizophrenia. **Disorders of the Nervous System**, v. 4, n. 4, p. 1 - 17, 2017.

PINTO, M.C.X.; RESENDE, R. R. Excitotoxicidade e doenças neurológicas. **Nanocell News**. v. 2, n. 4, p. 1 – 6, 2014.

PIRES, R. G. W. et al. Correlation between phosphorylation level of a hippocampal 86 kDa protein and extinction of a behaviour in a model of Wernicke – Korsakoff syndrome. **Behavioral Brain Research**, v.180, n. 1, p.102-106, 2007.

PITKIN, S., SAVAGE, L. M. Age-related vulnerability to diencephalic amnesia produced by thiamine deficiency: the role of time of insult. **Behavioral Brain Research**, v. 148, n. 2, p. 93-105, 2004.

POSSER, T.; DE AGUIAR, C. N. M.; GARCEZ, R.; ROSSI, F.; OLIVEIRA, C.; TRENTIN, A.; MOURA NETO, V.; LEAL, R. Exposure of C6 Glioma Cells to Pb(II) Increases the Phosphorylation of p38MAPK and JNK1/2 but Not of ERK1/2. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 6, p. 407-414, 2007.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

RAIVICH, G.; BEHRENS, A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. **Progress in Neurobiology**. v. 78, p. 347-363, 2006.

RAMAKRISHNA, T. Vitamins and brain development. **Physiological Research**, v. 48, n. 3, p. 175-87, 1999.

RAMIREZ, D. R.; BUZZETTI, R. A.; SAVAGE, L. M. The role of the GABA (A) agonist muscimol on memory performance: reward contingencies determine the nature of the deficit. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 84, n. 3, p. 184-191, 2005.

RAO, K. V. R. et al. Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. **Glia**. v. 58, p. 1490-1499, 2010.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RESENDE, L. S. **Parâmetros comportamentais e neuroquímicos em modelo experimental de deficiência grave de tiamina**. 2012. Dissertação (Dissertação em neurociências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2012.

RIahi A. et al. Acute beriberi neuropathy mimicking Guillain-Barré syndrome after a strict vegetarian diet. **Iranian Journal of Neurology**, v. 16, n. 2, p. 100-102, 2017.

RIBEIRO, A. M.; PEREIRA, S. R. C. Animal models for evaluation of behavioral and molecular neurobiological changes with emphasis on spatial memory and cholinergic system impairments in chronic alcohol abuse. **Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 50, n. 3, p. 183-195. 1998.

ROLAND, J. J. et al. Increasing hippocampal acetylcholine levels enhance behavioral performance in an animal model of diencephalic amnesia. **Brain Research**, v. 1234, p. 116-127, 2008.

ROTH, J.A. Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganese and parkinsonism. **Neuromolecular Medicine**. v. 11, p. 281-296, 2009.

ROSE, R.J., HODGSON, D. R. **Manual of equine practice**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, p. 532, 1993.

ROSENBAUM, E. E., HERSCHLER, R. J., JACOB, S. W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal of the American Medical Association**, v. 192, n. 4, p. 309-313, 1965.

SAGACH, V. F. et al. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage *in vitro* and *in vivo*: a comparison with vitamin E. **Pharmacological Research**, v. 45, n. 6, p. 435-439, 2002.

SARKAR, S. et al. Brain endothelial dysfunction following pyriethamine induced thiamine deficiency in the rat. **Neurotoxicology Journal**, v. 57, p. 298-309, 2016.

SAVAGE, L. M.; HALL, J. M.; RESENDE, L. S. Translational Rodent Models of Korsakoff Syndrome Reveal the Critical Neuroanatomical Substrates of Memory Dysfunction and Recovery. **Neuropsychology Review**, v. 22, n. 2, p. 195-209, 2012.

SAVAGE, L. M.; PITKIN, S. R.; KNITOWSKI, K. M. Rats exposed to acute pyriethamine-induced thiamine deficiency are more sensitive to the amnesic effects of scopolamine and MK-801: examination of working memory, response selection and reinforcement contingencies. **Behavioral Brain Research**, v. 104, n. 2, p. 13-26, 1999.

SCHWAB, C.; STEELE, J. C.; MCGEER, P.L. Neurofibrillary tangles of Guam Parkinson dementia are associated with reactive microglia and complement proteins. **Brain Research**, v. 707, n. 2, p. 196-205, 1996.

SECHI G.; SERRA A. Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. **Lancet Neurology**, v. 6, n. 5, p. 442-455, 2007.

SEGER, R.; KREBS, E.G. The MAPK signaling cascade. **FASEB Journal**. v.9, n. 9, p.726- 735,1995.

SHELINE, C.T.; WEI, L. Free radical-mediated neurotoxicity may be caused by inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. **Neuroscience**, v. 140, n. 1, p. 235–46, jun. 2006.

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant Effects of Plant Polyphenols: A Case Study of a Polyphenolrich Extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S. D. **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**. Science Publishers: Enfield, p. 275 - 293, 2010.

SMITH, Bradford P. 2 ed. **Medicina Interna de Grandes Animais**. São Paulo: Manole, 2006.

SON, Y., et al. Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases. **Methods Enzymol.** v. 528, p. 27 – 48, 2013.

STONE, R. W. Clinical updates on the use of dimethyl silfoxide. **Canine Practice**. v. 18, n. 8, p. 16-19, 1993.

STROH, C.; MEYER, F.; MANGER, T.; Beriberi, a Severe Complication after Metabolic Surgery: Review of the Literature. **Obesity Facts**, v. 7, n. 4, p. 246-252, 2014.

SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. **Neuroscience**. v. 138, p. 1055-1065, 2006.

SULLIVAN, E. V.; FAMA, R. Wernicke's encephalopathy and Korsakoff's syndrome revisited. **Neuropsychology Review**, v. 22, n. 2, p. 69-71, 2012.

SUZUKI, K. et al. High-dose thiamine prevents brain lesions and prolongs survival of *Slc19a3*-deficient mice. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. 855 - 857, 2017.

TELES, Y. C. F. *et al.* O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. **J Health Sci Inst.** v. 33, n.1, p. 89 - 93, 2015.

THOMSON, A. D. et al. Wernicke's encephalopathy revisited: translation of the case history section of the original manuscript by Carl Wernicke 'Lehrbuch der Gehirnkrankeheiten für Aerzte und Studierende' (1881) with a commentary. **Alcohol and Alcoholism**, v. 43, n. 2, p.174-179, 2008.

THOMSON, A. D.; GUERRINI, I.; MARSHALL, E. J. The evolution and treatment of Korsakoff's syndrome: out of sight, out of mind? **Neuropsychology Review**, v. 22, n. 2, p. 81-92, 2012.

TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F. Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 893, n. 1, p. 404-411, 1999.

TRONCOSO, J. C. Model of Wernicke's Encephalopathy. **Archives of Neurology**, v. 38, n. 6, p. 176-185. 1981.

VALLI, L. G; SOBRINHO, J. A. Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**. v. 18, n.1, p. 58 - 67, 2014.

VAZQUEZ, A. J. H. et al. Thiamine Deprivation Produces a Liver ATP Deficit and Metabolic and Genomic Effects in Mice: Findings Are Parallel to Those of Biotin Deficiency and Have Implications for Energy Disorders. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 9, n. 6, p. 287-299, 2016.

VETRENO, R. P. et al. Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Brain Research**, v. 1436, p. 178-192, 2012.

VETRENO, R. P.; ANZALONE, S. J.; SAVAGE, L. M. Impaired, spared, and enhanced ACh efflux across the hippocampus and striatum in diencephalic amnesia is dependent on task demands. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 1, p. 237-244, 2008.

VETRENO, R. P.; KLINTSOVA, A.; SAVAGE, L. M. Stage-dependent alterations of progenitor cell proliferation and neurogenesis in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome. **Brain Research**. v. 1391, p. 132-146, 2011.

VIGIL, F. A. et al. Déficits de memória espacial e alterações metabólito serotoninérgica tálamo em ratos deficientes de tiamina. **Behavioral Brain Research**, v. 210, n. 1 p. 140-142, 2010.

WANG, X., et al. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 6, p. 1272-1277, 2002.

WERNICKE, Carl. Die akute hamorrhagische Polioencephalitis superior. **Lehrbuch der Gehirnkrankheiten für Ärzte und Studierende**, p. 229-242, 1881.

WITT, E. D. Neuroanatomical consequences of thiamine deficiency: a comparative analysis. **Alcohol and Alcoholism**, v. 20, n. 2, p. 201-221, 1985.

WOOLEY, J. A. Characteristics of thiamin and its relevance to the management of heart failure. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 23, n. 5, p. 487-493, 2008.

WU, T. W. et al. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. **Biochemical Cell Biology**, v. 68, n. 10, p. 1189-1194, 1990.

WU, T. W. et al. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. **Hepatology**, v. 13, n. 3, p. 575 - 580, 1991.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v.21, p.381-406, 2001.

ZEPEDA, R. C. et al. Glutamate-dependent transcriptional regulation in bergmann glia cells: involvement of p38 MAP kinase. **Neurochemical Research**. v. 33, n. 7, p. 1277-1285, 2008.

ZHANG, S.; FU, J.; ZHOU, Z. *In vitro* effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. **Toxicology in Vitro**. v. 18, p. 71-77, 2004.

ZHANG, Q. G., et al. NMDA receptor/L-VGCC-dependent expression and AMPA/KA receptor-dependent activation of c-Jun induced by cerebral ischemia in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**. v. 398, p. 268-273, 2006.

ZHANG, Q. P. et al. Thiamine deficiency increases β -secretase activity and accumulation of β -amyloid peptides. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 53, p. 42-53, 2011.

ZHAO N. et al. Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. **Neurobiology of Disease**, v. 29, n. 2, p. 176-185, 2008.

ZUBARAN, C. et al. Aspectos clínicos e neuropatológicos da síndrome de Wernicke-Korsakoff. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 6, p. 602-608, 1996.