



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

**KETREN CARVALHO GOMES**

**ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA A DEFICIÊNCIA DE TIAMINA**

**ARAGUAÍNA - TO  
2020**

**KETREN CARVALHO GOMES**

**ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA A DEFICIÊNCIA DE TIAMINA**

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  
2020

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

---

G633e Gomes, Ketren Carvalho.  
Estratégias terapêuticas para a deficiência de tiamina. / Ketren Carvalho  
Gomes. – Araguaína, TO, 2020.  
74 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, 2020.  
Orientador: Fabiano Mendes de Cordova

1. Neurodegeneração. 2. Neuroproteção. 3. Piritiamina. 4. Saúde Pública. 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).**

KETREN CARVALHO GOMES

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA A DEFICIÊNCIA DE TIAMINA

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 17/03/2020

Banca examinadora:

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

  
Profa. Dra. Helcilcia Dias Santos, Examinadora, UFT

  
Profa. Dra. Clarissa Amorim Silva de Cordova, Examinadora, UFT

Dedico este trabalho à minha família, minha base, minha gratidão pelo apoio, incentivo, confiança e amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, pela oportunidade em ingressar no mestrado, por fortalecer a minha fé nessa eterna caminhada da vida, envolta de muitos obstáculos e superações.

Aos meus pais José Alves Gomes (*in memoriam*) e minha mãe Guiomar Carvalho Silva Gomes, a vocês minha eterna gratidão. Agradeço o incentivo, apoio, proteção, confiança, por acreditarem em mim, e por todo amor. Mãe obrigada por cuidar do meu filho, nas minhas ausências, e por todo incentivo, por acreditar e me apoiar. Pai, você ficou todo orgulhoso quando falei que tinha sido aprovada no mestrado, mas infelizmente Deus o chamou antes de ver minha conclusão.

Ao meu filho Issac José Teixeira Gomes, por me permitir ser mãe, profissional e estudante ao mesmo tempo. Perdoa-me, pelos momentos de ausências, mas você foi compreensivo em ver a mamãe estudando e se sentava ao meu lado, me observava digitar a qualificação, defesa e montagens das apresentações. Saiba que seu jeitinho curioso e questionador, me fazia entender que a melhor educação é o bom exemplo.

Ao meu marido, pela compreensão, por acreditar em mim. Obrigada pelo companheirismo e apoiar na realização desse sonho, que era ingressar no mestrado.

Aos meus irmãos Kellen e Elves por acreditarem em mim, sei que a torcida e orações são constantes.

Ao meu orientador, professor Dr. Fabiano Mendes de Cordova, agradeço pela oportunidade, dedicação, pelos ensinamentos, por ser essa pessoa tão sábia e detentor de tanta humildade e acima de tudo o parabênzo pela generosidade em compartilhar conhecimento. Agradeço o incentivo, confiança, por ter aceitado ser meu orientador, porque para mim foi uma honra. Saibas que além de exemplo profissional, és também um exemplo de ser humano: generoso, justo e sensato. Entendi por que todos, que o tinham como orientador, o chamavam de “pai”, pois você respeita, incentiva e acredita nas pessoas. Professor Fabiano, a você, minha eterna gratidão.

Agradeço ao grupo “Top” de pesquisa do Laboratório de Patologia Experimental da UFT: Helen, Suiane e Francisco, obrigada pelo apoio, companheirismo e incentivo. Foi um prazer conhecer e conviver com cada um de vocês.

Agradeço à minha chefia que oportunizaram meu ingresso ao mestrado, Eduardo de Freitas, Hedisônia Brilhante e Bruno Medrado, obrigada pelo apoio, incentivo e por acreditarem em mim.

Aos meus colegas do Centro de Controle de Zoonoses, pelo incentivo, compreensão, por não deixarem a rotina de serviço ser comprometida pelas minhas ausências quando necessárias para cursar o mestrado (aulas e experimentos). A vocês minha gratidão: José Nilson, Admilson, Anderson e Mariana. E as minhas amigas Crhistiane, Shisley, Brenna, Lidiane, Laiane e Rosângela, agradeço o apoio, a confiança, a torcida e o eterno carinho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, agradeço a dedicação e incentivo. A contribuição generosa de cada professor representa um bem precioso, que ninguém pode tirar de nós: o conhecimento.

Aos meus colegas de mestrado, pelo companheirismo, apoio e incentivo. Saibam que estarei sempre à disposição. Foi um prazer fazer parte dessa turma 2018.1, fica a saudade, e a gratidão.

Agradeço o esforço e dedicação de cada um que contribuiu para que esse Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos se tornasse uma realidade, dando assim oportunidade à uma ampla categoria profissional de acesso a uma Pós que atenda a nossa realidade e necessidade profissional. A todos os envolvidos o meu respeito e agradecimento, e que continuem contribuindo, acreditando no programa. Gratidão é o que me resume.

## RESUMO

Sequelas neurológicas após episódios de deficiência de tiamina (DT) são comuns e caracterizam um problema de saúde pública. Estratégias terapêuticas têm sido investigadas, visando atenuar os efeitos deletérios do distúrbio. Este estudo objetivou avaliar o potencial terapêutico do uso concomitante de tiamina, antioxidante e anti-inflamatório, na atenuação dos efeitos neurológicos em camundongos com deficiência de tiamina, bem como caracterizar as lesões e os mecanismos celulares associados à DT. O modelo de deficiência dietética em associação com injeções do antagonista de tiamina, piritiamina, foi utilizado no estudo. Os camundongos foram separados em vinte grupos (n = 6): oito grupos controles e doze grupos deficientes. Os grupos foram divididos em dois protocolos de indução de deficiência seguidos de promoção de recuperação: protocolo A, com episódio único de indução de DT por 9 dias, seguido por período de recuperação de 7 dias, e protocolo B, com dois ciclos consecutivos de indução de DT (9 dias) seguido por período de tratamento de recuperação com as substâncias neuroprotetoras (7 dias). Após os períodos dos protocolos A e B, foram realizadas as análises. Na indução, grupos controle receberam ração padrão AIN-93M e grupos deficientes receberam ração deficiente em tiamina AIN-93DT e piritiamina (0,5 mg/kg, grupos Ptd); na recuperação, grupos controle e deficientes receberam ração AIN-93M e injeções i.p. de salina (grupo Cont, NaCl 0,9%), tiamina (grupos Tm e Ptd+Tm, 100 mg/kg), Trolox (grupos Tr e Ptd+Tr, 1 mg/kg), dimetilsulfóxido (grupos Dmso e Ptd+Dmso, 1 ml/kg) ou associações (grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+Dmso). Após os tratamentos, foram testados em labirinto aquático de Morris (LAM), campo aberto e rotarod e eutanasiados para avaliação de viabilidade celular no tecido nervoso (teste de redução do TTC), modulação das vias das MAPKs e histopatológica. Os tratamentos de recuperação com as substâncias neuroprotetoras amenizaram parcialmente as alterações comportamentais. A administração associada de tiamina com Trolox ou com DMSO, na deficiência recorrente, reverteu totalmente a queda de viabilidade celular. A redução das lesões morfológicas foi mais intensa nos animais dos grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+Dmso, com apenas raros neurônios vacuolizados e preservação da população neuronal no tálamo. Em paralelo, os tratamentos de recuperação promoveram aumento da fosforilação de ERK1/2 no córtex cerebral e tálamo. Os dados sugerem que as substâncias testadas (DMSO e Trolox) apresentam potencial neuroprotetor, como coadjuvantes à tiamina no tratamento da deficiência, diminuindo a possibilidade de sequelas neurológicas através da modulação de importantes vias metabólicas celulares.

**Palavras-Chave:** Beribéri. Encefalopatia de Wernicke. Neurodegeneração. Neuroproteção. Trolox. Dimetilsulfóxido.



## ABSTRACT

Neurological sequel following episodes of thiamine deficiency (TD) are common and characterize a public health problem. Therapeutic strategies have been investigated to mitigate the deleterious effects of the disorder. This study aimed to evaluate the therapeutic potential of concomitant use of thiamine, antioxidant and anti-inflammatory agents in attenuating neurological effects in deficient mice, as well as to characterize the lesions and cellular mechanisms associated with TD. The dietary deficiency model in association with injections of thiamine antagonist, pyriethiamine, was used in the study. The mice were separated into twenty groups (n = 6): eight control groups and twelve deficient groups. The groups were divided into two TD protocols followed by recovery promotion: protocol A, with a single episode of TD induction for 9 days, followed by 7 day recovery period, and protocol B, with two consecutive cycles of TD induction (9 days) followed by recovery treatment periods with neuroprotective substances (7 days). After the periods of protocols A and B, the analyzes were performed. In induction, control groups received AIN-93M standard feed and deficient groups received AIN-93TD deficient feed and pyriethiamine (Ptd groups, 0.5 mg/kg); on recovery, control e deficient groups received AIN-93M feed and i.p. saline injections (Cont group, 0.9% NaCl), thiamine (Tm and Ptd+Tm groups, 100 mg/kg), Trolox (Tr and Ptd+Tr groups, 1 mg/kg), dimethylsulfoxide (Dms0 and Ptd+Dms0 groups, 1 ml/kg) or combinations (Ptd+Tm+Tr and Ptd+Tm+Dms0 groups). After the treatments, they were tested in Morris water maze (MWM), open field and rotarod and euthanized to assess cell viability in nervous tissue (TTC reduction test), modulation of MAPK pathways, and histopathology. Recovery treatments with neuroprotective substances partially alleviated behavioral changes. The associated administration of thiamine with Trolox or with DMSO, in recurrent deficiency, completely reversed the decrease in cell viability. The reduction in morphological lesions was more intense in the animals of the Ptd+Tm+Tr and Ptd+Tm+Dms0 groups, with only rare vacuolated neurons and preservation of the neuronal population in the thalamus. In parallel, the recovery treatments promoted increased phosphorylation of ERK1/2 in the cerebral cortex and thalamus. The data suggest that the tested substances (DMSO and Trolox) have neuroprotective potential, as adjuvants to thiamine in the treatment of deficiency, decreasing the possibility of neurological sequelae through the modulation of important cellular metabolic pathways.

**Keywords:** Beriberi. Wernicke's encephalopathy. Neurodegeneration. Neuroprotection. Trolox. Dimethyl sulfoxide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química da tiamina (vitamina B1).....	16
Figura 2 -	Vias de sinalização das MAPKs.....	21
Figura 3 -	Número de casos de beribéri notificados no município de Araguaína-TO, 2012 a 2016.....	25
Figura 4 -	Delineamento experimental do modelo de deficiência de tiamina em insulto agudo único ou repetido, e avaliação da eficácia de substâncias neuroprotetoras.....	33
Figura 5 -	Aparatos para testes comportamentais. (A) Rotarod e (B) Arena tipo campo aberto.....	34
Figura 6 -	Piscina circular com plataforma submersa para teste do labirinto aquático de Morris .....	34
Figura 7 -	Ganho de peso corporal dos camundongos após um episódio de deficiência de tiamina e tratamentos de recuperação (protocolo A).....	39
Figura 8 -	Ganho de peso corporal dos camundongos após dois episódios de deficiência de tiamina e tratamentos de recuperação (protocolo B).....	40
Figura 9 -	Avaliação em campo aberto de camundongos após um episódio de DT e tratamentos de recuperação (protocolo A).....	41
Figura 10 -	Avaliação em campo aberto de camundongos após dois episódios de DT e tratamentos de recuperação (protocolo B).....	42
Figura 11 -	Teste de coordenação motora do rotarod em camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação.....	43
Figura 12 -	Teste de memória espacial em labirinto aquático de Morris com camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação.....	44
Figura 13 -	Viabilidade celular no encéfalo de camundongos deficientes em tiamina, após um episódio de DT seguido de tratamentos de recuperação (protocolo A).....	45
Figura 14 -	Viabilidade celular no encéfalo de camundongos deficientes em tiamina, após dois episódios de DT seguidos de tratamentos de recuperação (protocolo B).....	46
Figura 15 -	Histopatologia do tálamo de camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação.....	47

Figura 16 -	Avaliação do escore médio de lesões (EML) no tálamo de camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação no protocolo A...	48
Figura 17 -	Quantificação da população celular neuronal no tálamo de camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação no protocolo B...	49
Figura 18 -	Efeitos da deficiência de tiamina sobre a fosforilação de ERK 1/2, após tratamento de recuperação no protocolo A.....	51
Figura 19 -	Efeitos da deficiência de tiamina sobre a fosforilação de ERK 1/2, após tratamento de recuperação no protocolo B.....	53
Quadro 1 -	Evolução do número de casos confirmados de beribéri, Brasil 2006 a 2014.....	24
Quadro 2 -	Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos do modelo de Deficiência de tiamina.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN-93DT	American Institute of Nutrition, versão 1993, ração deficiente de tiamina
AIN-93M	American Institute of Nutrition, versão 1993, ração padrão manutenção
ANOVA	Análise de variância
ASK1	Cinase reguladora de sinal apoptótico
ATP	Trifosfato de adenosina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPM	Campo de pequena magnificação
CGM	Campo de grande magnificação
Cont	Grupo controle
DLK	Cinase zipper de dupla leucina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DAB	Diaminobenzidina
DT	Deficiência de tiamina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EML	Escore médio de lesões
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Proteínas cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EW	Encefalopatia de Wernicke
GABA	Gama-aminobutírico
GLAST	Transportadores de glutamato de alta afinidade
HE	Hematoxilina e eosina
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N <sup>2</sup> -2 etanosulfônico
HSP	Proteína de choque térmico
i.p.	Injeção intraperitoneal
JNK1/2	Proteínas cinases c-Jun NH2-terminal 1 e 2
kDa	Quilodalton
LAM	Labirinto aquático de Morris
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MAPKK	Cinase da proteína cinase ativada por mitógenos
MAPKKK	Cinase de cinase da proteína cinase ativada por mitógenos
MLK3	Cinase 3 de linhagem mista
Mos	Moloney sarcoma oncogene
NE	Nordeste
NW	Noroeste
OMS	Organização Mundial da Saúde

p38 <sup>MAPK</sup>	Proteínas cinases ativadas por mitógenos de 38 quilodaltos
PKC	Proteína cinase C
pH	Potencial hidrogeniônico
Ptd	Grupo deficiente em piriamina
Raf	Proteínas cinases específicas para Ser/Thr
Rec	Recuperação
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliácridamida com dodecilsulfato de sódio
SE	Sudeste
SNC	Sistema nervoso central
SW	Sudoeste
SWK	Síndrome de Wernicke Korsakoff
TAK	Cinase ativada por TGF- $\beta$
TDP	Tiamina difosfato
Tm	Grupo tiamina
Tp12	Progressão de tumor locus-2
TPM	Tiamina monofosfato
TPP	Pirofosfato de tiamina
Tr	Grupo Trolox
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFT	Universidade Federal do Tocantins
VC	Violeta de cresila

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Funções biológicas da tiamina.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Deficiência da tiamina.....</b>	<b>18</b>
2.2.1	Doenças causadas pela deficiência de tiamina.....	23
2.2.1.1	<i>Beribéri.....</i>	23
2.2.1.2	<i>Encefalopatia de Wernicke e Síndrome de Wernicke-Korsakoff.....</i>	25
2.2.2	Tratamento das doenças relacionadas à deficiência de tiamina.....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Tratamentos <i>in vivo</i> – Modelo de deficiência de tiamina.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise comportamental.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise histopatológica.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5</b>	<b>Processamento das amostras e Western blot.....</b>	<b>37</b>
<b>4.6</b>	<b>Determinação de viabilidade celular.....</b>	<b>38</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Ganho de peso corporal.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise comportamental.....</b>	<b>40</b>
<b>5.3</b>	<b>Viabilidade celular.....</b>	<b>44</b>
<b>5.4</b>	<b>Histopatologia.....</b>	<b>46</b>

<b>5.5</b>	<b>Western blot</b> .....	49
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	59
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
	<b>ANEXOS</b> .....	73
	<b>Anexo 1.</b> Formulação da ração AIN-93M modificada - Deficiente de tiamina.....	73
	<b>Anexo 2.</b> Formulação da ração AIN-93M.....	74

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças neurológicas são bastante variadas (ZACHARY, 2009) e de grande impacto em saúde pública (ABDOU; HAZELL, 2015). Dentre os distúrbios do sistema nervoso central (SNC), destacam-se os desencadeados por deficiência de tiamina (DT), como o beribéri, a encefalopatia de Wernicke (EW) e a síndrome de Wernicke-Korsakoff (KUMAR, 2010). A DT tem sido descrita em regiões do Brasil envolvendo humanos na forma de surtos, e associada principalmente às inadequações nutricionais (CERRONI et al., 2010; PADILHA et al., 2011; BRASIL, 2019).

As regiões do SNC envolvidas na DT são amplas, sendo afetadas desde áreas corticais até regiões profundas como mesencéfalo e tálamo (KUMAR, 2010; VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). Nestes locais, tipicamente há degeneração e necrose neuronal, com envolvimento de alterações astrocitárias e inflamatórias (KUMAR, 2010; VETRENO et al., 2012; ABDOU; HAZELL, 2015).

Em roedores de laboratório, ratos e camundongos utilizados em modelos experimentais de DT, a patologia largamente mimetiza o distúrbio que acomete o humano. As lesões nestes animais normalmente são encontradas no tálamo, cerebelo, substância cinzenta periaquedutal e córtex cerebral (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). Diante da variabilidade de regiões encefálicas relatadas por diversos estudos, e das diferentes formas de apresentação das doenças relacionadas à DT, as manifestações clínicas e os distúrbios funcionais são muito variados.

Vários possíveis mecanismos têm sido propostos para o desencadeamento da neuropatologia associada à DT: alterações no metabolismo de neurotransmissores, alterações na utilização de glicose pelos neurônios, estresse oxidativo, acidose láctica e diminuição do pH encefálico, apoptose, alterações hemodinâmicas encefálicas, processos inflamatórios e excitotoxicidade (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). Entretanto, o estresse oxidativo e a inflamação têm sido considerados os mecanismos primários no processo (VETRENO et al., 2012; ABDOU; HAZELL, 2015).

Substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias podem ter potencial para serem usadas como adjuvantes na terapia da DT, com a finalidade de amenizar os efeitos deletérios neurodegenerativos, como possíveis estratégias de neuroproteção, a partir de determinadas substâncias como o trolox e dimetilsulfóxido (DMSO).

Atualmente, o tratamento da DT é baseado na administração (oral, intramuscular e intravenosa) da vitamina B1, 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, porém 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).

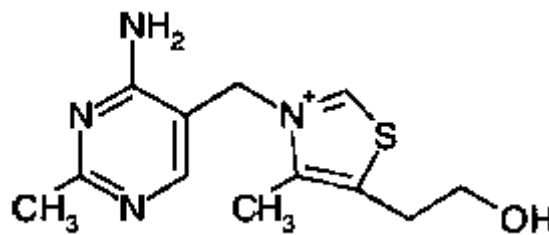
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Funções biológicas da tiamina

A tiamina 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).

A tiamina é uma vitamina hidrossolúvel que pertence ao complexo B (vitamina B1). É um composto dicíclico com anéis de tiazole e aminopirimidina, unidos por uma ponte de metileno (Figura 1). Há uma cadeia lateral de álcool no anel de tiazole e, na ativação da tiamina ao seu derivado cofator ativo, esta é esterificada com pirofosfato (BROWN, 2014). A tiamina possui papel central no metabolismo do tecido nervoso (BUTTERWORTH, 2009).

**Figura 1** - Estrutura química da tiamina (vitamina B1).



Fonte: Moreschi, 2006.

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).

A vitamina B1 é encontrada em quantidades relativamente pequenas em uma ampla variedade de alimentos. São consideradas fontes ricas desta vitamina as leveduras, farelo de trigo, cereais integrais e castanhas (VANNUCCHI; CUNHA, 2009; INSEL et al., 2007; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003). Hortaliças, frutas, ovos, carne de frango, carneiro e boi são fontes intermediárias, enquanto o leite contém quantidades relativamente baixas de tiamina (VANNUCCHI; CUNHA, 2009; BIANCHINI-PONTUSCHKA, 2003). No entanto, por ser uma das vitaminas do complexo B mais sensíveis à temperatura, podem ocorrer perdas durante

o processamento térmico de alimentos (PRIORI et al., 2016; OLIVEIRA, 2014; BALL, 2006; COULTATE, 1996).

Um aspecto a ser considerado é a existência de substâncias com atividade anti-tiamina, as quais 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) (BRASIL, 2012).

A tiamina dietética está principalmente na forma de derivados de fosfato e, antes da absorção, estes são convertidos em tiamina livre por fosfatases intestinais. Embora os requisitos normais para a tiamina em humanos possam ser atendidos por uma ingestão diária de 1-2 mg (ANDERSON; VICKERY; NICOL, 1986), não há evidências de efeitos adversos de doses farmacológicas muito maiores, e esta é uma consideração importante no fornecimento de suplementação para pacientes com defeitos na biodisponibilidade do cofator ativo (BROWN, 2014).

A absorção da tiamina ocorre por difusão e transporte ativo no jejuno-íleo e se fosforila na parede intestinal em pirofosfato de tiamina (TPP), forma ativa e cofator de importantes complexos enzimáticos. Atua como coenzima no metabolismo dos carboidratos e aminoácidos, sendo essencial nas reações que produzem energia da glicose e que convertem a glicose em gordura para armazenamento nos tecidos (MORESCHI, 2006).

O estoque de tiamina não é grande e ocorre em vários órgãos, sendo que metade do teor se encontra nos músculos esqueléticos, seguido de fígado, coração, rins e cérebro. A maior parte de tiamina estocada, aproximadamente 80%, apresenta-se na forma de pirofosfato de tiamina e o excesso é rapidamente excretado pela urina e, em pequenas quantidades pela bile (MORESCHI, 2006).

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.

A tiamina possui um papel chave na manutenção da função celular normal e, devido ao seu alto metabolismo oxidativo, o SNC é particularmente vulnerável às deficiências da vitamina. A deficiência de tiamina resulta em disfunção de vias enzimáticas celulares relacionadas ao metabolismo energético, que são cruciais para as atividades e funções metabólicas da célula (BUTTERWORTH, 1993; BUTTERWORTH; KRIL; HARPER, 1993; SHEU et al., 1998).

A tiamina possui papel central no metabolismo do tecido nervoso (MULHOLLAND, 2006; BUTTERWORTH, 2009). É cofator para várias enzimas envolvidas principalmente no

catabolismo de carboidratos (piruvato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e transcetolase) e de aminoácidos de cadeia ramificada (complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada), que são importantes para a biossíntese de uma série de constituintes celulares, incluindo neurotransmissores (HAAS, 1988), produção de equivalentes redutores utilizados na defesa ao estresse oxidante (VETRENO et al., 2012) e cofator criticamente importante para geração de ATP mitocondrial via ciclo do ácido tricarboxílico (SUZUKI et al., 2017). Além disso, a tiamina é essencial para o bom funcionamento das membranas axoplasmáticas, mitocondriais e sinaptossomais, e atua contra agentes indutores de citotoxicidade e repara membranas localmente (BÂ, 2008). Também intervém na transmissão sináptica e atua na diferenciação celular, na formação de sinapses, no crescimento axonal e na mielinogênese (HAAS, 1988; BÂ, 2005, 2008; KUMAR, 2010).

## 2.2 Deficiência de tiamina

Deficiências evidentes de vitaminas são raras em países desenvolvidos, devido ao suprimento alimentar generoso, variado e barato, à fortificação alimentar e ao uso de suplementos (KUMAR, 2010; ATTIAS et al., 2012; RUSSELL; SUTER, 2016). Entretanto, diversas deficiências nutricionais poderão surgir em indivíduos pertencentes à algumas classes de risco. Humanos cronicamente doentes, alcoolistas e pacientes após cirurgia de *by-pass* gástrico, se encontram em alto risco para desenvolvimento de múltiplas deficiências nutricionais (KUMAR, 2010; RUSSELL; SUTER, 2016). Além disso, as deficiências subclínicas de vitaminas, como as diagnosticadas por exames laboratoriais, são bastante comuns na população normal, principalmente na faixa etária geriátrica (RUSSELL; SUTER, 2016).

A DT não é considerada rara, particularmente em países em desenvolvimento, no contexto da má nutrição generalizada (ATTIAS et al., 2012). Além disso, são também fatores associados à DT: vômitos recorrentes, cirurgia gástrica, alcoolismo, dietas de restrição, aumento da demanda com estado nutricional marginal e senilidade (MARQUES, 2004; PITKIN; SAVAGE, 2004; CHAVES et al., 2007; KUMAR, 2007, 2010; TOREZAN, 2013; LU et al., 2015). A necessidade diária de tiamina é de 1,1 e 1,2 mg/dia para adolescentes e adultos do sexo feminino e masculino, respectivamente, e de 1,4 e 1,5 mg/dia para gestantes e nutrizes, respectivamente (BRASIL, 2012).

A DT tem relação firmemente estabelecida com doença neurológica (ZACHARY, 2009; ABDOU; HAZELL, 2015). Devido ao seu alto metabolismo oxidativo, o SNC é particularmente vulnerável às deficiências da vitamina (BUTTERWORTH; KRIL; HARPER, 1993).

As lesões no SNC induzidas pela DT são muito amplas e afetam diferentes estruturas do SNC (KUMAR, 2010; VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). Entretanto, estudos histopatológicos relacionam normalmente o envolvimento de degeneração e necrose neuronal, *status spongiosus*, hemorragias multifocais, degeneração de mielina, tumefação astrocítica, infiltração de células Gitter, infiltrado inflamatório e hipertrofia e hiperplasia de células endoteliais (KUMAR, 2010; VETRENO et al., 2012). Nos humanos, as áreas frequentemente afetadas são os corpos mamilares, hipotálamo e tálamo, verme cerebelar superior, tronco encefálico (incluindo a substância cinzenta periaquedutal, tegmento pontino e formação reticular do mesencéfalo), paredes do terceiro ventrículo e assoalho do quarto ventrículo (VICTOR, 1971; KRIL, 1996). Pode haver envolvimento dos núcleos dos terceiro e sexto nervos cranianos, núcleos vestibulares, *locus ceruleus* e, raramente, núcleos vagais. Também é descrito o envolvimento do colículo, fórnix, região septal, hipocampo e córtex cerebral (KUMAR, 2010).

Bioquímica e metabolicamente, a DT provoca a diminuição da piruvato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e transcetolase. Esta última é uma enzima da via das pentoses que é responsável por converter a glicose 6-fosfato em ribose 5-fosfato produzindo equivalente redutor de NAPH (MARTIN et al., 2003). A piruvato desidrogenase converte o piruvato em acetil coenzima A, a qual alimenta o ciclo do ácido cítrico. Consequentemente, a redução da atividade das enzimas piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato resultam em diminuição da síntese de ATP (SINGLETON; MARTIN, 2001).

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 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).

O sistema nervoso central é mais propenso ao estresse e ao dano oxidativo, influenciando na ocorrência de doenças neurodegenerativas. O aumento do dano oxidativo, a disfunção mitocondrial e defeitos nas proteínas constituem condições que levam à morte celular de neurônios (COZZOLINO, 2012). O estresse oxidativo, importante causa de dano celular, ocorre devido a um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes. O sistema de defesa antioxidante busca manter o processo oxidativo dentro dos limites adequados e passíveis de regulação, impedindo maiores danos. É importante ressaltar que o organismo está sujeito ao estresse oxidativo ocasionado por espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes do meio ambiente ou formadas no próprio organismo (BARBOSA et al, 2010; BARREIROS et al, 2006).

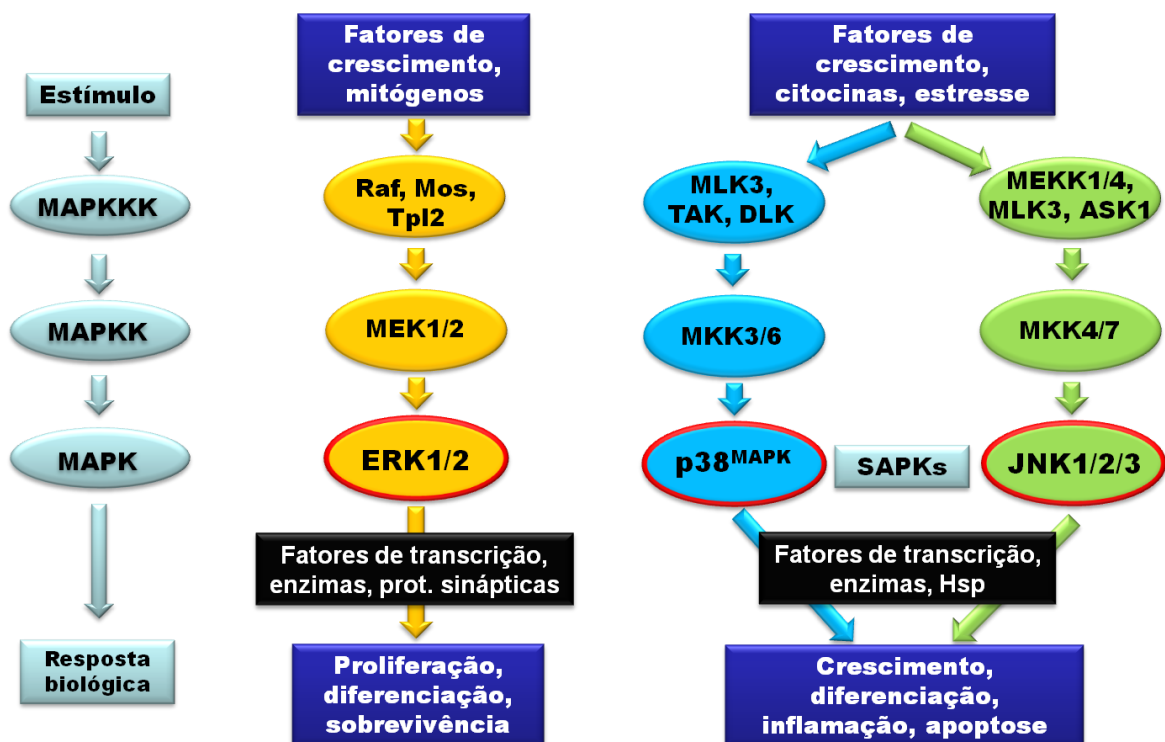
O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR; ERZURUM, 2002). Uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzida, produzindo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, denominadas espécies reativas do oxigênio (EROs) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002). As EROs podem provocar injúria tecidual (KINNULA et al., 1995) e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO et al., 2007).

Tem sido demonstrado que as EROs podem interferir com a remoção do glutamato da fenda sináptica, através da inibição dos transportadores de alta afinidade (GLAST) (ERIKSON et al., 2007). O conseqüente aumento dos níveis de glutamato extracelular é potencialmente excitotóxico para os neurônios (XU; XU; DENG, 2010), o que sugere que as lesões neuronais na DT resultem, em grande parte, da excitotoxicidade (TODD; BUTTERWORTH, 1998). O glutamato na fenda pode se ligar aos receptores ionotrópicos (os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), os de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico (AMPA) e os receptores de cainato), 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) (CHEN et al., 2009; RAMA RAO et al., 2010).

As principais MAPKs são as cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2), c-Jun NH2-terminal cinases 1 e 2 (JNK1/2) e as proteínas cinases ativadas por mitógenos de 38

kDa ( $p38^{MAPK}$ ) (WAETZIG; HERDEGEN, 2004). A cascata da ERK1/2 é primariamente ativada por fatores de crescimento, regulando expressão gênica, embriogênese, proliferação, sobrevivência, morte celular e neuroplasticidade (SCHENK et al., 2005). As proteínas cinases JNK e  $p38^{MAPK}$  são ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, estando frequentemente relacionadas a estresse e morte celular (COWAN; STOREY, 2003). Entretanto, JNK e  $p38^{MAPK}$  também regulam o desenvolvimento do SNC e a neuroplasticidade (WAETZIG; HERDEGEN, 2004).

**Figura 2 - Vias de sinalização das MAPKs.**



ASK1: cinase reguladora de sinal apoptótico 1; DLK: cinase zíper de dupla leucina; Hsp: proteína de choque térmico; MAPKKK: cinase da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno; MAPKK: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno; MLK3: cinase 3 de linhagem mista; Mos: Moloney sarcoma oncogene; Raf: proteínas cinases específicas para Ser/Thr; TAK: cinase ativada por TGF- $\beta$ ; Tpl2: progressão de tumor locus-2.

Fonte: adaptado de Cowan e Storey (2003).

Dessa forma, pelas atividades coordenadas das vias de sinalização intracelular, processos bioquímicos/funcionais relacionados ao desenvolvimento do SNC, à neuroplasticidade, à sobrevivência e morte celular e até mesmo processos patológicos como as doenças neurodegenerativas podem ser regulados (BRAZIL; YANG; HEMMINGS, 2004; HADDAD, 2004; THOMAS; HUGANIR, 2004; AOUADI et al., 2006; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2006; WAYMAN et al., 2006; NAGAI et al., 2007; WANG; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 2007).

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; RAIVICH; BEHRENS, 2006; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2006; DELIVORIA-PAPADOPOULOS; ASHRAF; MISHRA, 2007; NAGAI et al., 2007) as implicações referentes à possível modulação e caracterização do envolvimento das vias de sinalização, como as MAPKs e seus alvos durante a DT no SNC, não são conhecidas e necessitam ser investigadas. 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 DT.

Entretanto, apesar destes poucos trabalhos relacionarem a participação de algumas vias de sinalização intracelular na DT *in vitro*, não há demonstrações do envolvimento de outras vias de sinalização, nem trabalhos que demonstrem os mecanismos celulares *in vivo*, nem a relação do envolvimento destas vias com manifestações clínicas e sequelas advindas das doenças associadas à DT.

Apesar do estabelecimento de modelos experimentais em laboratório com roedores, e da descrição das disfunções neurológicas e danos cerebrais que resultam da DT, os mecanismos precisos que conduzem às lesões características desse distúrbio permanecem obscuros. Ao longo de muitos anos, têm sido propostos vários processos que podem levar à morte celular neuronal focal nesta desordem neurológica. Mas, apesar dos esforços concentrados para relacionar esses processos a uma sequência clara de acontecimentos que culminam no desenvolvimento da neuropatologia, poucos resultados foram obtidos e atualmente muito pouco ainda se conhece sobre os mecanismos celulares envolvidos nos processos neurodegenerativos da DT. Na encefalopatia de Wernicke, a disfunção inicial para partes-chave do sistema límbico, que pode progredir rapidamente para danos estruturais, resulta em complicações graves e muitas vezes fatais para as pessoas afetadas por este distúrbio (ABDOU; HAZELL, 2015).

Embora as alterações de fase aguda da DT sejam consideradas facilmente tratáveis pela administração de tiamina, e que a administração da vitamina permanece o remédio para muitos dos problemas metabólicos relacionados à encefalopatia de Wernicke, uma neuropatologia crônica e não responsiva a tratamento pode se desenvolver após repetidos ataques de deficiência (HARPER, 1983; ABDOU; HAZELL, 2015), sugerindo que uma intervenção apropriada durante estes episódios tem o potencial para atrasar ou prevenir o desenvolvimento de grandes lesões no SNC. Além disso, a propensão dos indivíduos afetados em retornar aos fatores causais, como hábitos associados ao álcool e alimentação desbalanceada, que levam a episódios



recorrentes de DT, representa um obstáculo importante para o tratamento bem-sucedido do problema (ABDOU; HAZELL, 2015).

Essa intervenção, no entanto, só é possível e com probabilidade de sucesso, se a fisiopatologia subjacente a esta condição for bem compreendida, algo que continua seriamente carente no momento (HAZELL, 2009). Assim, devido ao fato das lesões neurológicas na DT serem variadas e da falta de conhecimento detalhado dos mecanismos de morte celular envolvidos no processo, que não permitem uma abordagem terapêutica mais eficiente, e da necessidade de propiciar melhores condições de saúde no país, que tem exigido a utilização de novas estratégias nutricionais como a utilização de dietas aprimoradas e uso de suplementação específica, criam-se condições de risco para a ocorrência da DT, seja pela falta de acesso à alimentação adequada ou, por situações específicas de maior predisposição. Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de pesquisas com o uso de modelos experimentais que permitam melhor compreensão da patogenia e assim, estratégias adequadas de tratamento.

### 2.2.1 Doenças causadas pela deficiência de tiamina

As doenças do SNC são bastante variadas, com ampla gama de agentes etiológicos e normalmente resultam em importantes impactos em saúde pública (OMS, 2007). Nas Américas e no Brasil, a epilepsia e os acidentes vasculares cerebrais são as enfermidades neurológicas mais prevalentes nos humanos, revelando a importância socioeconômica e em saúde pública das enfermidades que acometem o SNC (WHO, 2004; MALTA et al., 2015). Entretanto, no diagnóstico diferencial das neuropatias, devido à similaridade de sinais clínicos e características epidemiológicas, devem-se incluir todas as causas possíveis de doenças, inclusive as de origem em distúrbios metabólicos do SNC, como a DT (PADILHA et al., 2011).

#### 2.2.1.1 *Beribéri*

O termo beribéri, adotado na terminologia médica, provém do cingalês (sinhalese), língua originária da Índia e atualmente um dos idiomas em uso no Sri Lanka (antigo Ceilão). O significado da palavra beri é fraqueza e beri-beri, extrema fraqueza, assim escrito, pois, no cingalês o superlativo é formado pela repetição da palavra (REZENDE, 2002).

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

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, como a que acometeu detentos de uma penitenciária na Costa do Marfim, tripulações de navios na Tailândia, refugiados butaneses no Nepal, e fuzileiros navais na Colômbia (BRASIL, 2012).

No Brasil, desde 2006 (Quadro 1), os casos mais recentes de beribéri têm sido notificados nos Estados do Maranhão e Tocantins. Além disso, em 2008, foram identificados casos suspeitos em indígenas das etnias Ingaricó e Macuxi, em Roraima (CERRONI et al., 2010; BRASIL, 2019). No município de Araguaína, entre os anos de 2012 e 2016 foram registrados 20 casos (Figura 3). Em 2011, a Coordenação-Geral de Alimentação e Nutrição do Ministério da Saúde, desenvolveu o “Guia de Consulta para Vigilância Epidemiológica, Assistência e Atenção Nutricional dos Casos de Beribéri”, após a oficina de formação e desenvolvimento dos trabalhadores da saúde para o enfrentamento do beribéri, lançado em 2012 (BRASIL, 2012).

**Quadro 1** - Evolução no número de casos confirmados de beribéri. Brasil, 2006 a 2014\*, n = 2.213

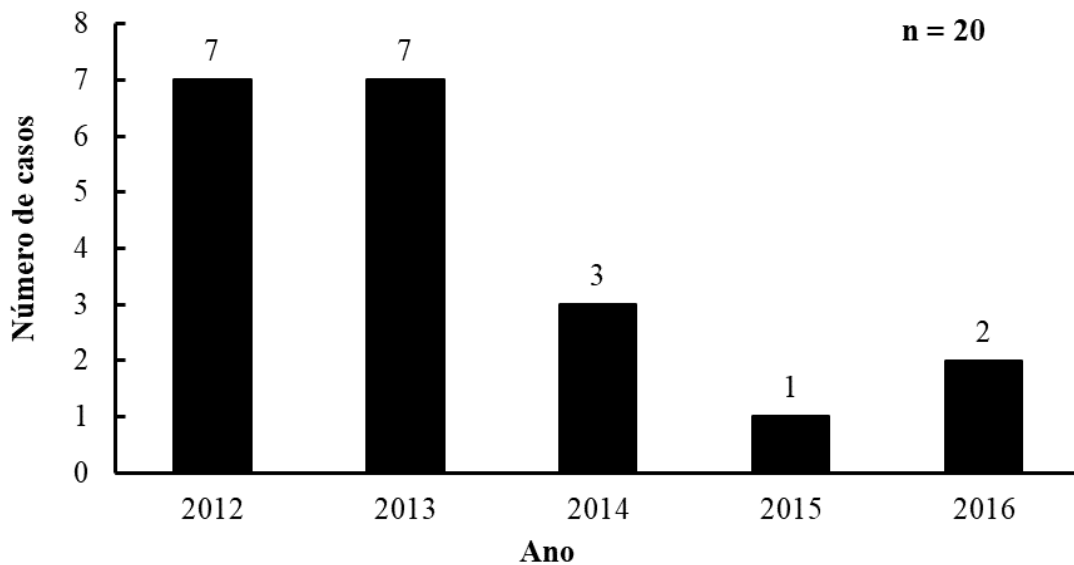
<b>Estados</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014*</b>
Maranhão	434	551	226	134	50	8	14	1	12
Tocantins	9	18	41	20	42	10	11	39	13**
Roraima	0	0	52	226	71	55	100	14	62
<b>Total</b>	<b>443</b>	<b>569</b>	<b>319</b>	<b>380</b>	<b>163</b>	<b>73</b>	<b>125</b>	<b>54</b>	<b>87</b>

Fonte: Brasil, 2015/Banco de dados das Secretarias Estaduais de Saúde do MA, TO e RR, 2004 a 2014.

\*Dados parciais.

\*\*Araguaína, Brasilândia do Tocantins, Couto Magalhães, Goiatins, Itacajá, Sandolândia e Tocantinópolis.

**Figura 3** - Número de casos de beribéri notificados no município de Araguaína, TO, 2012 a 2016.



Fonte: FORMSUS, 2012 a 2016.

As formas clínicas do beribéri podem apresentar-se isoladas ou associadas, sendo classificadas como: beribéri seco – caracterizado por neuropatia sensitivo-motora bilateral e simétrica, com distribuição em bota e luva; beribéri úmido – caracterizado por insuficiência cardíaca de alto débito devido à retenção de sódio e água, vasodilatação periférica e insuficiência biventricular, e beribéri Shoshin – que se refere à insuficiência cardíaca fulminante, de início súbito, com acidose láctica e insuficiência biventricular. A palavra *Shoshin* deriva do japonês, em que *sho* significa “dano agudo” e *shin*, significa “coração” (BRASIL, 2012).

O diagnóstico de beribéri é clínico e o tratamento é feito com reposição de tiamina. Pode-se realizar diagnóstico laboratorial através da análise da tiamina sérica, da excreção urinária de tiamina e da atividade da transcetolase de eritrócitos (exames não disponíveis no Sistema Único de Saúde). Entretanto, a resposta clínica ao tratamento empírico com tiamina é usada para confirmar o diagnóstico (BRASIL, 2012).

#### 2.2.1.2 Encefalopatia de Wernicke e Síndrome de Wernicke-Korsakoff

De acordo com Silva e Enes (2013), o abuso de álcool é um dos mais sérios problemas de saúde pública, e a síndrome de Wernicke- Korsakoff (SWK) é uma das mais graves consequências do alcoolismo.

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).

Os aspectos patológicos descritos 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 SWK consiste em duas fases distintas de um mesmo processo patológico: inicialmente surge a Encefalopatia de Wernicke (EW), fase aguda da síndrome, caracterizada pela tríade clínica clássica de estado confusional agudo (perturbação aguda e flutuante da atenção e do correto processamento dos estímulos originados do meio externo), oftalmoparesia (paresia de um ou mais músculos extraoculares) e ataxia (perda da coordenação motora). O nistagmo (movimentos oculares involuntários e oscilatórios) também é característico desta fase. Com a progressão do processo patológico, a encefalopatia pode progredir para um quadro crônico – síndrome de Wernicke-Korsakoff – marcado por uma amnésia anterógrada (incapacidade de formar novas memórias) e confabulação (produtos falsos da memória). Se a identificação e abordagem terapêutica desta síndrome forem tardias poderá surgir estupor, coma e, eventualmente, a morte (SILVA; ENES, 2013).

Na EW, o achado característico é o envolvimento do corpo mamilar e, nos pacientes com SWK geralmente há envolvimento do núcleo mediano dorsal do tálamo (KUMAR, 2010; ABDU; HAZELL, 2015). Em roedores de laboratório (ratos e camundongos utilizados em modelos experimentais de DT) a patologia largamente mimetiza o distúrbio que acomete o humano. As lesões nestes animais normalmente são encontradas nos núcleos talâmicos, corpos mamilares, cerebelo, tectum, substância cinzenta periaquedutal e córtex frontal e parietal (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013).

### 2.2.2 Tratamento das doenças relacionadas à DT

O tratamento básico dos distúrbios relacionados à DT envolve a administração de altas doses da vitamina B1 (ABDU; HAZELL, 2015). A recomendação terapêutica padrão inclui a administração de tiamina em doses de 50-300 mg/dia (intravenosa, intramuscular ou oral) (KUMAR, 2007, 2010). Em casos de EW, doses ainda maiores podem ser necessárias e, em

casos de beribéri infantil, são recomendados 5-20 mg de tiamina parenteral (KUMAR, 2010). Entretanto, devido às extensas e variadas alterações em vias metabólicas celulares, atualmente 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).

Nesse sentido, têm sido investigados, sob diversos aspectos, o uso de substâncias anti-inflamatórias (flunixinina meglumina, dimetilsulfóxido, dexametasona, nimesulida, minociclina), diuréticos (furosemida, manitol), antioxidantes (minociclina), substâncias que incrementam a captação de glutamato (ceftriaxona, composto NP031112), bloqueadores de receptores glutamatérgicos (flupirtina), terapia com células tronco (precursores neuronais) e uso de nanopartículas (com óxido de cério) (ABDOU; HAZELL, 2015; APLEY, 2015). Substâncias como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o Trolox, devido às suas propriedades farmacológicas, constituem-se como interessantes alternativas.

O DMSO é uma substância orgânica de fórmula química  $C_2H_6SO$ , 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 possui ação anti-inflamatória e citoprotetora, é mais eficaz na inflamação aguda, modulando a 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 decorrentes de traumatismos cranianos, com desenvolvimento de aumento da pressão intracraniana em pacientes normovolêmicos, sem alterações eletrolíticas (BLYTHE et al., 1986). O DMSO é indicado para remoção de radicais livres envolvidos na lesão de reperfusão (STONE, 1993).

O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) é um potente antioxidante hidrossolúvel sintético, análogo à vitamina E, com mecanismo de ação que

envolve a remoção de radicais peroxil (WU et al., 1990; KUMAR; SUGENDRAN; VIJAYARAGHAVAN, 2001).

Os 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, 2015; SERKEDJIEVA, 2010). O radical hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) 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).

Prejuízos na capacidade oxidativa da célula, induzidos pela DT, também aumentam a expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), levando à excessiva produção de óxido nítrico (NO) (CALINGASAN; GIBSON, 2000). 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  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, que conseqüentemente pode exacerbar a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo (PARK et al., 1999; HAZELL; BUTTERWORTH, 2009). Nesse sentido, estudos relatam altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) no tálamo e córtex cerebral em indivíduos com DT (LANGLAIS et al., 1997). Assim, a DT resulta em um ciclo vicioso, onde diminuições da atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase catalisam excessiva produção de EROs, que por sua vez inibem a capacidade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase em regular o funcionamento do ciclo do ácido tricarboxílico (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

Dessa forma, a utilização de compostos com propriedades farmacológicas antioxidantes e anti-inflamatórias, pode constituir importante estratégia para atenuar os efeitos deletérios da DT. Particularmente, em indivíduos sob risco de desenvolvimento de DT recorrente, situação tipicamente associada ao estabelecimento de sequelas neurológicas irreversíveis (ABDOU; HAZELL, 2015; KUMAR, 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de distúrbios celulares e comportamentais nos animais-modelo em fases tardias da doença e em episódios recorrentes de DT, com o intuito de delinear estratégias neuroprotetoras eficientes, a fim de amenizar sequelas neurológicas e auxiliar na determinação de futuros protocolos terapêuticos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

O trabalho visa três abordagens específicas:

##### 1 – Avaliação dos mecanismos celulares e lesões no SNC

- a) Identificar e quantificar as áreas encefálicas afetadas por meio do método de viabilidade celular do TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio), utilizando fatias encefálicas de camundongos tratados;
- b) Caracterizar as alterações histológicas nas áreas afetadas pela DT;
- c) Determinar a possível modulação das vias das MAPKs (ERK1/2) nas estruturas encefálicas envolvidas na neurodegeneração induzida por DT.

##### 2 – Caracterização dos efeitos neurológicos da DT em estágios tardios e em episódios recorrentes

- a) Determinar as alterações comportamentais psicomotoras tardias nos animais, após insulto agudo de DT, seguido ou não de tratamento de recuperação;
- b) Determinar as alterações comportamentais psicomotoras após episódios repetidos de insulto agudo de DT, seguidos ou não de tratamentos de recuperação.

##### 3 – Avaliação de efeitos protetores de substâncias potencialmente terapêuticas

- a) Investigar a eficácia de um protocolo terapêutico auxiliar e a possível ação neuroprotetora do agente antioxidante Trolox e do agente anti-inflamatório dimetilsulfóxido (DMSO) no modelo *in vivo* de DT, com ou sem tratamento concomitante com tiamina, analisando os animais em tempos específicos após insulto agudo único ou

repetido de DT, sob as óticas da patogênese (viabilidade celular, modulação de MAPKs, lesões morfológicas) e comportamental.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

No modelo experimental *in vivo* para o estudo de DT sobre o SNC, foram utilizados camundongos Swiss com idade pós-natal de 50 dias. Os animais foram produzidos em biotério próprio (Laboratório de Patologia Experimental da UFT) e mantidos, manipulados e eutanasiados por decapitação de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFT (CEUA-UFT, processo nº 23101.001419/2018-83).

### 4.2 Tratamentos *in vivo* – modelo de deficiência de tiamina

O modelo de deficiência dietética de tiamina em conjunto com injeções do antagonista de tiamina, pirítiamina, foi utilizado. Os animais foram organizados em dois protocolos de indução de deficiência seguido de recuperação. Camundongos foram separados em 10 grupos por protocolo (n = 6 por grupo) e submetidos a diferentes tratamentos (Quadro 2).

**Quadro 2** - Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos do modelo de deficiência de tiamina.

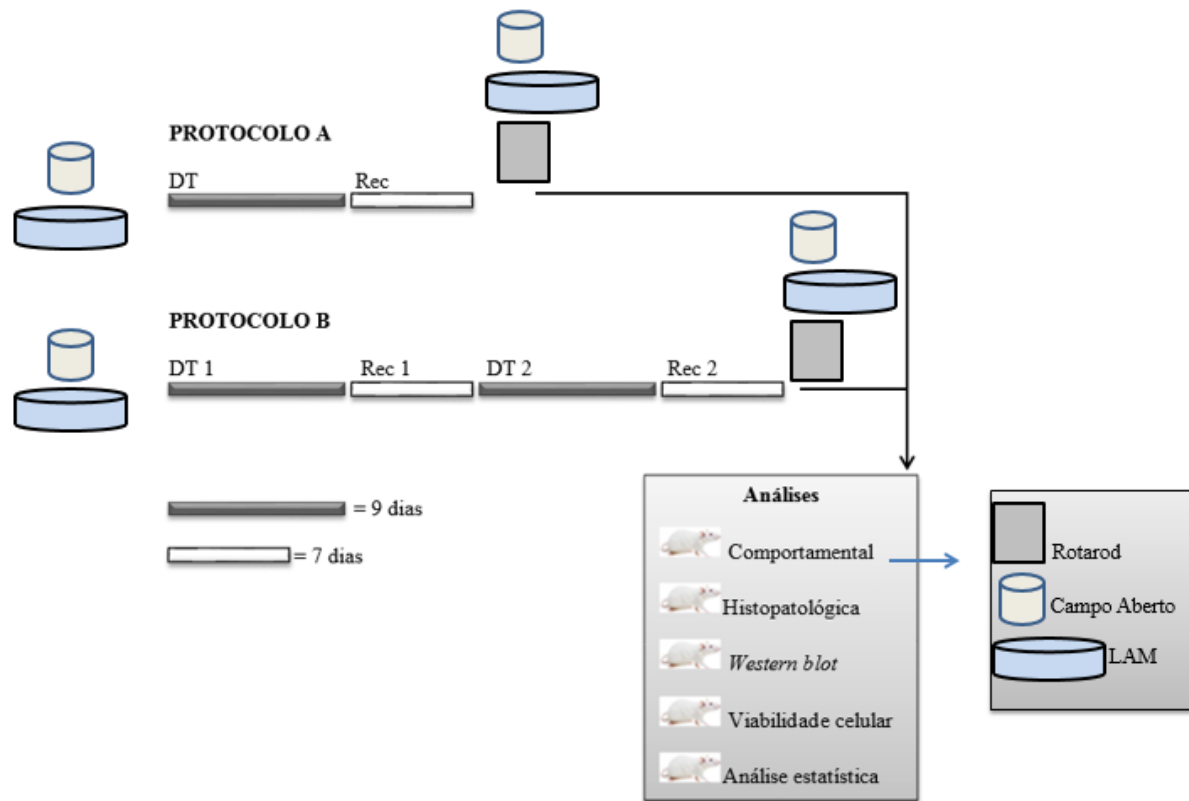
GRUPO EXPERIMENTAL	TRATAMENTOS	
	Indução de deficiência	Recuperação
Grupo 1 – Controle (Cont)	Ração AIN-93M + solução salina	Ração AIN-93M + solução salina
Grupo 2 – Deficiente (Ptd)	Ração AIN-93DT + Pirítiamina	Ração AIN-93M + solução salina
Grupo 3 – Deficiente com tiamina (Ptd+Tm)	Ração AIN-93DT + Pirítiamina	Ração AIN-93M + tiamina
Grupo 4 – Deficiente com Trolox (Ptd+Tr)	Ração AIN-93DT + Pirítiamina	Ração AIN-93M + Trolox
Grupo 5 – Deficiente com DMSO (Ptd+Dmso)	Ração AIN-93DT + Pirítiamina	Ração AIN-93M + DMSO
Grupo 6 – Deficiente com tiamina e Trolox (Ptd+Tm+Tr)	Ração AIN-93DT + Pirítiamina	Ração AIN-93M + tiamina + Trolox
Grupo 7 – Deficiente com tiamina e DMSO (Ptd+Tm+Dmso)	Ração AIN-93DT + Pirítiamina	Ração AIN-93M + tiamina + DMSO
Grupo 8 – Controle tiamina (Tm)	Ração AIN-93M + solução salina	Ração AIN-93M + tiamina
Grupo 9 – Controle Trolox (Tr)	Ração AIN-93M + solução salina	Ração AIN-93M + Trolox
Grupo 10 – Controle DMSO (Dmso)	Ração AIN-93M + solução salina	Ração AIN-93M + DMSO

Dentre os grupos, quatro foram grupos controle, que receberam solução salina (NaCl 0,9%) ou substâncias neuroprotetoras (tiamina, Trolox e dimetilsulfóxido) e seis foram grupos deficientes, que receberam piritiamina seguido ou não de substâncias neuroprotetoras.

Os tratamentos supracitados, organizados em dois protocolos de indução de deficiência seguido de promoção de recuperação (tratamentos com substâncias neuroprotetoras) (KE et al., 2003), foram denominados protocolo A, com episódio único de deficiência seguido de recuperação, e protocolo B, com dois episódios repetidos de deficiência, intercalados com recuperação. No protocolo A, os animais foram submetidos a um período de tratamento com duração de 9 dias para indução de DT, seguido de um período de tratamento de recuperação (Rec) de 7 dias com as substâncias neuroprotetoras. No protocolo B, os animais foram submetidos a um 1º período de indução de DT com duração de 9 dias (DT 1), seguido por um período de 7 dias de tratamento de recuperação com as substâncias neuroprotetoras (Rec 1), submetidos a um 2º período de indução de deficiência de 9 dias (DT 2), terminando com novo período de tratamento de 7 dias com substâncias neuroprotetoras (Rec 2). Após os períodos dos protocolos A e B, foram realizadas as análises (Figura 4).

Durante os tratamentos dos protocolos A e B, os pesos corporais dos animais também foram monitorados, como parâmetro de avaliação metabólica geral. Para a análise, adotamos um procedimento de normalização dos pesos corporais entre os grupos, com os pesos iniciais (dia zero) considerados iguais a 1,00, e as variações de ganho ou perda relativos a este valor. Os resultados obtidos foram expressos como médias,  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M).

**Figura 4** - Delineamento experimental do modelo de deficiência de tiamina em insulto agudo único ou repetido, e avaliação da eficácia de substâncias neuroprotetoras.



DT = período de indução de deficiência de tiamina (Grupos 1, 8, 9 e 10 – tratamento com salina; Grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7 – tratamento com pirritiamina); Rec = período de recuperação (Grupos 1, 2, 8, 9 e 10 – tratamento com salina e/ou substâncias neuroprotetoras; Grupos 3, 4, 5, 6 e 7 – tratamento com substâncias neuroprotetoras: Tiamina, Dimetilsulfóxido e Trolox).

Fonte: Laboratório de Patologia Experimental da UFT (2020).

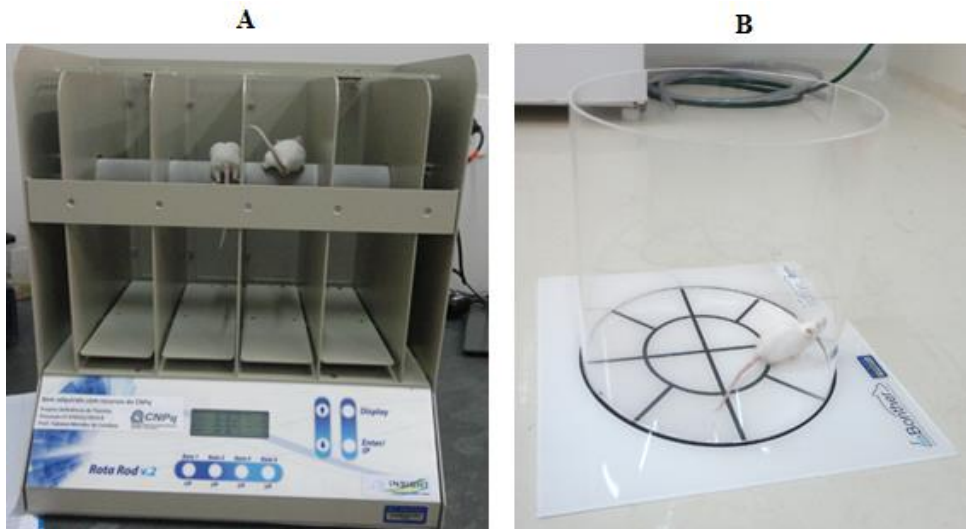
Os grupos controle 1, 8, 9 e 10, receberam ao longo de todo o tratamento ração padrão AIN-93M (PRAG Soluções Biociências, SP, Brasil), segundo o *American Institute of Nutrition* (Anexos 1 e 2) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7 receberam ração deficiente em tiamina AIN-93DT (PRAG Soluções Biociências, SP, Brasil) durante os períodos de indução de deficiência, e ração padrão AIN-93M durante os períodos de recuperação. Os constituintes da dieta DT são 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 (controles; Grupo 1), pirritiamina (deficientes, 0,5 mg/kg; Grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e/ou os neuroprotetores tiamina (100 mg/kg, Grupos 3, 6, 7 e 8), Trolox (1 mg/kg; Grupos 4, 6 e 9) ou DMSO (1 ml/kg em solução 10% em salina; Grupos 5, 7 e 10). Os volumes injetados foram ajustados para 0,1 ml/10 g de peso corporal (CALINGASAN et al., 1996; CORDOVA et al., 2012).

### 4.3 Análise comportamental

Para os testes de comportamento psicomotor, os animais foram testados em rotarod (Figura 5A), na arena de campo aberto (Figura 5B) e no labirinto aquático de Morris (LAM; Figura 6). Os animais foram habituados à sala de ensaio durante 1 h antes de iniciar os testes, que foram realizados durante a fase clara do ciclo circadiano (10h00-17h00).

**Figura 5** - Aparatos para testes comportamentais. (A) Rotarod e (B) arena tipo campo aberto.



Fonte: Arquivo fotográfico do Laboratório de Patologia Experimental UFT.

**Figura 6** - Piscina circular com plataforma submersa para teste do labirinto aquático de Morris.



Fonte: Arquivo fotográfico do Laboratório de Patologia Experimental UFT

O rotarod foi utilizado para avaliar os efeitos dos tratamentos no equilíbrio e coordenação motora dos animais (AGUIAR JR. et al., 2009). A tarefa consistiu de duas etapas: condicionamento (treino) e teste (JIANG et al., 2004; CORDOVA et al., 2012). Primeiramente, os animais foram condicionados no cilindro estacionário durante 30 s, seguido por um período de 90 s no cilindro com rotação fixa em 5 RPM. Os animais que falharam nesta primeira etapa ainda foram submetidos à no máximo duas sessões adicionais de condicionamento. A falha na terceira sessão de condicionamento, foi critério de exclusão para as sessões de teste. Com este procedimento, os animais devem apresentar valores basais semelhantes para todos os grupos. Trinta minutos após a última sessão de condicionamento, os animais foram testados no rotarod e o tempo de latência da queda foi gravado para determinar o grau de coordenação motora. O teste consistiu em duas sessões diárias do rotarod com duração máxima de 5 min, intervalos de 30 minutos entre as duas sessões, iniciando à velocidade de 5 RPM e com aumento de 0,1 RPM/s, atingindo o máximo de 35 RPM, realizado 24 h após o último dia de tratamento dos protocolos A e B.

Os testes de campo aberto avaliaram a atividade locomotora, 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 eliminados, número de levantamentos (*rearing*; levantamentos completos dos dois membros anteriores) e número de movimentos de limpeza (*grooming*) (AGUIAR JR. 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 24 horas após o último dia dos tratamentos (PEREIRA et al., 2017; MORAES et al., 2018). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem das aferições dos últimos dias em relação ao dia zero  $(100\%) \pm E.P.M.$

O labirinto aquático de Morris (LAM) foi utilizado pra avaliar a memória espacial dos animais (MORRIS, 1984; VORHEES; WILLIAMS, 2014). Foi realizado em uma piscina circular de polietileno, com 1,20 m de diâmetro e 65 cm de altura, preenchida com água a 25° C até o nível de 25 cm. A piscina foi dividida em quatro quadrantes imaginários denominados NW (noroeste), SW (sudoeste), NE (nordeste) e SE (sudeste). Uma plataforma circular branca (8 cm de diâmetro) foi colocada a 2 cm abaixo do nível da água em um dos quadrantes, denominado quadrante alvo. Para evitar a localização visual da plataforma, foram dissolvidos

aproximadamente 100 g de leite de vaca desnatado em pó na água, tornando-a turva. A piscina não possuía nenhuma pista, marca ou sinal interno, mas se encontrava alocada em uma sala de 5 x 6 m, com pistas visuais fora do labirinto (p.ex., cartazes, equipamentos, armários, mesa). Para o treinamento, cada animal foi submetido a uma sessão de quatro passagens por dia, durante cinco dias consecutivos, perfazendo o teste de aprendizado, realizado antes do início dos tratamentos. O intervalo das passagens foi o mesmo para todos os animais em cada sessão (10 minutos). Os camundongos foram colocados na piscina, com a face voltada para um dos quadrantes, de maneira que o mesmo animal iniciasse o teste a partir de quadrantes diferentes (pseudo-randomização). Em todas as sessões, a plataforma foi colocada no quadrante sudeste. Os animais permaneceram na piscina até encontrarem a plataforma e, caso não a encontrassem em 60 segundos, eram gentilmente guiados até ela pelo experimentador. Ao encontrarem a plataforma, os animais permaneciam por 15 segundos.

Nas sessões de testes, cada animal foi colocado na piscina por no máximo 120 segundos, para determinação do tempo de latência para localização da plataforma, perfazendo o teste de memória. A latência para encontrarem a plataforma foi registrada. Este teste foi realizado no primeiro dia dos tratamentos (comportamento basal) e 24 h após o último dia dos tratamentos, de cada protocolo (CARVALHO et al., 2006; PINTO et al., 2006).

#### **4.4 Análise histopatológica**

Para avaliação morfológica de alterações degenerativas e de morte celular no SNC, foi utilizada a técnica de rotina para preparação de cortes histopatológicos do encéfalo dos camundongos, após os tratamentos.

Após os tratamentos, o SNC dos animais foi coletado e fixado em paraformaldeído 4% durante uma semana. Após este período, os tecidos foram rotineiramente processados e incluídos em parafina, seccionados em 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE) ou violeta de cresila (VC) (TOLOSA et al., 2003). As análises histopatológicas foram realizadas com um microscópio trinocular Biotika B20T acoplado a uma câmera digital ISH500 CMOS-5.0 (Tucsen Photonics, Fujian, China). As imagens foram projetadas em monitor e capturadas com o programa TCapture v.4.3.0.605 (Tucsen Photonics, Fujian, China), em objetiva 40x.

Para as análises histopatológicas, foram utilizados dois métodos: a determinação do escore médio de lesões (EML) e a morfometria para quantificação celular. O EML foi baseado

na incidência de lesões, em avaliação cega das lâminas, com a classificação em valores numéricos para cada animal e região anatômica: grau 0 (ausência de lesões), grau 1 (lesões mínimas), grau 2 (lesões leves), grau 3 (lesões moderadas) e grau 4 (lesões acentuadas) (SCHWAIGER et al., 1997; PEREIRA et al., 2017; ANJANEYA et al., 2018; MEDEIROS et al., 2020). A morfometria para quantificação celular foi realizada em diferentes estruturas do SNC, com avaliação de três campos de grande magnificação (CGM, 40x) para córtex cerebral e tálamo, dois CGM para hipocampo (giro denteado) e um campo de pequena magnificação (CPM, 10x) para hipotálamo. As avaliações foram realizadas em áreas padronizadas para todas as regiões anatômicas de cada animal, em cortes corados com VC ou HE (tálamo) (TÜREYEN et al., 2004; ZHU et al., 2015; CHO; LEE; SONG, 2017).

#### **4.5 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 das amostras, 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  $\beta$ -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 foram identificadas através do uso de anticorpos específicos para ERK1/2 e p38<sup>MAPK</sup> (CORDOVA et al., 2004, 2012). A revelação dos *immunoblottings* foi realizada através de método com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (CORDOVA et al., 2011; MEDEIROS et al., 2020) e a densitometria das bandas foi determinada com o uso do programa Image J v.1.52k (*National Institutes of Health*, EUA). Os níveis de fosforilação foram obtidos pela relação das densidades ópticas das formas fosforilada/total (POSSER et al., 2007).

#### 4.6 Determinação de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular baseia-se na mensuração de cromógeno produzido por desidrogenases mitocondriais a partir da redução do TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) (GAO, 2008). O resultado baseia-se na relação direta entre atividade mitocondrial (viabilidade da célula) e a quantidade de pigmento gerado.

As avaliações foram realizadas em fatias do SNC, preparadas conforme descrito por Cordova et al. (2004). Resumidamente, os encéfalos dos camundongos tratados foram retirados a 4 °C e fatiados na espessura de 500 µm. As fatias de encéfalo foram mantidas em tampão HEPES-salina (124 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 25 mM de HEPES, 12 mM de glicose e 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) em temperatura ambiente por 30 min e em seguida, incubadas no mesmo tampão por 30 min. com TTC 1% a 37 °C. Após o período de incubação, o tampão HEPES-salina com TTC foi retirado e as fatias foram fixadas em paraformaldeído a 4% e escaneadas (BEDERSON et al., 1986; GAO et al., 2008; MORAES et al., 2018). A viabilidade celular foi determinada pela quantidade de cromógeno formado (formazan vermelho insolúvel), avaliado por densitometria óptica com o programa Image J v.1.52k (*National Institutes of Health*, EUA).

#### 4.7 Análise estatística

Os dados são expressos como média ± E.P.M., e a significância estatística determinada pela análise de variância, seguida do teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado. Os resultados são considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

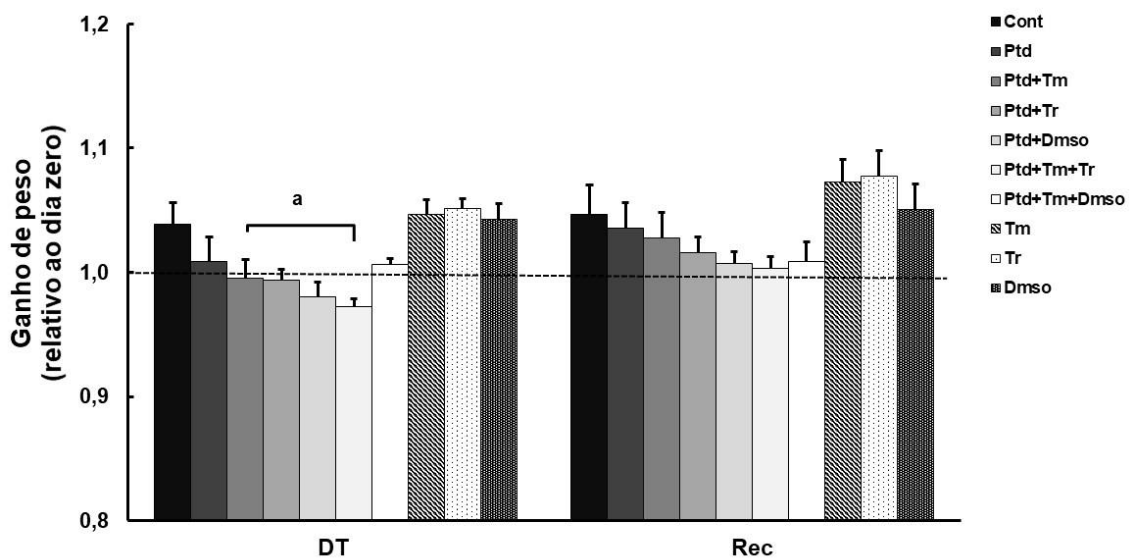


## 5 RESULTADO

### 5.1 Ganho de peso corporal

Os animais submetidos ao protocolo A, mostraram significativa redução de ganho de peso corporal após o período de indução de deficiência de nove dias (Figura 7), comparados ao controle ( $p \leq 0,02$ ). O grupo Ptd, entretanto, não apresentou queda significativa, devido a maior variação entre os indivíduos do grupo. As substâncias protetoras (tiamina, Trolox e DMSO), atenuaram parcialmente este efeito após o período de recuperação (Rec).

**Figura 7** - Ganho de peso corporal dos camundongos após um episódio de deficiência de tiamina e tratamentos de recuperação (protocolo A).

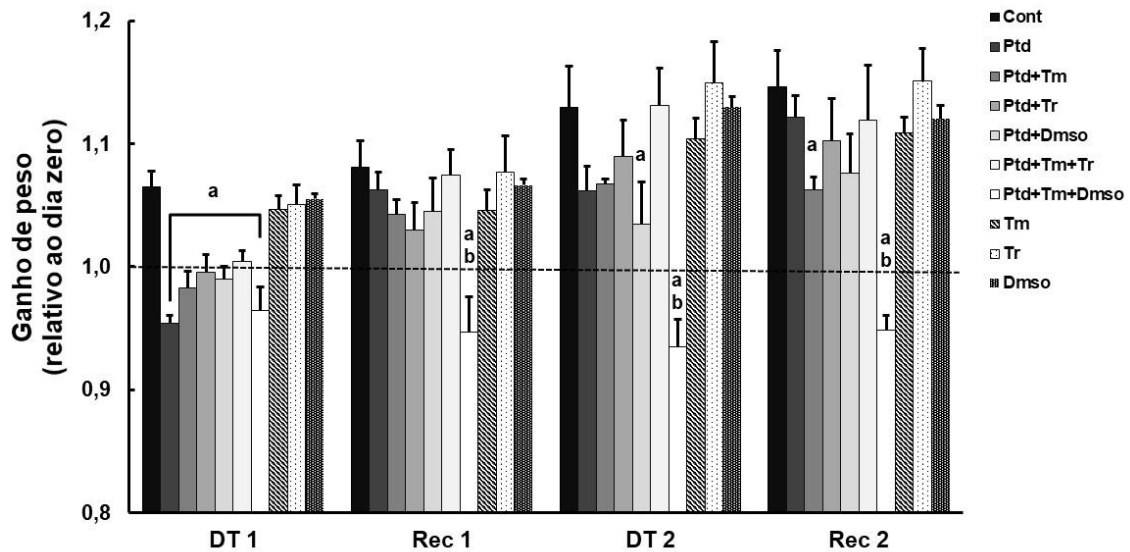


Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. dos valores relativos ao dia zero (peso inicial,  $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle.

No protocolo B (Figura 8), todos os grupos de animais deficientes exibiram perda de peso após o primeiro ciclo de indução de deficiência (DT 1;  $p \leq 0,001$ ). Porém, após o primeiro período de recuperação (Rec 1), os tratamentos reverteram este efeito, exceto no grupo que recebeu tiamina associada ao DMSO (grupo Ptd+Tm+DmsO,  $p = 0,002$  em relação ao grupo Cont). Após o segundo período de indução de deficiência (DT 2), houve perda de peso nos animais dos grupos Ptd+DmsO ( $p = 0,020$ , em relação ao grupo controle) e Ptd+Tm+DmsO ( $p = 0,00002$ , em relação ao grupo Cont;  $p = 0,0021$  em relação ao grupo Ptd). Ao final do período

de recuperação (Rec 2), o grupos tratados com tiamina (Ptd+Tm;  $p = 0,037$  em relação ao grupo Cont) e tiamina associada ao DMSO (grupo Ptd+Tm+Dms;  $p = 0,00002$  em relação ao grupo Cont;  $p = 0,00007$  em relação ao grupo Ptd) não recuperaram o peso corporal.

**Figura 8** - Ganho de peso corporal dos camundongos após dois episódio de deficiência de tiamina e tratamentos de recuperação (protocolo B).

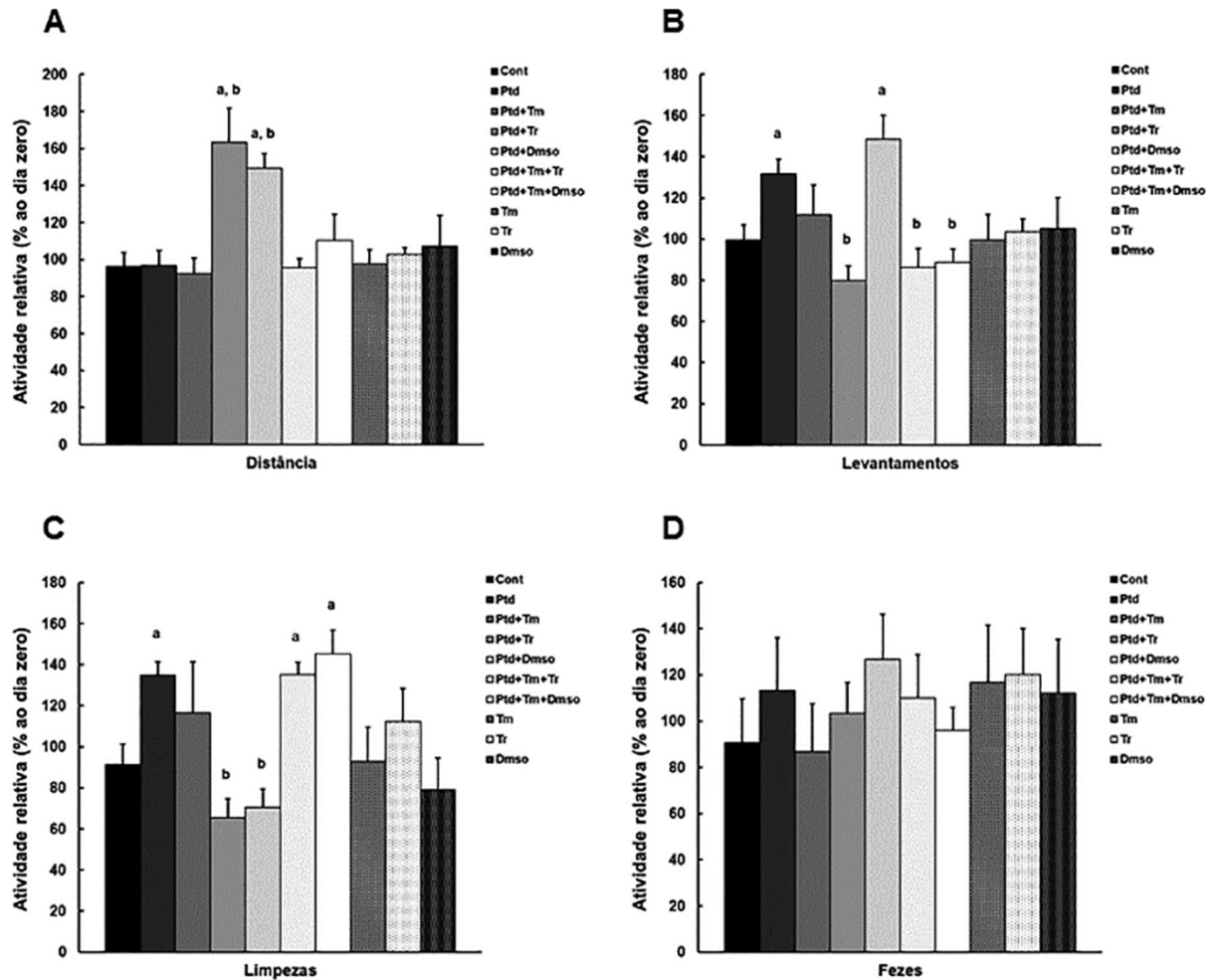


Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. dos valores relativos ao dia zero (peso inicial,  $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd.

## 5.2 Análise comportamental

Nos animais submetidos ao protocolo A, o campo aberto (Figura 9) revelou que o grupo Ptd aumentou as atividades de levantamentos ( $31,62\% \pm 7,08$ ,  $p = 0,049$ ) e limpezas ( $34,81\% \pm 6,50$ ,  $p = 0,045$ ), comparados ao controle. Os grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+Dms apresentaram reversão dos efeitos da DT no levantamento após o período de recuperação, com valores abaixo dos controles ( $-13,65$  e  $-11,4\%$ ;  $p = 0,01$  em relação ao Ptd). Entretanto, na limpeza, somente Trolox ( $-34,67\% \pm 9,23$ ,  $p = 0,002$  em relação ao Ptd) e DMSO ( $-29,44\% \pm 8,94$ ,  $p = 0,004$  em relação ao Ptd) isoladamente reduziram o efeito da DT. Por outro lado, os grupos Ptd+Tr e Ptd+Dms aumentaram a atividade locomotora ( $63,31\% \pm 18,42$  e  $49,34\% \pm 7,74$ ;  $p = 0,002$  em relação ao controle).

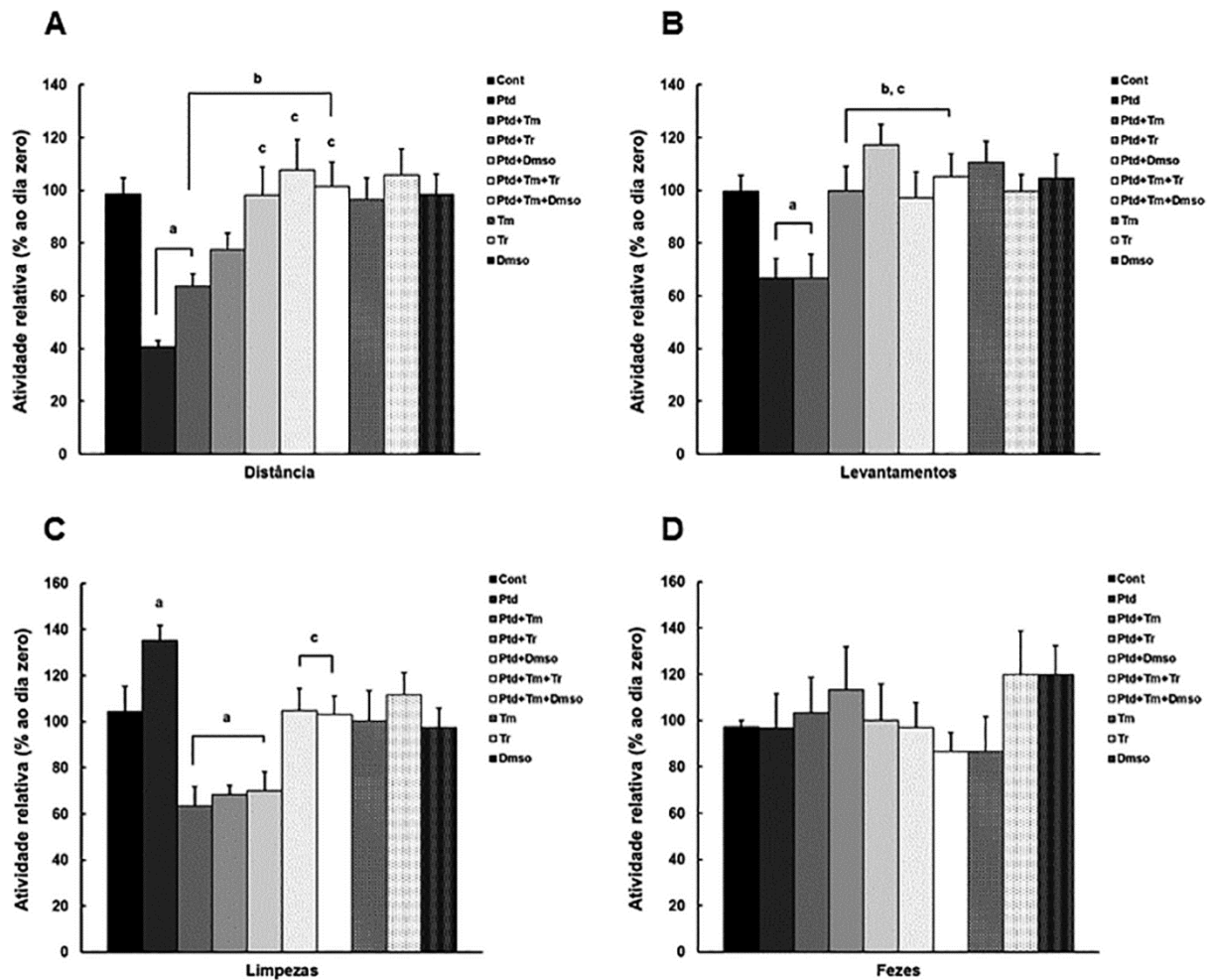
**Figura 9** - Avaliação em campo aberto de camundongos após um episódio de deficiência de tiamina e tratamentos de recuperação (protocolo A).



(A) Distância percorrida, (B) atividade de levantamentos, (C) atividades de limpezas e (D) eliminação de bolos fecais. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens relativas às atividades no dia zero ( $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd.

Com DT recidivante (protocolo B, Figura 10) o grupo Ptd reduziu a distância percorrida ( $-59,32\% \pm 2,35$ ,  $p = 0,00005$ ), a frequência de levantamentos ( $-33,29\% \pm 7,44$ ,  $p = 0,011$ ) e aumentou as atividades de limpezas ( $35,33\% \pm 6,44$ ,  $p = 0,034$ ), comparados ao grupo Cont. Todos os grupos tratados apresentaram reversão dos efeitos da DT nestes parâmetros, exceto o grupo Ptd+Tm nos levantamentos, e os grupos Ptd+Tm, Ptd+Tr e Ptd+Dmso, que reduziram as limpezas abaixo dos controles. Eliminação de fezes não foi alterada.

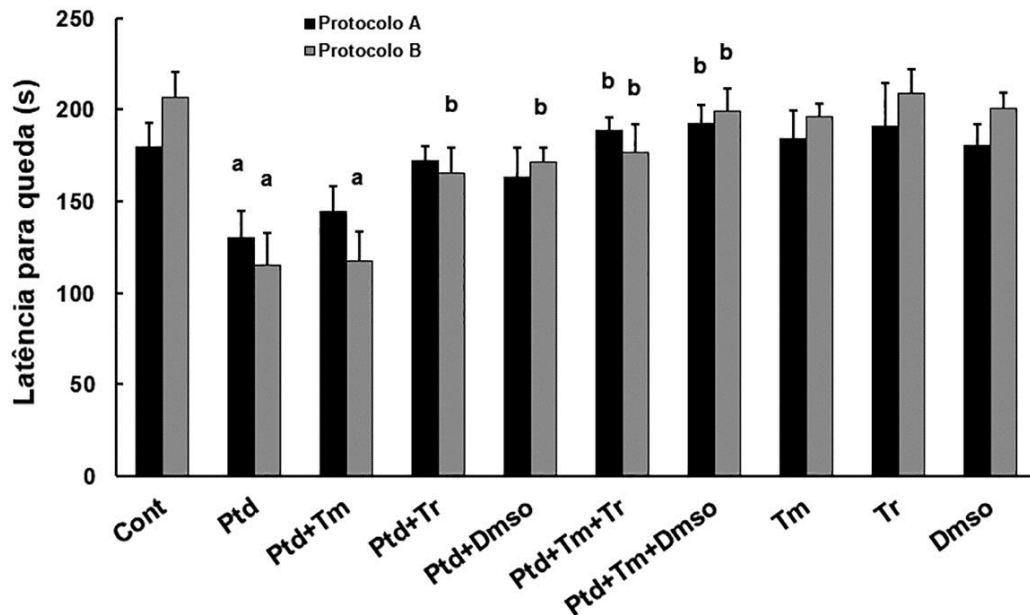
**Figura 10** - Avaliação em campo aberto de camundongos após dois episódios de deficiência de tiamina e tratamentos de recuperação (protocolo B).



(A) Distância percorrida, (B) atividade de levantamentos, (C) atividades de limpezas e (D) eliminação de bolos fecais. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens relativas às atividades no dia zero ( $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd, <sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd+Tm.

No teste do rotarod em insulto único de DT (protocolo A, Figura 11), o grupo Ptd apresentou redução no tempo de latência para queda ( $130,25 \text{ s} \pm 14,61$ ,  $p = 0,030$ ) em relação ao controle ( $179,79 \text{ s} \pm 13,23$ ). Somente as administrações associadas de tiamina com Trolox ( $188,67 \text{ s} \pm 7,01$ ,  $p = 0,013$  em relação ao Ptd) ou com DMSO ( $192,17 \text{ s} \pm 10,71$ ,  $p = 0,010$  em relação ao Ptd), revertem os efeitos da DT. Por outro lado, após dois períodos de DT (protocolo B, Figura 9), a redução do tempo de latência para queda do grupo Ptd ( $115,17 \text{ s} \pm 17,72$ ; grupo Cont  $206,50 \pm 14,12$ ,  $p = 0,0001$ ), não foi revertida apenas no grupo Ptd+Tm.

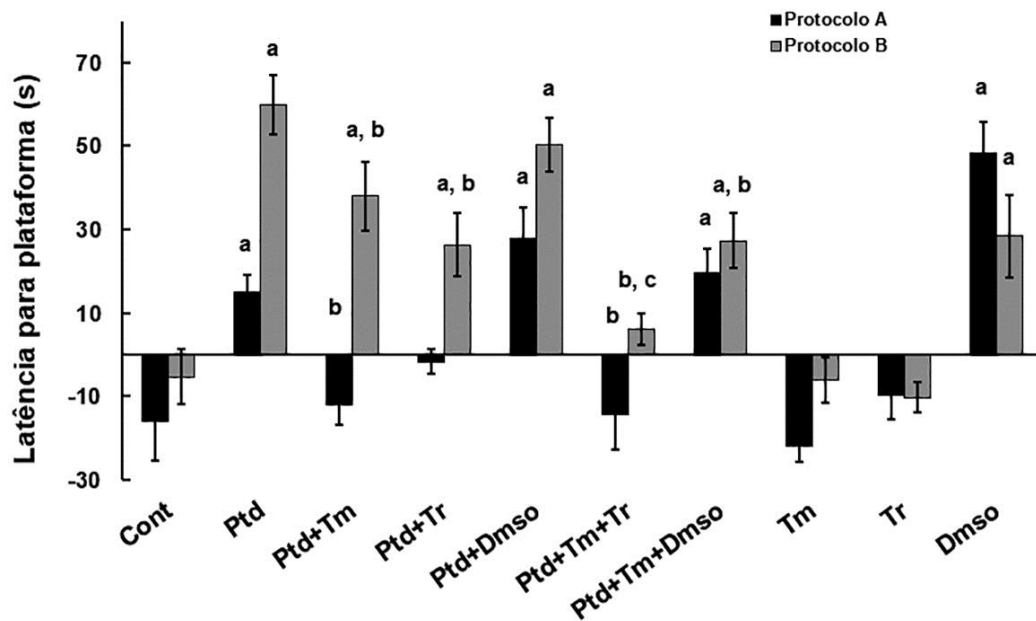
**Figura 11** - Teste de coordenação motora do rotarod em camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação.



Animais foram submetidos a um (protocolo A) ou dois (protocolo B) ciclos de DT seguidos de recuperação. Dados são expressos como média (s)  $\pm$  E.P.M. (n = 6). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd.

No teste de memória espacial no LAM, no protocolo A (Figura 12), o grupo Ptd apresentou aumento no tempo de latência para localização da plataforma (15,02 s  $\pm$  4,12,  $p = 0,002$ ) em relação ao controle (-16,12 s  $\pm$  9,36). Somente as administrações de tiamina associada ao Trolox (grupo Ptd+Tm+Tr; -14,50 s  $\pm$  8,41,  $p = 0,003$  em relação ao Ptd) ou isoladamente (grupo Ptd+Tm; -12,20 s  $\pm$  4,57,  $p = 0,006$  em relação ao Ptd), revertem os efeitos da DT. Curiosamente, todos os animais que receberam DMSO no período de recuperação, apresentaram perda de memória espacial em relação ao controle, com tempos de 27,86 s  $\pm$  7,30 (Ptd+Dms;  $p = 0,00005$ ), 19,58 s  $\pm$  5,83 (Ptd+Tm+Dms;  $p = 0,0007$ ) e 48,44 s  $\pm$  7,42 (Dms;  $p = 0,00001$ ). Após dois períodos de DT (protocolo B), o grupo Ptd apresentou grande aumento no tempo de latência para localização da plataforma (59,91 s  $\pm$  6,98,  $p = 0,00002$ ) em relação ao controle (-5,33 s  $\pm$  6,49). Os grupos Ptd+Tm, Ptd+Tr e Ptd+Tm+Dms apresentaram reversão parcial do efeito (38,05 s  $\pm$  8,30, 26,39 s  $\pm$  7,62 e 27,27 s  $\pm$  6,61,  $p = 0,003$  em relação ao Ptd). Somente o grupo Ptd+Tm+Tr reverteu totalmente a perda de memória (6,15 s  $\pm$  3,83,  $p = 0,239$  em relação ao controle).

**Figura 12** - Teste de memória espacial em labirinto aquático de Morris com camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação. Animais foram submetidos a um (protocolo A) ou dois (protocolo B) ciclos de deficiência de tiamina, seguidos de tratamentos.

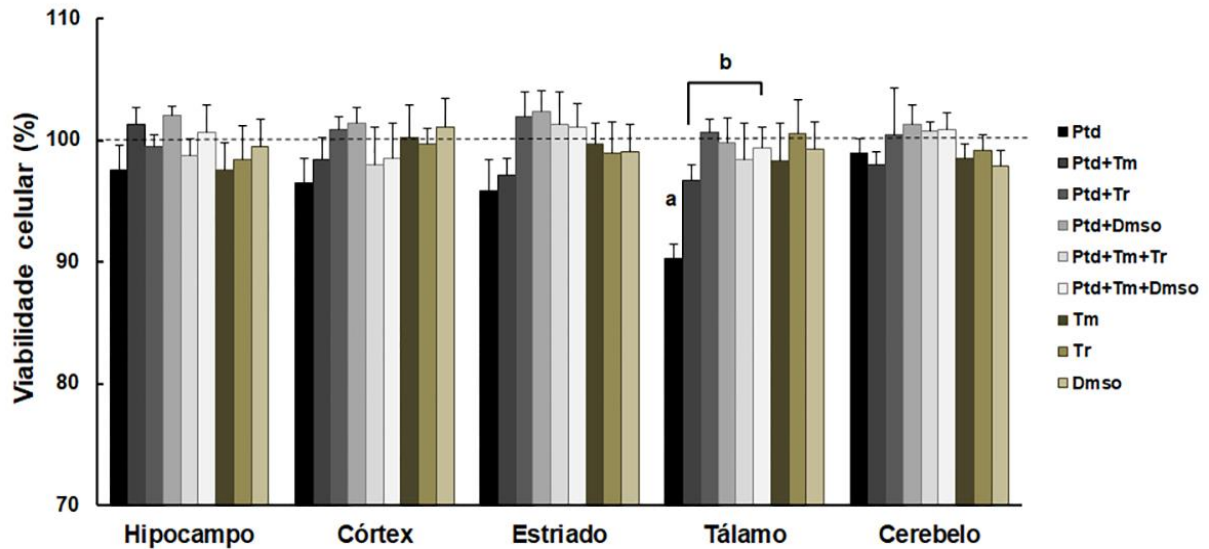


Dados são expressos como média (s)  $\pm$  E.P.M. (n = 6). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd, <sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd+Tm e Ptd+Tr.

### 5.3 Viabilidade celular

Após um período de indução de DT, seguido de recuperação (protocolo A), observamos que os animais do grupo Ptd apresentaram queda da viabilidade celular ( $-9,71\% \pm 1,21$ ,  $p = 0,004$  em relação ao controle) somente no tálamo (Figura 13). De forma interessante, todos os grupos de tratamento de recuperação apresentaram reversão deste efeito, seja pela administração isolada das substâncias neuroprotetoras (grupos Ptd+Tm, Ptd+Tr e Ptd+Dms) ou suas associações (grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+Dms), sem variações entre si.

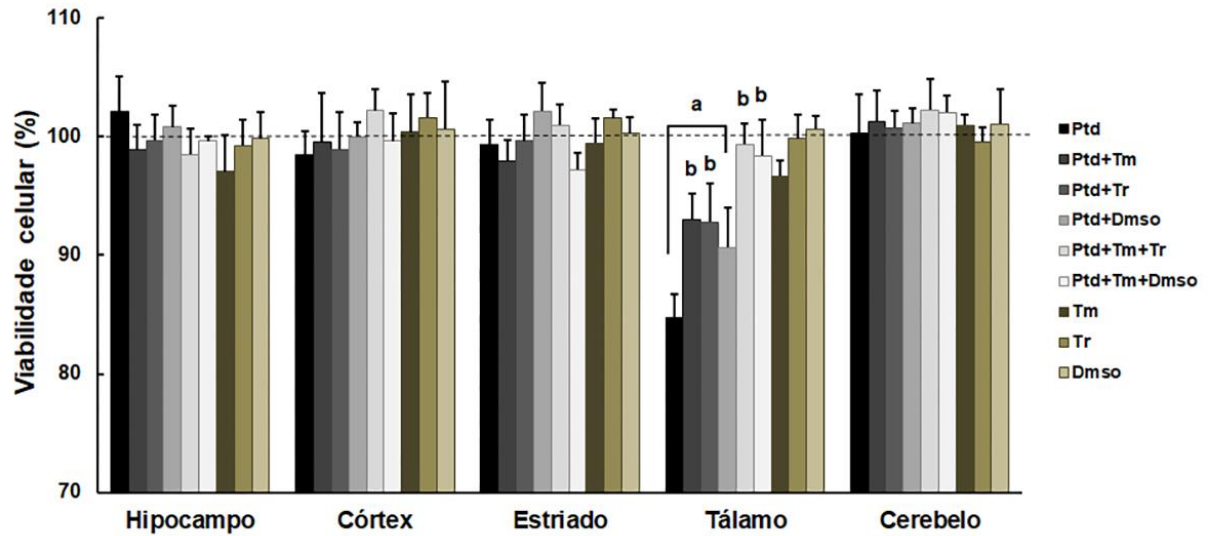
**Figura 13** - Viabilidade celular no encéfalo de camundongos deficientes em tiamina, após um episódio de DT seguido de tratamentos de recuperação (protocolo A).



Dados são expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). Valores representam média  $\pm$  E.P.M. (n = 6). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd.

Ao se submeter os animais a dois períodos de indução de DT, seguidos dos tratamentos de recuperação (protocolo B) com ou sem as diferentes substâncias neuroprotetoras (tiamina, Trolox e DMSO), observamos que os animais apresentaram queda da viabilidade celular somente no tálamo, nos grupos Ptd ( $-15,32\% \pm 2,00$ ,  $p = 0,0001$ ), Ptd+Tm ( $-7,00\% \pm 1,20$ ,  $p = 0,05$ ), Ptd+Tr ( $-7,19\% \pm 1,65$ ,  $p = 0,05$ ) e Ptd+DmsO ( $-9,33\% \pm 2,31$ ,  $p = 0,01$ ), em relação ao controle (Figura 14). De forma interessante, os grupos Ptd+Tm, Ptd+Tr, Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+DmsO, de tratamento de recuperação, apresentaram reversão deste efeito. Entretanto, com a administração isolada das substâncias neuroprotetoras (grupos Ptd+Tm e Ptd+Tr) a proteção foi parcial e, em associações (grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+DmsO), a proteção foi total.

**Figura 14** - Viabilidade celular no encéfalo de camundongos deficientes em tiamina, após dois episódios de DT seguidos de tratamentos de recuperação (protocolo B).



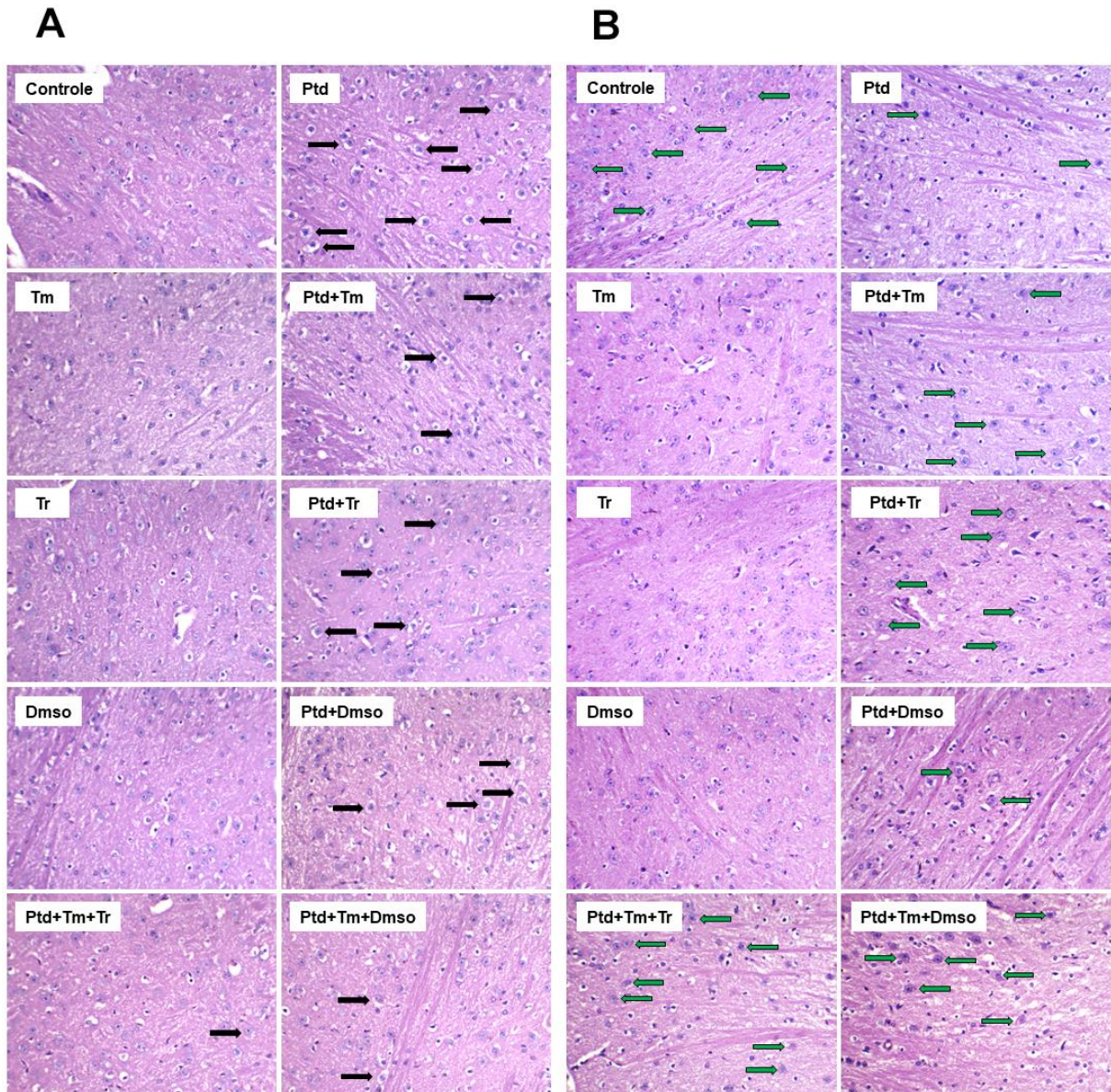
Dados são expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). Valores representam média  $\pm$  E.P.M. (n = 6). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd.

#### 5.4 Histopatologia

Apesar dos animais passarem por um período de recuperação de sete dias após o insulto agudo de deficiência, observamos que nos grupos DT do protocolo A, houve permanência de vacuolização (degeneração hidrópica) em células neuronais do tálamo dorsal (Figura 15A). Por outro lado, nos grupos DT do protocolo B, houve acentuada redução da população celular neuronal talâmica (Figura 15B). Não foram observadas alterações em outras estruturas, em ambos os protocolos.



**Figura 15** - Histopatologia do tálamo de camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação.

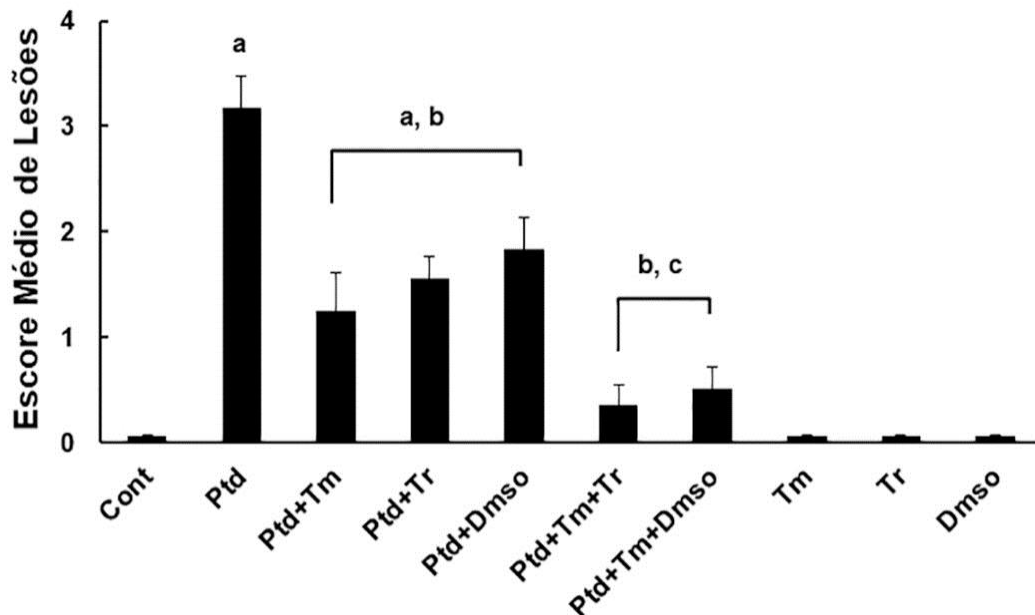


**(A)** Animais submetidos a insulto agudo de DT seguido de recuperação. **(B)** Animais submetidos a dois ciclos de insulto agudo seguidos de recuperação. O painel ilustra imagens representativas, com neurônios exibindo vacuolização (setas pretas) e variação no número de neurônios talâmicos (setas verdes). HE, objetiva 40x.

Apesar de todos os grupos deficientes, com ou sem tratamentos (grupos Ptd, Ptd+Tm, Ptd+Tr, Ptd+Dmso, Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+Dmso) apresentarem vacuolização de neurônios após a recuperação no protocolo A, observamos redução da intensidade da lesão (frequência de neurônios vacuolizados) nos animais que receberam tiamina, Trolox ou DMSO. De forma interessante, a redução das lesões foi mais intensa nos animais tratados com a associação de tiamina com Trolox ou com DMSO (grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+Dmso), com apenas raros neurônios vacuolizados na região talâmica (Figura 15A). O EML do grupo Ptd foi de  $3,17 \pm$

0,31 ( $p = 0,00001$  em relação ao controle), reduzindo para  $1,25 \pm 0,36$ ,  $1,55 \pm 0,22$  e  $1,83 \pm 0,31$  nos grupos Ptd+Tm, Ptd+Tr e Ptd+Dmsso, respectivamente ( $p = 0,0001$ , em relação ao grupo Ptd; Figura 16). Entretanto, ao associarmos a tiamina com Trolox ou DMSO na recuperação, a redução do EML foi marcante, com valores de  $0,35 \pm 0,20$  e  $0,50 \pm 0,22$  (grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+Dmsso, respectivamente;  $p = 0,00002$  em relação ao grupo Ptd e  $p = 0,001$  em relação aos grupos Ptd+Tm, Ptd+Tr e Ptd+Dmsso).

**Figura 16** - Avaliação do escore médio de lesões (EML) no tálamo de camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação no protocolo A.

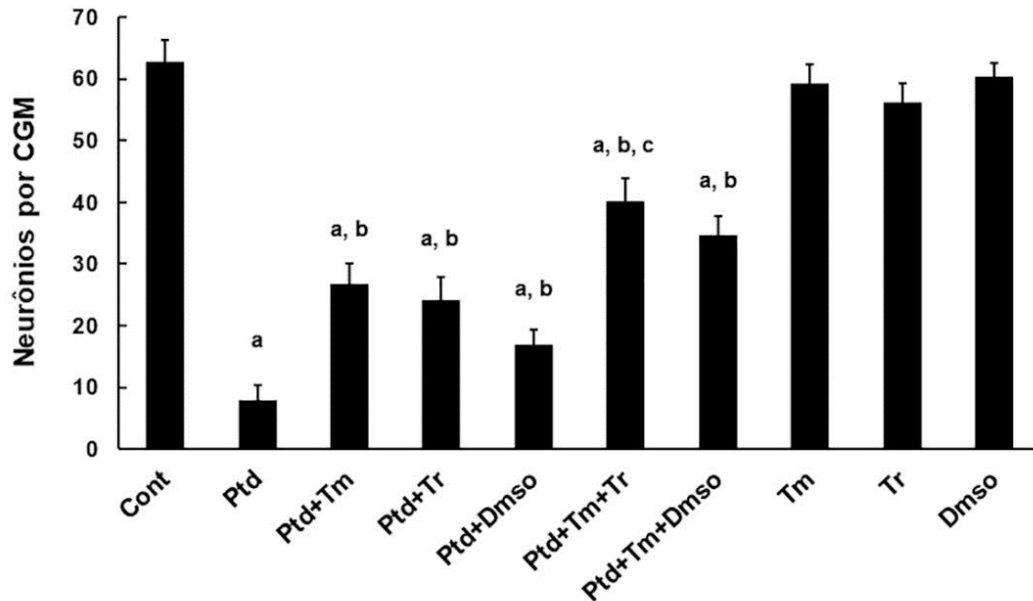


Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M., da escala EML de 0 a 4 ( $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd, <sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  comparado aos grupos Ptd+Tm, Ptd+Tr e Ptd+Dmsso.

Após dois ciclos de DT seguidos de recuperação (protocolo B), apesar de não ser observado degeneração celular (Figura 15B), a quantificação celular revelou redução da população neuronal no tálamo dorsal nos animais deficientes, com perda atenuada nos animais que receberam as substâncias neuroprotetoras. A população neuronal do grupo Ptd foi de  $7,83 \pm 2,50$  neurônios/CGM ( $p = 0,00002$  em relação ao controle,  $62,67 \pm 3,56$ ), elevando para  $26,67 \pm 3,31$ ,  $24,00 \pm 3,90$  e  $16,83 \pm 2,60$  nos grupos Ptd+Tm, Ptd+Tr e Ptd+Dmsso, respectivamente ( $p = 0,001$ , em relação ao grupo Ptd (Figura 17). Ao associarmos a tiamina com Trolox ou com DMSO na recuperação, a população de neurônios/CGM foi de  $40,17 \pm 3,66$  e  $34,67 \pm 3,11$

(grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+DmsO, respectivamente;  $p = 0,00003$  em relação ao grupo Ptd), sendo que a associação de tiamina com Trolox (Ptd+Tm+Tr) foi mais eficaz do que a tiamina isolada ( $p = 0,005$  em relação ao Ptd+Tm).

**Figura 17** - Quantificação da população celular neuronal no tálamo de camundongos deficientes em tiamina, após tratamentos de recuperação no protocolo B.



Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M., de três campos de grande aumento ( $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd, <sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupos Ptd+Tm.

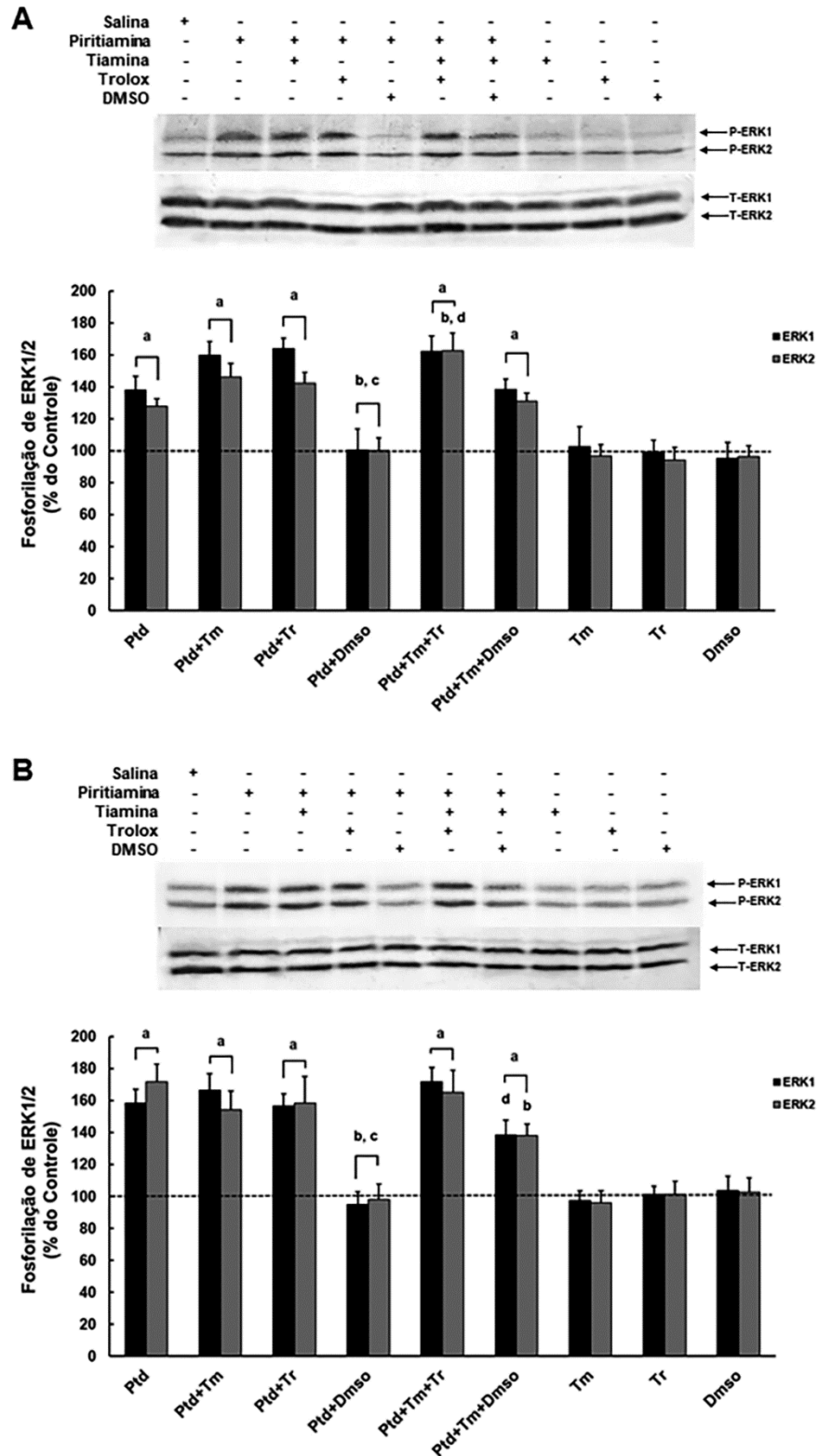
### 5.5 Western blot

Nas avaliações de *western blot*, investigamos a modulação da fosforilação de ERK1/2. Nos tratamentos de um ciclo de deficiência e recuperação (protocolo A, Figura 18), observamos aumentos da fosforilação de ERK no córtex cerebral (Figura 18A), nos grupos Ptd (ERK1  $38,01\% \pm 8,56$ ,  $p = 0,007$ , ERK2  $27,72\% \pm 4,79$ ,  $p = 0,011$ , em relação ao grupo Cont), Ptd+Tm (ERK1  $59,63\% \pm 8,80$ ,  $p = 0,00009$ , ERK2  $46,01\% \pm 8,67$ ,  $p = 0,0001$ , em relação ao grupo Cont), Ptd+Tr (ERK1  $63,88\% \pm 6,45$ ,  $p = 0,00004$ , ERK2  $42,22\% \pm 6,67$ ,  $p = 0,0003$ , em relação ao grupo Cont), Ptd+Tm+Tr (ERK1  $62,04\% \pm 9,69$ ,  $p = 0,00006$ , ERK2  $62,62\% \pm 11,01$ ,  $p = 0,00002$ , em relação ao grupo Cont) e Ptd+Tm+DmsO (ERK1  $38,17\% \pm 6,62$ ,  $p = 0,008$ , ERK2  $30,97\% \pm 5,11$ ,  $p = 0,006$ , em relação ao grupo Cont).

De forma similar, no tálamo (Figura 18B) observamos aumentos da fosforilação de ERK nos grupos Ptd (ERK1  $58,16\% \pm 8,59$ ,  $p = 0,00004$ , ERK2  $71,77\% \pm 11,08$ ,  $p = 0,0001$ , em relação ao grupo Cont), Ptd+Tm (ERK1  $66,46\% \pm 10,44$ ,  $p = 0,00002$ , ERK2  $54,19\% \pm 11,53$ ,  $p = 0,0012$ , em relação ao grupo Cont), Ptd+Tr (ERK1  $56,63\% \pm 7,45$ ,  $p = 0,00005$ , ERK2  $58,51\% \pm 16,64$ ,  $p = 0,0006$ , em relação ao grupo Cont), Ptd+Tm+Tr (ERK1  $71,79\% \pm 8,79$ ,  $p = 0,00002$ , ERK2  $64,99\% \pm 13,97$ ,  $p = 0,0002$ , em relação ao grupo Cont) e Ptd+Tm+Dms0 (ERK1  $38,23\% \pm 9,38$ ,  $p = 0,0019$ , ERK2  $37,90\% \pm 7,39$ ,  $p = 0,020$ , em relação ao grupo Cont).

De forma interessante, o grupo Ptd+Dms0 não apresentou este efeito em ambas as estruturas encefálicas. Entretanto, nos grupos tratados com DMSO associado à tiamina (grupo Ptd+Tm+Dms0), o aumento de fosforilação de ERK2 no córtex cerebral ( $p = 0,005$ ) e de ERK1 no tálamo ( $p = 0,007$ ) foi menos intenso, em relação ao grupo Ptd+Tm+Tr.

**Figura 18** - Efeitos da deficiência de tiamina sobre a fosforilação de ERK1/2, após tratamentos de recuperação no protocolo A.

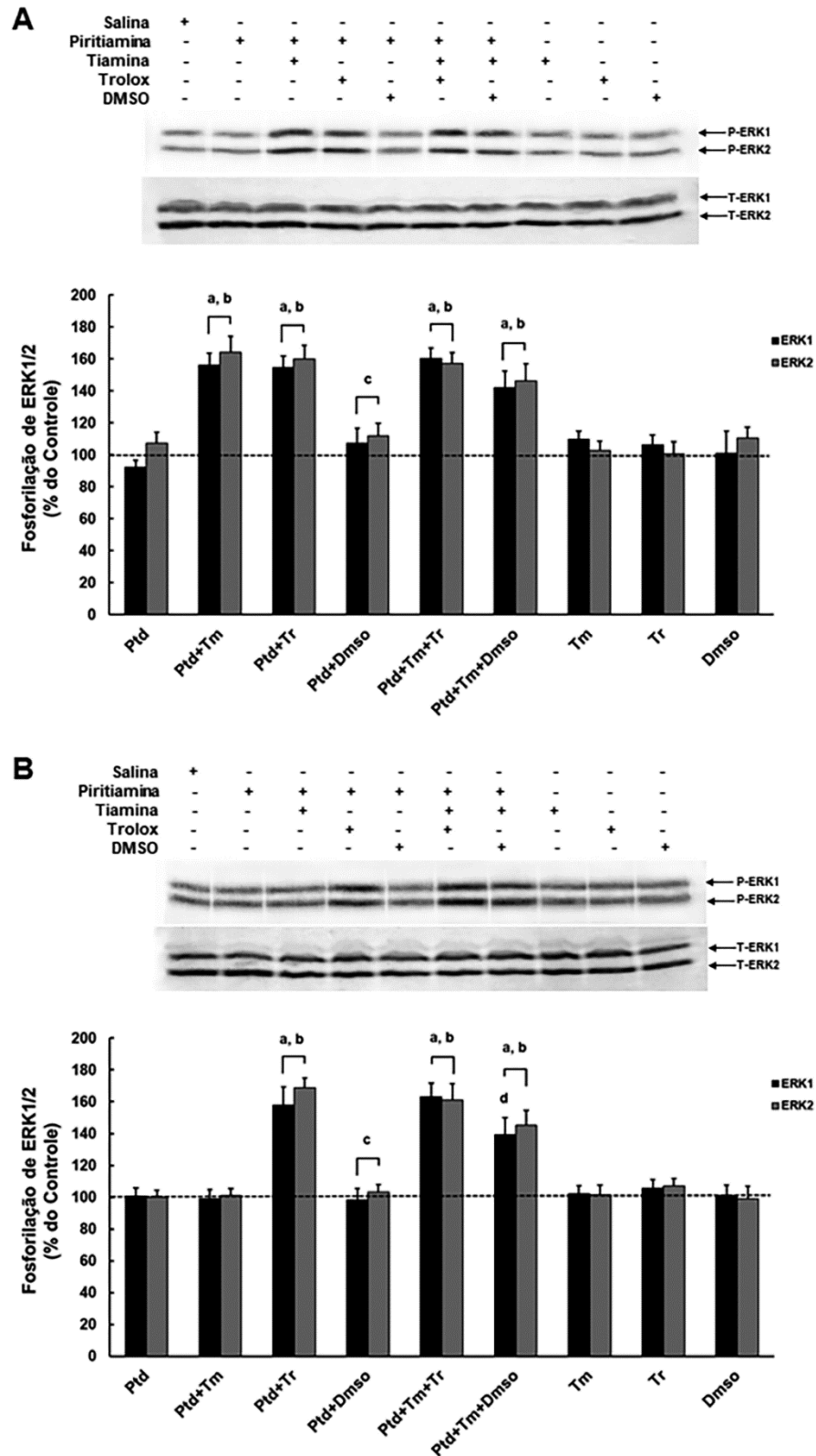


O painel mostra imagens representativas de *immunoblottings* e quantificações de ERK1/2 no córtex cerebral (**A**) e tálamo (**B**) dos animais submetidos ao protocolo A. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens relativas ao controle (considerado 100%,  $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd, <sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd+Tm+Dmso, <sup>d</sup>  $p \leq 0,05$  entre os grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+Dmso.

Por outro lado, nos tratamentos do protocolo B (Figura 19), não observamos aumento da fosforilação de ERK no grupo Ptd, tanto no córtex cerebral ( $p \cong 0,50$ ) quanto no tálamo ( $p \cong 0,97$ ). No córtex (Figura 19A), observamos aumentos na fosforilação de ERK1/2 nos grupos que receberam tiamina (Ptd+Tm; ERK1  $55,83\% \pm 7,74$ ,  $p = 0,00005$ , ERK2  $64,03\% \pm 9,94$ ,  $p = 0,00002$ , em relação ao grupo Cont) ou Trolox (Ptd+Tr; ERK1  $54,67\% \pm 7,05$ ,  $p = 0,00006$ , ERK2  $59,83\% \pm 8,49$ ,  $p = 0,00002$ , em relação ao grupo Cont), bem como nos grupos tratados com as associações de tiamina com Trolox (Ptd+Tm+Tr; ERK1  $60,09\% \pm 6,54$ ,  $p = 0,00003$ , ERK2  $56,92\% \pm 7,06$ ,  $p = 0,00003$ , em relação ao grupo Cont) ou DMSO (grupo Ptd+Tm+Dms; ERK1  $42,10\% \pm 10,32$ ,  $p = 0,001$ , ERK2  $46,14\% \pm 10,59$ ,  $p = 0,003$ , em relação ao grupo Cont).

No tálamo (Figura 19B), observamos aumentos na fosforilação de ERK1/2 nos grupos Ptd+Tr (ERK1  $58,02\% \pm 11,1$ ,  $p = 0,00003$ , ERK2  $68,75\% \pm 6,15$ ,  $p = 0,00002$ , em relação ao grupo Cont), Ptd+Tm+Tr (ERK1  $63,17\% \pm 8,52$ ,  $p = 0,00002$ , ERK2  $61,07\% \pm 10,46$ ,  $p = 0,00002$ , em relação ao grupo Cont) e grupo Ptd+Tm+Dms (ERK1  $39,21\% \pm 10,64$ ,  $p = 0,001$ , ERK2  $45,16\% \pm 9,57$ ,  $p = 0,00005$ , em relação ao grupo Cont). Entretanto, a intensidade do aumento da fosforilação de ERK1 no grupo Ptd+Tm+Dms foi menor, quando comparada ao grupo Ptd+Tm+Tr ( $p = 0,03$ ).

**Figura 19** - Efeitos da deficiência de tiamina sobre a fosforilação de ERK1/2, após tratamentos de recuperação no protocolo B.



O painel mostra imagens representativas de *immunoblottings* e quantificações de ERK1/2 no córtex cerebral (A) e tálamo (B) dos animais submetidos ao protocolo B. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens relativas ao controle (considerado 100%,  $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd, <sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Ptd+Tm+DmsO, <sup>d</sup>  $p \leq 0,05$  entre os grupos Ptd+Tm+Tr e Ptd+Tm+DmsO.

## 6. DISCUSSÃO

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., 2016). Segundo Bâ (2012), a tiamina tem papel fisiológico crucial na programação da homeostase, incremento e ponto de ajuste do peso corporal em roedores.

Na análise comportamental os dados mostram que após sete dias dos insultos agudos de DT, os animais manifestaram alterações psicomotoras, apesar do restabelecimento da dieta padrão, com tiamina. Os animais deficientes que receberam tiamina injetável em doses terapêuticas apresentaram atenuação de algumas alterações, após as recuperações de sete dias. De forma interessante, os animais que receberam Trolox ou DMSO isoladamente, também apresentaram redução nas alterações de alguns parâmetros, o que sugere o possível envolvimento de estresse oxidativo e inflamação na patogenia dos distúrbios neurológicos (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). Entretanto, os animais DT que receberam tratamento de tiamina associada ao Trolox ou ao DMSO, apresentaram potencialização dos efeitos neuroprotetores. Assim, as substâncias testadas apresentam potencial terapêutico associado à tiamina no tratamento da deficiência. O aumento da eficácia terapêutica e amenização de distúrbios neurológicos tardios advindos da DT têm apresentado grande importância atualmente (ABDOU; HAZELL, 2015).

Neste estudo, foi utilizada a piritiamina, um inibidor da pirofosfocinase, enzima que converte a tiamina na sua forma ativa, para induzir a deficiência. O modelo de DT induzido por piritiamina tem se mostrado bastante útil nos estudos de mecanismos relacionados à neurodegeneração e em investigações das bases neurobiológicas de aspectos comportamentais (BUENO, 2015). Os antagonistas da tiamina interferem nos mecanismos metabólicos da tiamina e suas funções. Entretanto, dentre os antagonistas da tiamina, a piritiamina é considerada mais eficiente (CHORNY et al., 2017).

A DT reduz os níveis de pirofosfato de tiamina (TPP), necessária para utilização de glicose no SNC (MANCINELLI, 2003). A tiamina é transportada para o encéfalo e fosforilada pela tiamina pirofosfocinase. A inibição desta enzima ocorre por antagonistas como a piritiamina, resultando na diminuição da síntese de TPP (DESJARDINS; BUTTERWORTH, 2005). Tratamento de animais experimentais com piritiamina acarreta redução generalizada das concentrações de TPP no tecido nervoso e uma perda seletiva precoce na atividade de  $\alpha$ -



cetoglutarato desidrogenase em regiões como o tálamo, onde há manifestação de perda seletiva de células neuronais (HÉROUX; BUTTERWORTH, 1995). A diminuição da atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase após o tratamento com pirritiamina está associada à diminuição da síntese de aminoácidos excitatórios e inibitórios derivados de glicose, incluindo glutamato, aspartato e ácido gama-aminobutírico (GABA), com aumento concomitante de lactato (BUTTERWORTH; HEROUX, 1989), consistente com diminuição do fluxo de carbono através do ciclo do ácido tricarboxílico. Diminuições na atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase levam à cessação da oxidação da glicose mitocondrial e morte celular (GIBSON et al., 1984).

O tratamento com pirritiamina também 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 deficientes, tem sido associada ao processo inflamatório devido à presença de microglia ativada e acúmulo microglial, da indução da óxido nítrico sintase endotelial e de alterações na barreira hematoencefálica (KE; GIBSON, 2004).

Os dados do protocolo A, mostram que mesmo após sete dias do insulto agudo de DT, os animais ainda manifestam lesões morfológicas no SNC, apesar do restabelecimento da dieta padrão, com tiamina. Como esperado, os animais deficientes que receberam tiamina injetável em doses terapêuticas, apresentaram atenuação de alterações, após a recuperação de sete dias. Os animais que receberam Trolox ou DMSO isoladamente, também apresentaram redução na intensidade de lesões, o que evidencia o envolvimento de estresse oxidativo e inflamação na patogenia da neurodegeneração (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013).

Entretanto, este efeito foi mais intenso após recidiva da DT (protocolo B), resultando inclusive, em permanência de queda de viabilidade mesmo em grupos tratados com substâncias neuroprotetoras. Alguns trabalhos demonstram que, mesmo em período de tratamento de recuperação, animais que recebem tiamina em altas doses após episódio agudo de deficiência, continuam a exibir perda neuronal até ao menos três dias depois do início da recuperação (KE et al., 2003).

Os animais deficientes que receberam tiamina injetável em doses terapêuticas (100 mg/kg) após um episódio de DT, apresentaram atenuação da queda de viabilidade celular, após a recuperação de sete dias, efeito que foi parcialmente abolido quando houve recidiva. Estes dados sugerem que, por mais que ainda ocorra perda neuronal durante o início da recuperação, gradativamente as células recuperam sua atividade metabólica, em um primeiro momento.

Ainda, os animais DT que receberam tratamento de recuperação, com administração de tiamina associada ao antioxidante Trolox ou anti-inflamatório DMSO, apresentaram recuperação mais evidente, com maior redução das alterações celulares no tálamo.

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. A neuroinflamação pode alterar o potencial de membrana mitocondrial e a função muscular, resultando em aumento das EROs. Contudo, o estresse oxidativo também pode induzir neuroinflamação (LIU; KE; LUO, 2016).

O teste do rotarod representa, juntamente com o campo aberto, a principal abordagem visual para caracterização motora em modelos animais (BROOKS; DUNNET, 2009). Nos testes comportamentais, observamos que os tempos de latência para queda nos animais deficientes apresentaram redução em relação ao controle. Somente as administrações associadas de tiamina com Trolox ou com DMSO reverteram os efeitos da DT. Por outro lado, após dois períodos de DT, a redução do tempo de latência para queda não foi revertida apenas no grupo Ptd+Tm. O baixo desempenho no rotarod, de animais que são expostos à DT pode ser explicado, pelo menos em parte, pela vulnerabilidade seletiva à deficiência de tiamina, de algumas estruturas encefálicas (LAVOIE; BUTTERWORTH, 1995). Outra possível hipótese para os déficits de equilíbrio e coordenação motora observados nos animais seria a perda de ou redução na comunicação excitatória do cerebelo com outras estruturas encefálicas relacionadas com a motricidade, principalmente o estriado. Por causa da existência de conexões do cerebelo com esta estrutura, via núcleos talâmicos (ICHNOHE; SHOUMURA, 2000) é possível que danos na estrutura cerebelar provoquem interrupção da comunicação excitatória glutamatérgica (UUSISAARI et al., 2007).

Nosso estudo sugere que o DMSO atua na transmissão sináptica do glutamato, auxiliando na locomoção dos animais (TSVYETLYNSKA et al., 2005). Alguns estudos apontam importantes alterações neuroquímicas em animais DT, envolvendo prejuízos da síntese e/ou liberação de neurotransmissores (VETRENO et al., 2012), principalmente nos sistemas glutamatérgicos (TODD; BUTTERWORTH, 1999).

De acordo com Freeman et al. (1987), a diminuição do comportamento exploratório dos animais DT, em 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. Assim como demonstrado por Medeiros et al. (2020), 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 sugerem prejuízos à coordenação motora e equilíbrio dos animais, pois esta região é responsável pela transmissão e direcionamento dos sinais motores e sensitivos.

A deficiência de tiamina 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. O acúmulo de sódio no líquido intracelular atrai, por efeito osmótico, a água para o interior da célula, aumentando o volume celular e levando às alterações morfológicas encontradas no sistema nervoso central de animais acometidos pela DT (MACHADO et al, 2017). 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 reduzindo a intensidade de lesões histológicas. Estes achados evidenciam o envolvimento de distúrbios que geram estresse oxidativo e processos inflamatórios na DT.

De forma interessante, os animais submetidos aos protocolos de indução de deficiência seguidos de recuperação, exibiram evidente modulação da fosforilação de ERK1/2, no córtex cerebral e no tálamo. Entretanto, é interessante observar que dos grupos deficientes que não receberam substâncias neuroprotetoras na recuperação (grupo Ptd), foi observado aumento da fosforilação de ERK1/2 somente no grupo submetido a um ciclo de deficiência e recuperação (protocolo A). Porém, os grupos deficientes que receberam as substâncias, mantiveram a fosforilação de ERK1/2 elevada, após dois ciclos de deficiência e recuperação. Estes dados sugerem que o envolvimento da via da ERK1/2 pode ter efeito citoprotetor, pois a modulação persistente ao longo dos tratamentos coincide com a atenuação de outros efeitos deletérios observados no estudo. Ainda, os níveis elevados de fosforilação de ERK1/2 no grupo Ptd (protocolo A), que não recebeu substâncias neuroprotetoras adicionais durante a recuperação, indica que possivelmente também há mecanismos endógenos de ativação da via, para promoção

de citoproteção neste momento inicial dos distúrbios induzidos pela DT. Entretanto, aparentemente este efeito é perdido em estágios mais avançados e recorrentes (protocolo B).

As implicações referentes à possível modulação e caracterização do envolvimento das vias de sinalização, como as MAPKs e seus alvos durante a DT no SNC, não são conhecidas e necessitam ser investigadas. 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 DT. Um estudo *in vitro* com cultura de células neuronais, demonstrou a inibição da atividade de JNK1, associada ao desencadeamento de apoptose neuronal seletiva na deficiência da vitamina (WANG et al., 2000). Por outro lado, um trabalho *in vitro* relaciona um possível aumento de atividade da proteína cinase C (PKC) com disfunção no transporte de glutamato em astrócitos em cultura (KAWAKAMI; IKARASHI; KASE, 2010). Além destes, outro estudo em células PC12 sugere o envolvimento do fator indutor de apoptose derivado da mitocôndria e de caspase-3 nos mecanismos de morte celular desencadeada por DT (CHORNY; PARKHOMENKO; CHORNA, 2007). Além disso, recentemente demonstramos o forte aumento de fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> no tálamo e no córtex cerebral de camundongos, em estágio agudo de DT (MEDEIROS et al., 2020). Entretanto, diferente do aparente efeito do envolvimento da ERK1/2 na DT após tratamentos de recuperação, a via da p38<sup>MAPK</sup> parece estar envolvida diretamente no mecanismo de neurodegeneração. Estudos adicionais para elucidar a patogenia são necessários.

Em conjunto, os dados mostram que o Trolox e o DMSO, além de seu uso como ferramentas para investigação da patogenia da DT, abrem um leque de possibilidades para possíveis intervenções terapêuticas em distúrbios neurodegenerativos, principalmente quando utilizados concomitantemente à terapia com a tiamina.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados, conclui-se que:

- Os animais deficientes em tiamina, após sete dias de recuperação com alimentação padrão, permanecem com lesões celulares degenerativas no tálamo e com alterações psicomotoras, como ansiedade, perda de coordenação motora e perda de memória, bem como com distúrbios funcionais celulares no tálamo;
- Os tratamentos de recuperação com as substâncias neuroprotetoras (tiamina, Trolox, dimetilsulfóxido) amenizaram as alterações celulares talâmicas e parcialmente as alterações comportamentais e restabeleceram a viabilidade celular talâmica após um episódio de deficiência;
- A administração associativa de tiamina com Trolox e de tiamina com dimetilsulfóxido, mostrou resultados significativamente melhores, evidenciando que o sinergismo farmacológico potencializa a recuperação do tecido nervoso;
- Os efeitos psicomotores são acentuados após período de recidiva de deficiência, mostrando um efeito progressivo do distúrbio neurológico;
- A administração associativa de tiamina com Trolox ou DMSO promoveu resultados significativamente melhores para os distúrbios neurológicos, sugerindo que o estresse oxidativo e a inflamação são fatores associados às alterações comportamentais;
- Apesar do dimetilsulfóxido atenuar alguns dos efeitos da deficiência de tiamina, seu uso mostra restrições para alguns aspectos, particularmente na perda de memória;
- Os efeitos deletérios ao metabolismo celular são aumentados após recorrência de deficiência;
- No estabelecimento de deficiência recorrente, somente os tratamentos associativos de tiamina com Trolox ou de tiamina com dimetilsulfóxido, reverteram totalmente a queda de viabilidade celular;
- Houve modulação da via da ERK1/2, com aumentos da fosforilação no córtex cerebral e tálamo, em ambos os períodos de indução de deficiência e recuperação. Porém, após episódio recorrente de deficiência, a fosforilação aumentada manteve-se somente nos animais que receberam substâncias neuroprotetoras, o que sugere a participação da via como um mecanismo endógeno de neuroproteção;

- Observa-se que as substâncias testadas (Trolox e DMSO) são potenciais neuroprotetores, coadjuvantes à tiamina no tratamento da deficiência. Aparentemente aumentam a eficácia terapêutica e amenizam distúrbios neurológicos advindos da DT. Estes dados são relevantes, devido a conhecida permanência de sequelas neurológicas em indivíduos afetados por DT, mesmo quando submetidos a tratamentos-padrão com tiamina, isoladamente;
- Existe a possibilidade de efetiva aplicabilidade dos resultados aos pacientes, dentro dos conceitos da pesquisa científica translacional. Pois o trabalho é desenvolvido através de um modelo experimental consagrado, utilizando-se animais de laboratório (camundongos) os quais apresentam aspectos anatômicos e fisiopatológicos da deficiência de tiamina idênticos ao ser humano;
- É fundamental essa investigação de estratégias que potencializem a terapêutica ao indivíduo acometido, mas mantendo o princípio da simplicidade e baixo custo de aplicabilidade à população.

## 8 PERSPECTIVAS

Como o estudo não abrangeu todas as estruturas encefálicas, espera-se que com a continuidade das análises, possam ser realizados os seguintes estudos complementares:

- Análise histomorfométrica de estruturas encefálicas dos animais tratados, em ambos os protocolos (hipocampo, corpo estriado, córtex cerebral e hipotálamo);
- Avaliação da modulação da fosforilação de p38<sup>MAPK</sup>, no córtex cerebral e tálamo, nos animais-modelo após tratamentos de recuperação (protocolos A e B).

## REFERÊNCIAS

- 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.
- AGUIAR JR., A. S. 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.
- ANDERSON, S. H.; VICKERY, C. A.; NICOL, A. D. Adult Thiamine Requirements and the Continuing Need to Fortify Processed Cereals. **Lancet**, v. 2, n. 8498, p. 85–9, 1986.
- ANJANEYA, A.; SINGH, K. P.; CHERIAN, S.; SAMINATHAN, M.; SINGH, R.; RAMAKRISHNAN, M. A.; MAAN, S.; MAAN, N. S.; HEMADRI, D.; RAO, P. P.; PUTTY, K.; KRISHNAJYOTHI, Y.; MERTENS, P. P. Comparative Neuropathology of Major Indian Bluetongue Virus Serotypes in a Neonatal BALB/c Mouse Model. **Journal of Comparative Pathology**, v. 162, p. 18–28, 2018.
- AOUADI, M. et al. Role of MAPKs in Development and Differentiation: Lessons from Knockout Mice. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1091–8, 2006.
- APLEY, M. D. Consideration of Evidence for Therapeutic Interventions in Bovine Polioencephalomalacia. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 151–161, 2015.
- ATTIAS, J. et al. Auditory System Dysfunction Due to Infantile Thiamine Deficiency: Long-Term Auditory Sequelae. **Audiology and Neurotology**, v. 17, n. 5, p. 309–20, 2012.
- BÂ, A. Functional Vulnerability of Developing Central Nervous System to Maternal Thiamine Deficiencies in the Rat. **Developmental Psychobiology**, v. 47, n. 4, p. 408–14, 2005.
- BÂ, A. Metabolic and Structural Role of Thiamine in Nervous Tissues. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, n. 7, p. 923–31, 2008.
- 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
- BALL, G. F. M. **Vitamins in foods: Analysis, Bioavailability, and Stability**. Taylor & Francis Group. New York, 2006.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENA, S.R.C.G.; PAULA S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23(4):629- 643, 2010
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, **Química Nova**. 29(1):113-123, 2006.



BEDERSON, J. B. et al. Rat Middle Cerebral Artery Occlusion: Evaluation of the Model and Development of a Neurologic Examination. **Stroke**, v. 17, n. 3, p. 472–476, 1986.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M. D. V. C. Vitamina B1. In: **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Ed.1. Barueri: Manole, cap7, p.229-316, 2003.

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. **Guia de consulta para vigilância epidemiológica, assistência e atenção nutricional dos casos de beribéri**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Deficiência de Vitamina B1 – Beribéri**. Disponível em: <[http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape\\_pcan.php?conteudo=deficiencia\\_vitaminab1](http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_pcan.php?conteudo=deficiencia_vitaminab1)>. Acesso em: 01 jun. 2019.

BRASIL, 2015/Banco de dados das Secretarias Estaduais de Saúde do MA, TO e RR, 2004 a 2014. **As ações de enfrentamento do Beribéri no Brasil**. Disponível em [http://www.mds.gov.br/webarquivos/arquivo/seguranca\\_alimentar/caisan/caisan\\_nacional/Pleno%20Executivo/Apresentacoes/2015/ApresentacaoPleno\\_BeriberiMS\\_Fev2015.pdf](http://www.mds.gov.br/webarquivos/arquivo/seguranca_alimentar/caisan/caisan_nacional/Pleno%20Executivo/Apresentacoes/2015/ApresentacaoPleno_BeriberiMS_Fev2015.pdf). Acesso em 08.11.2019

BRAZIL, D. P.; YANG, Z.-Z.; HEMMING, B. a. Advances in Protein Kinase B Signalling: AKTion on Multiple Fronts. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 5, p. 233–42, 2004.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinary**, 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.

BROWN, G. Defects of Thiamine Transport and Metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 37, n. 4, p. 577–585, 2014.

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. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 189–96, mar. 2009.

BUTTERWORTH, R. F. Pathophysiologic Mechanisms Responsible for the Reversible (Thiamine-Responsive) and Irreversible (Thiamine Non-Responsive) Neurological Symptoms of Wernicke’s Encephalopathy. **Drug and Alcohol Review**, v. 12, n. 3, p. 315–322, 1993.

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.

BUTTERWORTH, R. F. Thiamine Deficiency-Related Brain Dysfunction in Chronic Liver Failure. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 189–96, 2009.

CALINGASAN, N. Y.; GIBSON, G. E. Vascular Endothelium Is a Site of Free Radical Production and Inflammation in Areas of Neuronal Loss in Thiamine-deficient Brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 903, n. 1, p. 353–356, 2000

CALINGASAN, N. et al. Novel Neuritic Clusters with Accumulations of Amyloid Precursor Protein and Amyloid Precursor-like Protein 2 Immunoreactivity in Brain Regions Damaged by Thiamine. **American Journal of Pathology**, v. 149, n. 3, p. 1063–1071, 1996.

CARVALHO, F. M. et al. Thiamine Deficiency Decreases Glutamate Uptake in the Prefrontal Cortex and Impairs Spatial Memory Performance in a Water Maze Test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 481–489, 2006.

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. 1093–7, 2010.

CHAVES, R. A. D. et al. Deficiências Nutricionais Pós-Cirurgia Bariátrica Em Adultos Com Obesidade Mórbida. **Revista Medica de Minas Gerais**, v. 17, n. 3/4, p. 121–128, 2007.

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, n. 1, 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.

CHO, Y.-E.; LEE, M.-H.; SONG, B.-J. Neuronal Cell Death and Degeneration through Increased Nitroxidative Stress and Tau Phosphorylation in HIV-1 Transgenic Rats. **PloS One**, v. 12, n. 1, p. e0169945, 2017.

CHORNY, S.; PARKHOMENKO, J.; CHORNA, N. Thiamine Deficiency Caused by Thiamine Antagonists Triggers Upregulation of Apoptosis Inducing Factor Gene Expression and Leads to Caspase 3-Mediated Apoptosis in Neuronally Differentiated Rat PC-12 Cells. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 2, p. 315–322, 2007.

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 / FEBS**, v. 271, n. 11, p. 2060–6, 2004.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 4 ed. Barueri: Manole. 2012.

COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, p.L246-L255, 2002.

CORDOVA, C. A. S. et al. 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 Darpp-32 in the Striatum of Developing Rats, and Impairs Their Motor Function. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.

CORDOVA, F. M. et al. Lead Stimulates ERK1/2 and P38MAPK Phosphorylation in the Hippocampus of Immature Rats. **Brain Research**, v. 998, n. 1, p. 65–72, 2004.

COULTATE, T. P. **Food, the chemistry of its components**. 3. ed. Cambridge: royal society of chemistry, p. 208-244, 1996.

COWAN, K. J.; STOREY, K. B. Mitogen-Activated Protein Kinases: New Signaling Pathways Functioning in Cellular Responses to Environmental Stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 7, p. 1107–1115, 2003.

DAMASCENO, D.C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, v. 5, n. 5, p.355-361, 2002

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, n. 7, p. 1256–63, 2007.

DESJARDINS, P.; BUTTERWORTH, R. F. Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of selective neuronal loss in Wernicke's encephalopathy. **Molecular Neurobiology**, v. 31, n. 1–3, p. 17–25, 2005.

ERIKSON, K. M. et al. Manganese Neurotoxicity: A Focus on the Neonate. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 2, p. 369–377, 2007.

FORMSUS, 2012- 2016. Número de casos de beribéri notificados no município de Araguaína, TO, 2012 a 2016.

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.

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.

- GIBSON, G. E. et al. Correlation of enzymatic, metabolic, and behavioral deficits in thiamin deficiency and its reversal. **Neurochemical Research**, v. 9, n. 6, p. 803–814, jun. 1984.
- HAAS, R. H. Thiamin and the Brain. **Annual Review of Nutrition**, v. 8, p. 483–515, 1988.
- HADDAD, J. J. Mitogen-Activated Protein Kinases and the Evolution of Alzheimer's: A Revolutionary Neurogenetic Axis for Therapeutic Intervention? **Progress in Neurobiology**, v. 73, n. 5, p. 359–77, 2004.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: \_\_\_\_\_. **Free radical in biology an medicine**. New York: Oxford University. p.189- 276, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.
- HARPER, C. The incidence of Wernicke's encephalopathy in Australia: a neuropathological study of 131 cases. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 46, n. 7, p. 593–598, 1983
- 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.
- HÉROUX M.; BUTTERWORTH R.F. Regional alterations of thiamine phosphate esters and of thiamine diphosphate-dependent enzymes in relation to function in experimental Wernicke's encephalopathy. **Neurochemical Research**, v. 20, p. 87–93, 1995.
- ICHNOHE, N. MORI, F. & SHOUMURA, K. A di-synaptic projection from the lateral cerebellar nucleus to the laterodorsal part of the striatum via the central lateral nucleus of the thalamus in the rat. **Brain Research**, v. 880, p. 191–197, 2000.
- INSEL, P. et al. Water – Soluble Vitamins. In: **Nutrition** – 4th ed. Jones and Bartlett Publishers. USA, p. 429-466, 2007.
- 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.
- 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.
- KAWAKAMI, Z.; IKARASHI, Y.; KASE, Y. Glycyrrhizin and Its Metabolite 18 Beta-Glycyrrhetic Acid in Glycyrrhiza, a Constituent Herb of Yokukansan, Ameliorate Thiamine Deficiency-Induced Dysfunction of Glutamate Transport in Cultured Rat Cortical Astrocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 626, n. 2–3, p. 154–8, 2010.
- KE, Z.-J. et al. Reversal of Thiamine Deficiency-Induced Neurodegeneration. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 62, n. 2, p. 195–207, 2003.

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.

KINNULA, V.L. et al. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. **Laboratory Investigation**, v.73, n.1, p.3-19, 1995.

KRIL, J. J. Neuropathology of Thiamine Deficiency Disorders. **Metabolic Brain Disease**, v. 11, n. 1, p. 9–17, 1996.

KUMAR, O., SUGENDRAN, K., VIJAYARAGHAVAN, R. Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur mustard administered to mice by inhalation or percutaneous routes. **Chemico Biological Interactions**. v. 134, n. 1, p. 1-12, 2001.

KUMAR, N. Nutritional Neuropathies. **Neurologic Clinics**, v. 25, n. 1, p. 209–55, 2007.

KUMAR, N. Neurologic Presentations of Nutritional Deficiencies. **Neurologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 107–70, 2010.

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.

LAVOIE, J. & BUTTERWORTH, R. . Reduced Activities of Thiamine- Dependent Enzymes in Brains of Alcoholics in the absence of Wernicke’s Encephalopathy. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 19, p. 1073–1077, 1995.

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.

LU, J. et al. Correlation of Thiamine Metabolite Levels with Cognitive Function in the Non-Demented Elderly. **Neuroscience Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 676–684, 2015.

MACHADO, M., et al. Polioencefalomalacia em ruminantes: aspectos etiológicos, clínicos e anatomopatológicos. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. v. 14, n. 28, p. 1 - 16, 2017.

MALTA, D. C. et al. A Vigilância e o Monitoramento Das Principais Doenças Crônicas Não Transmissíveis No Brasil - Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. suppl 2, p. 3–16, 2015.

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.

MANCINELLI, et al. Simultaneous liquid chromatographic assessment of thiamine, thiamine monophosphate and thiamine diphosphate in human erythrocytes: a study on alcoholics. **Journal of Chromatography B**, v. 789, 2003.

MARTIN, P. R.; SINGLETON, C.K.; HILLER- STURMHOFEL, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Res. Health**, v. 27, p. 134–142, 2003.

MARQUES, A. T. M. P. **Nutrição no idoso: A problemática dos micronutrientes**. 2004. Universidade do Porto, 2004.

MEDEIROS, R. C. N., MORAES, J. O., RODRIGUES, S. D. C.; PEREIRA, L.M.; AGUIAR, H.Q.S.; CORDOVA, C.A.S.; JUNIOR, A.Y.; CORDOVA, F. M. Thiamine Deficiency Modulates p38<sup>MAPK</sup> and Heme Oxygenase-1 in Mouse Brain: Association with Early Tissue and Behavioral Changes. **Neurochemical Research**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02975-7>

MORAES, J. O.; RODRIGUES, S. D. C.; PEREIRA, L. M.; MEDEIROS, R. de C. N.; DE CORDOVA, C. A. S.; DE CORDOVA, F. M. Amprolium Exposure Alters Mice Behavior and Metabolism in Vivo. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 1, n. 4, p. 272–281, 2018.

MORESCHI, E. C. P. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos**. 2006. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos Área de Bromatologia - Mestrado e Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MORRIS, R. Developments of a Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in the Rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 1, p. 47–60, 1984.

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

NAGAI, H. et al. Pathophysiological Roles of ASK1-MAP Kinase Signaling Pathways. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 1–6, 2007.

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

OLIVEIRA, V.S. de. **Influência do processamento em ultrassom no licopeno e vitamina E e B**. 2014. 101 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – Mestrado e Doutorado)– Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2014.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNCIAL DA SAÚDE. **Trabalhando juntos pela saúde: relatório mundial da saúde 2006**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

PADILHA, E. M. et al. Epidemiological Profile of Reported Beriberi Cases in Maranhão State, Brazil, 2006-2008. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 3, p. 449–59, 2011.

PARK, L. C. H.; ZHANG, H.; SHEU, K.-F. R.; CALINGASAN, N. Y.; KRISTAL, B. S.; GORDON LINDSAY, J.; GIBSON, G. E. Metabolic Impairment Induces Oxidative Stress, Compromises Inflammatory Responses, and Inactivates a Key Mitochondrial Enzyme in Microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 5, p. 1948–1958, 1999.

PEREIRA, L. M. et al. Amprolium-Induced Thiamine Deficiency in Mice: Evaluation of a Practical Model by Oral Administration. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 11, n. 3, p. 164–174, 2017.

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.

PINTO, L. S. N. M. et al. Dietary Restriction Protects against Chronic-Ethanol-Induced Changes in Exploratory Behavior in Wistar Rats. **Brain Research**, v. 1078, n. 1, p. 171–181, 2006.

PITKIN, S. R.; SAVAGE, L. M. Age-Related Vulnerability to Diencephalic Amnesia Produced by Thiamine Deficiency: The Role of Time of Insult. **Behavioural Brain Research**, v. 148, p. 93–105, 2004.

POSSER, T. et al. 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.

PRIORI, D. et al. Characterization of bioactive compounds, antioxidant activity and minerals in landraces of pumpkin (*Cucurbita moschata*) cultivated in Southern Brazil. **Food Science and Technology**, Campinas, v.37. n.1, 2016.

RAIVICH, G.; BEHRENS, A. Role of the AP-1 Transcription Factor c-Jun in Developing, Adult and Injured Brain. **Progress in neurobiology**, v. 78, n. 6, p. 347–63, 2006.

RAMA RAO, K. V. et al. Aquaporin-4 in Manganese-Treated Cultured Astrocytes. **Glia**, v. 58, n. 12, 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, p. 1939–1951, 1993.

REZENDE, J.M.; EIJKMAN, O. **Detetive do beribéri**. [2002]. Disponível em: <http://usuários.cultura.com.br/jmrezende>.

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.

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.

ROTH, J. Are There Common Biochemical and Molecular Mechanisms Controlling Manganism and Parkinsonism. **NeuroMolecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 281–296, 2009.

RUSSELL, R. M.; SUTER, P. M. Deficiência e excesso de vitaminas e oligominerais. In: KASPER, D. L. et al. (Ed.). **Medicina Interna de Harrison**. 19. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

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.

SCHENK, U. et al. A Novel Pathway for Presynaptic Mitogen-Activated Kinase Activation via AMPA Receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 7, p. 1654–1663, 2005.

SHEU, K.-F. R. et al. Immunochemical Characterization of the Deficiency of the  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex in Thiamine-Deficient Rat Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 3, p. 1143–1150, 1998.

SILVA, A; ENES, A. Síndrome de Wernicke-Korsakoff: revisão literária da sua base neuroanatômica. **Arquivo Médico**, vol.27, n.3, p.121-127, 2013.

SINGLETON, C. K.; MARTIN, P. R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Curr.Mol.Med**, v. 1, p. 197–207, 2001

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

SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. Extracellular Signal-Regulated Kinase as an Inducer of Non-Apoptotic Neuronal Death. **Neuroscience**, v. 138, n. 4, p. 1055–65, 2006.

SUZUKI, K. et al. High-Dose Thiamine Prevents Brain Lesions and Prolongs Survival of Slc19a3 -Deficient Mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0180279, 2017.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The Use of Histopathological Indicators to Evaluate Contaminant-Related Stress in Fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75–86, 1997.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK Cascade Signalling and Synaptic Plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 173–83, 2004.

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. Evaluation of the Role of NMDA-Mediated Excitotoxicity in the Selective Neuronal Loss in Experimental Wernicke Encephalopathy. **Experimental Neurology**, v. 149, n. 1, p. 130–138, 1998.



- TODD, K.; 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.
- TOLOSA, E. M. C. et al. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003.
- TOREZAN, E. F. G. Revisão Das Principais Deficiências de Micronutrientes No Pós-Operatório Do Bypass Gástrico Em Y de Roux. **International Journal of Nutrology**, v. 6, n. 1, p. 37–42, 2013.
- TSVYETLYNSKA, N. A. et al. **Role of AMPA Receptor Desensitization and the Side Effects of a DMSO Vehicle on Reticulospinal EPSPs and Locomotor Activity**. p. 3951–3960, 2005.
- TÜREYEN, K.; VEMUGANTI, R.; SAILOR, K. A.; DEMPSEY, R. J. Infarct Volume Quantification in Mouse Focal Cerebral Ischemia: A Comparison of Triphenyltetrazolium Chloride and Cresyl Violet Staining Techniques. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, n. 2, p. 203–207, 2004.
- UUSISAARI, M.; OBATA, K.; KNÖPFEL, T. Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 1, p. 901–11, jan. 2007.
- VANNUCCHI, V.; CUNHA, C.F.S. **Vitaminas do Complexo B: Tiamina, Riboflavina, Niacina, Piridoxina, Biotina e Ácido Pantotênico**. Série de Publicações ILSI Brasil, 2009.
- VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007
- 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.
- VICTOR, M. Deficiency Diseases of the Nervous System Secondary to Alcoholism. **Postgraduate Medicine**, v. 50, n. 3, p. 75–9, 1971.
- VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 310–332, 2014.
- XU, B.; XU, Z.; DENG, Y. Protective effects of MK-801 on manganese-induced glutamate metabolism disorder in rat striatum. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 62, p. 381-390, 2010.

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

WAETZIG, V.; HERDEGEN, T. Neurodegenerative and Physiological Actions of C-Jun N-Terminal Kinases in the Mammalian Brain. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1–3, p. 64–7, 2004.

WANG, J.-Z.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Kinases and Phosphatases and Tau Sites Involved in Alzheimer Neurofibrillary Degeneration. **The European journal of Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 59–68, 2007.

WANG, J. J. et al. JNK1 Is Inactivated during Thiamine Deficiency-Induced Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 4, p. 208–15, 2000.

WANG, X. et al. Thiamine Deficiency Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Neurons. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 1045–56, 2007.

WAYMAN, G. A. et al. Activity-Dependent Dendritic Arborization Mediated by CaM-Kinase I Activation and Enhanced CREB-Dependent Transcription of Wnt-2. **Neuron**, v. 50, n. 6, p. 897–909, 2006.

WERNICKE, Carl. **Die akute hamorrhagische Polioencephalitis superior**, p. 229-242, 1881.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atlas: country resources for neurological disorders**. Geneva: World Health Organization, 2004.

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.

ZACHARY, J. F. Sistema nervoso. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 833–972.

ZHU, Y.; LIU, F.; ZOU, X.; TORBEY, M. Comparison of Unbiased Estimation of Neuronal Number in the Rat Hippocampus with Different Staining Methods. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 254, p. 73–79, 2015.

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.

## Anexo 1. Formulação da ração AIN-93M Modificada – Deficiente em Tiamina



Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido  
 Cliente Fabiano Cordova UFTO  
 Data 15/05/2015  
 Validade 13/08/2015 Em geladeira 11/11/2015 Em freezer  
 Manipulador  
 Formula Dieta AIN 93 M Modificada - Deficiente em Tiamina Vit B1  
 Dose (g ou ml) 5.300 1 X  
 Dose (Kg ou L) 5,30

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	46,57000%	Ingredion	1	990522	13/10/16	2.468,210	2.468,210	
	CASEINA	14,00000%	MSI	1	19130T1000	21/03/16	742,000	742,000	
	AMIDO DEXTRINIZADO	15,50000%	Ingredion	1	909110	29/02/16	821,500	821,500	
	SACAROSE	10,00000%	GA	1	0407	04/07/16	530,000	530,000	
	OLEO DE SOJA	4,00000%	Cocamar	1	81502	05/03/2016	212,000	212,000	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%	Farmos	1	D23279	30/07/2017	265,000	265,000	
	MIX MINERAL AIN 93 M	3,50000%	PragSoluções	1	040415	04/04/16	185,500	185,500	
	MIX VIT AIN 93 0% VIT B1	1,00000%	PragSoluções	1	140515	14/05/16	53,000	53,000	
	L CISTINA	0,1800%	Farmos	1	104804	03/04/2018	9,540	9,540	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Farmos	1	3008290	30/07/19	13,250	13,250	
	CORANTE AZUL		Officialis	1					
	BHT	0,0014%	Officialis	1			0,074	0,074	
		100,00140%					5.300	5.300	

diluições: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.  
 Corante azul na água

## Anexo 2. Formulação da ração AIN-93M



Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido  
 Cliente Fabiano Codorva UFTO  
 Data 12/05/15  
 Validade 10/08/15 Em geladeira 08/11/15 Em freezer  
 Manipulador  
 Formula Dieta AIN 93 M  
 Dose (g ou ml) 5,200 Vezes: 1 X  
 Dose (Kg ou L) 5,20

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	46,57000%	Ingredion	1	990522	13/10/16	2.421,640	2.421,640	
	CASEINA	14,00000%	MSI	1	19130T1000	21/03/16	728,000	728,000	
	AMIDO DEXTRINIZADO	15,50000%	Ingredion	1	909110	29/02/16	806,000	806,000	
	SACAROSE	10,00000%	GA	1	0407	04/07/16	520,000	520,000	
	OLEO DE SOJA	4,00000%	Cocamar	1	81502	05/03/2016	208,000	208,000	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%	Farmos	1	D23279	30/07/2017	260,000	260,000	
	MIX MINERAL AIN 93 M	3,50000%	PragSoluções	1	040415	04/04/16	182,000	182,000	
	MIX VIT AIN 93	1,00000%	PragSoluções	1	060415	06/04/16	52,000	52,000	
	L CISTINA	0,1800%	Farmos	1	104604	03/04/2018	9,360	9,360	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Farmos	1	3006290	30/07/19	13,000	13,000	
	BHT	0,0008%	Oficinallis	1			0,042	0,042	
		100,00080%					5.200	5.200	

dilucioes: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

OBS:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento.