



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

**MÍRIAN PEREIRA DA SILVA**

**PERFIL DE MODULAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR POR  
AMPRÓLIO NO SISTEMA NERVOSO DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS**

Araguaína, TO  
2022

**MÍRIAN PEREIRA DA SILVA**

**PERFIL DE MODULAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR POR  
AMPRÓLIO NO SISTEMA NERVOSO DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova.  
Coorientadora: Profa. Dra. Clarissa Amorim Silva de Cordova.

Araguaína, TO  
2022

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

---

S586p Silva, Mirian Pereira da.  
Perfil de modulação das vias de sinalização celular por amprólio no sistema nervoso de camundongos machos e fêmeas. / Mirian Pereira da Silva. – Araguaína, TO, 2022.  
51 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, 2022.

Orientador: Fabiano Mendes de Cordova

Coorientadora : Clarissa Amorim Silva de Cordova

1. Deficiência de Tiamina. 2. Neurodegeneração. 3. MAPK. 4. Estresse Oxidativo. 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).**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me conduzido e permitido chegar até aqui em meio a tantas dificuldades.

Tenho imensa gratidão a minha família, minha mãe Maria da Paz, meu pai João Silva e às minhas irmãs Alice e Ana Débora, vocês são minha base e apoio em tudo que faço, obrigada por sonhar os meus sonhos comigo.

Agradeço aos meus amigos de longa data, que tanto me apoiaram desde o início da minha trajetória nesta universidade. Ao Khayam, que tanto insistiu para que eu me inscrevesse no seletivo. À Francianne que deu todo suporte, me recebeu em sua casa durante o processo seletivo, torceu e ainda torce muito por mim. E aos amigos Hylceffem e Hylcezar que me acolheram de forma tão carinhosa em sua casa e me fizeram sentir parte da família.

Agradeço também aos meus amigos mais recentes: a Bliguele, que em tão pouco tempo se tornou uma amiga tão especial que parece amizade de infância. E aos meus amigos conquistados durante o mestrado: Fabiane, Ézio e Hellen que estiveram comigo durante todos esse processo e serviram de apoio em cada etapa, infelizmente não possível convivermos por mais tempo, mas espero levar essa amizade por muitos anos.

Não poderia deixar de agradecer ao meu tão querido orientador Dr. Fabiano Mendes de Cordova. Obrigada por ter aceito me orientar e por cada conhecimento compartilhado nessa área que era tão desconhecida para eu. Obrigada pela paciência, pelas caronas para a universidade e por ser um professor e orientador tão dedicado com ensino e preocupado com o bem-estar dos seus alunos e orientandos, acredito que você faz a diferença não só na minha vida, mas na vida de casa pessoa que tem a sorte de ser ensinado por você.

Agradeço a cada professor do PPGSaspt, que só agregaram conhecimento e experiência na minha vida profissional e pessoal.

Muito obrigada a todos, vocês fazem parte desta conquista!

## RESUMO

A tiamina é uma vitamina pertencente ao complexo B, também conhecida como vitamina B1 (T+). Sua deficiência no organismo pode resultar em distúrbios relacionados à insuficiência cardíaca e doenças neurológicas. Pouco se conhece sobre os mecanismos relacionados à neurodegeneração induzida pela deficiência de tiamina (DT), além das diferenças de respostas à DT entre indivíduos machos e fêmeas. Utilizando um modelo de deficiência nutricional de tiamina em associação com amprólio, com uso de injeções intraperitoneais em diferentes doses (20, 40, 60 e 80 mg/kg) e diferentes tempos (05, 10, 15 e 20 dias), investigamos a modulação de vias de sinalização intracelular no sistema nervoso de camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, e também o envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação na modulação da sinalização celular e no comportamento de camundongos fêmeas. Nos camundongos machos, observamos progressivo aumento da fosforilação de ERK1/2, tanto no córtex cerebral quanto no tálamo, em resposta à dose de amprólio. Nas fêmeas, não observamos uma resposta progressiva na modulação de ERK1/2 em relação ao aumento da dose de amprólio, evidenciando-se um aumento abrupto da fosforilação nas doses mais altas utilizadas, de 60 e 80 mg/kg. Nos camundongos machos, observamos ainda aumento da fosforilação de ERK1/2 no córtex cerebral em todos os tempos de tratamento de deficiência de tiamina com amprólio. Nas fêmeas, o perfil de modulação de ERK1/2 na deficiência com amprólio foi similar em ambas as estruturas nos diferentes tempos de tratamento. Além disso, observamos significativo envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação na DT em fêmeas, com impactos negativos ao ganho de peso corporal, no comportamento motor, e seus envolvimento na modulação da via de ERK1/2, demonstrados através da atenuação de efeitos com o uso do antioxidante Trolox e do anti-inflamatório dimetil sulfóxido. Os resultados obtidos mostram algumas diferenças entre camundongos machos e fêmeas com relação à modulação de ERK1/2 no sistema nervoso central e em aspectos comportamentais, mas evidenciam a viabilidade de utilização de fêmeas em modelos experimentais para estudo de efeitos neurodegenerativos associados à DT. Além disso, o estudo comprova a eficiência do modelo de deficiência nutricional de tiamina associado ao amprólio.

**Palavras-chave:** Deficiência de tiamina. Neurodegeneração. MAPK. Estresse oxidativo. Inflamação.

## ABSTRACT

Thiamine is a vitamin belonging to the B-complex, also known as vitamin B1 (T+). Its deficiency in the body can result in disorders related to heart failure and neurological diseases. Little is known about the mechanisms related to thiamine deficiency (TD) induced neurodegeneration, and the differences in responses to TD between male and female individuals. Using a model of nutritional deficiency of thiamine in association with amprolium, using intraperitoneal injections at different doses (20, 40, 60 and 80 mg/kg) and different times (05, 10, 15 and 20 days), we investigated the modulation of intracellular signaling pathways in the nervous system of male and female Swiss mice, and also the involvement of oxidative stress and inflammation in the modulation of cell signaling and behavior in female mice. In male mice, we observed progressive increase in phosphorylation of ERK1/2 in both cerebral cortex and thalamus in response to amprolium dose. In females, we did not observe a progressive response in ERK1/2 modulation in relation to the increase in amprolium dose, evidencing an abrupt increase in phosphorylation at the highest doses used, 60 and 80 mg/kg. In male mice, we also observed increased phosphorylation of ERK1/2 in the cerebral cortex at all times of thiamine deficiency treatment with amprolium. In females, the profile of ERK1/2 modulation upon deficiency with amprolium was similar in both structures at the different treatment times. Furthermore, we observed significant involvement of oxidative stress and inflammation in TD in females, with negative impacts on body weight gain, motor behavior, and their involvement in modulation of the ERK1/2 pathway, demonstrated through attenuation of effects with the use of the antioxidant Trolox and the anti-inflammatory dimethyl sulfoxide. The results obtained show some differences between male and female mice regarding the modulation of ERK1/2 in the central nervous system and in behavioral aspects, but highlight the feasibility of using females in experimental models to study neurodegenerative effects associated with TD. Furthermore, the study proves the efficiency of the nutritional thiamine deficiency model associated with amprolium.

**Keywords:** Thiamine deficiency. Neurodegeneration. MAPKs. Oxidative stress. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos machos deficientes em tiamina com diferentes doses de amprólio.....26

**Figura 2.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos fêmeas deficientes em tiamina com diferentes doses de amprólio.....27

**Figura 3.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos machos deficientes em tiamina com amprólio na dose de 60 mg/kg, submetidos a diferentes tempos de tratamento (5, 10, 15 ou 20 dias).....29

**Figura 4.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos fêmeas deficientes em tiamina com amprólio na dose de 60 mg/kg, submetidos a diferentes tempos de tratamento (5, 10, 15 ou 20 dias).....30

### CAPÍTULO 3

**Figura 1.** Teste de coordenação motora com rotarod em camundongos fêmeas deficientes em tiamina com amprólio.....42

**Figura 2.** Teste de campo aberto em camundongos deficientes em tiamina com amprólio.....42

**Figura 3.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos fêmeas deficientes em tiamina com amprólio, tratados ou não com Trolox ou DMSO.....44

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1.</b> Ganho de peso corporal de camundongos fêmeas no modelo de deficiência de tiamina com amprólio, simultaneamente tratados ou não com Trolox ou DMSO.....	40
<b>Tabela 2.</b> Consumo de ração dos camundongos fêmeas no modelo de deficiência de tiamina com amprólio, simultaneamente tratados ou não com Trolox ou DMSO.....	41

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ATP	Trifosfato de adenosina
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
DT	Deficiência de tiamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ERK1/2	Proteínas cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2
E.P.M.	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IL1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
i.p.	Intraperitoneal
JNK1/2	Proteínas cinases c-Jun NH1 terminal 1 e 2
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
mg	Miligrama
mM	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
OH	Hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
p38 <sup>MAPK</sup>	Proteína cinase regulada por mitógeno de 38 kDa
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
T+	Vitamina B1
TDP	Difosfato de tiamina
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TPP	Pirofosfato de tiamina
UFNT	Universidade Federal do Norte do Tocantins
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Deficiência de tiamina.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Modelos experimentais de deficiência de tiamina .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Utilização de animais machos e fêmeas em modelos experimentais .....</b>	<b>13</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO 2. Perfil da modulação de ERK1/2 por amprólio no sistema nervoso central de camundongos machos e fêmeas .....</b>	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Animais .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Indução de deficiência de tiamina .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Western blot .....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Análise estatística .....</b>	<b>25</b>
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Curva de dose-resposta .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Curva de tempo .....</b>	<b>28</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO 3. Deficiência de tiamina com amprólio em camundongos fêmeas: envolvimento de estresse oxidativo e inflamação.....</b>	<b>36</b>

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1 Animais</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2 Indução de deficiência de tiamina</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3 Análise comportamental</b> .....	<b>38</b>
<b>2.4 Western blot</b> .....	<b>39</b>
<b>2.5 Análise estatística</b> .....	<b>40</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1 Ganho de peso e consumo de ração</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2 Análises comportamentais</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3 Avaliação da modulação de ERK1/2</b> .....	<b>43</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO 4. Considerações Finais</b> .....	<b>48</b>

## CAPÍTULO 1

---

### 1 INTRODUÇÃO

A tiamina é uma vitamina pertencente ao complexo B, também conhecida como vitamina B1 (T+), é incolor, hidrossolúvel e pode ser degradada pelo cozimento ou autoclavagem. Possui em sua estrutura química um anel tiazólico unido por uma ponte metilênica a um grupo pirimidínico. É um importante elemento no catabolismo de carboidratos e aminoácidos de cadeia ramificada, atuando como coenzima junto as enzimas piruvato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e transcetolase, que estão presentes nas principais vias do metabolismo da glicose (THOMAZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019; MEDEIROS et al., 2020).

Humanos e a maioria dos outros mamíferos não produzem a tiamina, obtendo-a pela alimentação. No estômago, é hidrolisada e absorvida no intestino delgado, de onde será transportada para os tecidos através da corrente sanguínea e atuará no interior das células. Dentro da célula a tiamina é fosforilada, podendo ser mono, di ou trifosfatada (MARTIN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2019). Como difosfato de tiamina (TDP) ou pirofosfato de tiamina (TPP) atua na respiração celular na descarboxilação oxidativa do piruvato gerando acetil-CoA, que será transportada para o interior da mitocôndria, gerando energia no ciclo do ácido tricarboxílico. Sem o pirofosfato de tiamina, a atividade celular fica comprometida, havendo uma redução na síntese de trifosfato de adenosina (ATP), ocasionando danos e morte celular, principalmente nos tecidos em que há um grande gasto energético, como o tecido nervoso. O TPP atua, ainda, como coenzima da transcetolase, que está presente na via das pentoses, uma via alternativa para a oxidação da glicose. (ÁLVAREZ; VERA, 2008).

A acetil-CoA, gerada a partir do complexo piruvato desidrogenase, também é um importante precursor de outras estruturas como a bainha de mielina, formada a partir de ácidos graxos, e do neurotransmissor acetilcolina (MARTIN et al., 2003).

A transcetolase, enzima dependente da tiamina, é importante, ainda, para a síntese de ácidos nucleicos e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH). Sem o seu funcionamento adequado há um prejuízo na síntese de DNA para a multiplicação celular e de RNA para a síntese proteica (pela falta de pentoses como matéria prima), bem como a falta de NADPH que interfere na produção de

esteroides, ácidos graxos, aminoácidos, alguns neurotransmissores e glutatona, que utilizam o hidrogênio em suas reações químicas (ANDERSEN, 2004).

A vitamina B1 pode ser sintetizada por microrganismos no trato gastrointestinal humano e animais, porém em uma quantidade bastante inferior a necessidade diária, que para humanos é de 1 a 2 mg. São fontes ricas de B1: leveduras, farelo de trigo, cereais integrais e castanhas. É encontrada em quantidade moderada em hortaliças, frutas, ovos, carne de frango, carneiro e gado, e está presente em pequena quantidade no leite. É possível encontrá-la ainda, armazenada nos tecidos nervoso, muscular, hepático e renal. O excesso de consumo de B1 não é considerado prejudicial, sendo excretado pela urina (SINGLETON; MARTIN, 2001; ÁLVAREZ, VERA, 2008).

Por ser um nutriente tão importante no metabolismo celular o consumo de alimentos ricos em vitamina B1 se torna indispensável para a prevenção e manutenção de doenças que podem afetar o tecido nervoso, porém vários são os fatores que podem interferir no consumo, absorção e utilização deste nutriente pelo organismo. Desta forma, estudos experimentais in vivo se tornam interessantes e podem nos trazer diversas respostas a respeito do processo de neurodegeneração na qual a tiamina está envolvida.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Deficiência de tiamina

A deficiência de tiamina (DT) no organismo pode estar relacionada a ingestão deficiente de alimentos que contenham a vitamina B1 ou a má absorção deste nutriente, podendo estar associada ou não com o consumo abusivo de álcool em humanos. O aumento da demanda desta vitamina ou sua perda por hiperemese também podem estar relacionados a sua carência, como nos casos de gravidez, na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e em doenças gastrointestinais (BUTTERWORTH, 2009; KOPELMAN et al., 2009).

São sintomas iniciais da deficiência de tiamina: perda de peso, fraqueza, distúrbios motores, edema e dormências. Com a persistência da falta desta vitamina pode ser afetado tanto o sistema cardiovascular quanto o sistema nervoso central e periférico, estando relacionada a insuficiência cardíaca e a distúrbios neurológicos, bem como neuroinflamação e neurodegeneração, presentes em doenças como Alzheimer, Parkinson e Huntington (ÁLVAREZ; VERA, 2008; OLIVEIRA et al., 2019). Na DT há uma diminuição de 50 a 60% no metabolismo da glicose pelo tecido nervoso, que passa a ser substituída por corpos cetônicos obtidos do metabolismo dos lipídeos (THOMAZ et al., 2014).

A ingestão deficiente em tiamina, além de trazer prejuízos energéticos para os tecidos, tem relação, ainda, com a disfunção na produção de neurotransmissores, acidose láctica e espécies reativas do oxigênio (EROs). A falta da tiamina no interior das células inibe a atividade das desidrogenases mitocondriais, podendo ocorrer a produção de radicais livres, desencadeando um processo de neurotoxicidade. Entretanto, sabe-se que o processo de neurodegeneração é multifatorial, podendo haver uma disfunção bioquímica, metabólica e/ou genética (MARTIN et al., 2003).

As EROS são responsáveis por provocar estresse oxidativo na célula, que ocorre quando há um aumento de substâncias pró-oxidantes ou uma disfunção nos mecanismos antioxidantes, levando a alterações bioquímicas que podem ser irreversíveis a nível celular, e pode estar relacionado a algumas doenças crônicas, comuns em pessoas idosas, como Alzheimer e Parkinson (FRIJHOFF et al., 2015; CABELLO-VERRUGO et al., 2006). O estresse oxidativo e a perda neuronal provocada pela DT costuma ocorrer em regiões específicas do encéfalo humano e

animal, que geralmente compreendem o cerebelo, tálamo e ponte. O motivo desse tropismo não está totalmente compreendido, porém sabe-se que nessas áreas há uma alta taxa de renovação da tiamina se comparada com as outras áreas encefálicas (OLIVEIRA et al., 2019).

Há uma inter-relação entre a produção de EROs e seus efeitos nas vias de sinalização intracelular, como as vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). As MAPKs fosforilam o grupo hidroxila (OH) dos aminoácidos serina ou treonina presentes nas proteínas, regulam e medeiam diversas atividades celulares, bem como a transcrição gênica, proliferação, diferenciação, desenvolvimento, sobrevivência e morte celular (ROUX; BLENIS, 2004; LEE; KIM, 2017).

As células eucarióticas possuem várias vias de MAPKs. Nos mamíferos, cinco famílias de MAPK foram descritos, porém os mais conhecidos e estudados são: proteínas cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2), proteínas cinases c-Jun NH1 terminal 1 e 2 (JNK1/2) e as proteínas cinases reguladas por mitógenos de 38 kDa (p38<sup>MAPK</sup>) (ROUX; BLENIS, 2004). Diferentes estímulos podem ativar as MAPKs. As ERK1/2 são ativadas principalmente por fatores de crescimento, enquanto JNK1/2 e p38<sup>MAPK</sup> são ativadas principalmente por fatores de estresse celular, como EROs e radiações ultravioleta (UV) e gama (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012).

Existem várias isoformas para cada uma dessas enzimas: ERK1 a ERK8, p38<sup>MAPK</sup><sub>α</sub>, β, γ e δ, e JNK1 a JNK3. Com relação a p38<sup>MAPK</sup>, as isoformas α e β compreendem 70% de similaridade, enquanto as isoformas γ e δ tem 60% de suas estruturas semelhantes com a p38<sup>MAPK</sup><sub>α</sub>. As isoformas α e β tem sua expressão presente na maioria dos tecidos, incluindo o tecido nervoso. A p38<sup>MAPK</sup><sub>α</sub> foi a primeira isoforma a ser identificada e tem sido relatada como a principal responsável por regular o processo inflamatório. Dessa forma, a p38<sup>MAPK</sup> também tem relação com a regulação e biossíntese de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNFα) e a interleucina 1β (IL1β), e muitos estudos têm mostrado sua relação com a inflamação crônica, compreendendo também as doenças neurodegenerativas. No sistema nervoso central (SNC), a p38<sup>MAPK</sup> é altamente expressa nas regiões relacionadas ao aprendizado e memória (LEE, KIM, 2017).

As ERK1 e ERK2 são ativadas e fosforiladas por meio de receptores cinases extracelulares e, quando ativas, podem fosforilar mais de 200 substratos, incluindo outras proteínas cinases, e desta forma medeia processos de transcrição e tradução

do RNA, e está envolvida em uma variedade de consequências na sua ativação, na qual algumas são até mesmo antagônicas, podendo ser responsável por progredir ou parar o ciclo celular, e pela sobrevivência ou morte celular. Vários fatores estão envolvidos e influenciam nas respostas à ativação de ERK1/2 como a duração, magnitude, distribuição da proteína e ativação de outras vias paralelamente. Além do seu papel biológico normal a ERK1/2 também está envolvida com o câncer, onde esta via encontra-se desregulada (COOK et al, 2017).

## **2.2 Modelos experimentais de deficiência de tiamina**

Sabe-se que a DT pode desencadear em neurodegeneração, entretanto, os mecanismos que levam a este processo ainda não estão totalmente elucidados. Para isto, são utilizados modelos experimentais, com a utilização de roedores e uma dieta deficiente em B1. Os primeiros experimentos que evidenciaram que a ausência da vitamina B1 provocava alterações no tecido nervoso foram realizados por Eijkman e Vedder, nos anos de 1906 e 1912, respectivamente, onde foi utilizado arroz polido para alimentar pombos, e verificaram sinais como ataxia e paralisia, que foram associados à degeneração do sistema nervoso (SEN et al., 2007; WILLIAMNS, 1953).

Vários são os protocolos atuais que podem ser utilizados para induzir a DT, onde a dieta deficiente em B1 (GRALAK et al, 2019) pode estar associada ou não a outros tratamentos, como o uso de etanol (CICCIA; LANGLAIS, 2000), de pirritiamina (MEDEIROS et al, 2020), análogo químico da tiamina, inibidor da pirofosfoquinase, enzima responsável pela produção da forma ativa da tiamina, ou o amprólio (MORAES, et al 2018), substância análoga quimicamente a tiamina, inibidora da absorção intestinal e da captação celular da vitamina (KOPELMAN, 2009).

A partir de modelos experimentais, foi possível detectar que a DT provoca alterações em áreas específicas do encéfalo animal, como o córtex e o tálamo, em um processo parecido ao que ocorre em humanos, e que estas alterações podem ser progressivas. Estes estudos também são importantes por associar a neurodegeneração às mudanças comportamentais presentes nesses animais deficientes, e entender seus aspectos bioquímicos. Após a indução de DT, os animais apresentam problemas cognitivos e motores com memória espacial e aprendizagem prejudicadas (OLIVEIRA et al., 2007; DE FREITAS-SILVA et al., 2010).

Existem alguns sinais clínicos que aparecem e evoluem ao longo do processo de DT, como perda de peso, fraqueza, distúrbios motores, alopecia e convulsões. O tempo necessário para que comecem a aparecer estes sinais podem variar de acordo com o método utilizado. Quando se utiliza apenas a dieta deficiente em B1, os sinais se evidenciam somente após 3 ou 4 semanas, porém, quando se associa a dieta a outro tratamento que iniba a ação da tiamina, o surgimento da neurodegeneração pode ocorrer em até 10 dias (CICCIA; LANGLAIS, 2000; VIGIL et al., 2010).

Dentre os fármacos conhecidos que podem acelerar a DT em experimentos *in vivo*, o uso do amprólio tem se mostrado interessante. O amprólio, que age como antagonista da tiamina, tem um custo financeiro mais acessível que a piritiamina (substância comumente utilizada nos modelos experimentais de indução de DT) e seus efeitos no animal são mais brandos e menos letais, comparados ao tratamento convencional com piritiamina. O amprólio é um fármaco comumente utilizado para o tratamento da coccidiose em animais, porém, por possuir estrutura química análoga à tiamina, inibe competitivamente a absorção celular desta vitamina, impedindo seu transporte para o interior da célula e causando seu déficit (MORAES et al., 2018; TYLICKI et al., 2017; ABBAS et al., 2011).

### **2.3 Utilização de animais machos e fêmeas em modelos experimentais**

É comum em estudos de indução de DT (bem como em vários outros modelos experimentais) a utilização de animais machos nos experimentos. Em alguns poucos experimentos foram utilizadas fêmeas, porém, nestes a indução de DT foi realizada a fim de se estudar os efeitos nos animais nascidos destas ratas, sem a realização de algum estudo comparativo entre os sexos dos animais. Porém, sabe-se da existência de diferenças sexuais na estrutura e função do sistema nervoso, e essas diferenças são biologicamente pré-determinadas por genes presentes nos cromossomos sexuais (ALTEMUS et al., 2014).

Dentre os fatores que podem influenciar nos efeitos neurológicos, os mais relevantes são antecedentes genéticos, idade e sexo. Em artigo publicado por WANG et al em 2018 relata que o estradiol (hormônio sexual feminino) tem influência na ativação das vias de cinases sinápticas, incluindo a ERK1/2, e os receptores de estrogênio presentes na superfície celular podem interagir diretamente com esta proteína. Outro indício de que o sexo pode influenciar em suscetibilidades, são

doenças do neurodesenvolvimento e neurodegenerativas, que são mais prevalentes em indivíduos do sexo masculino do que feminino (WANG et al., 2018; COLE et al., 2016).

Em estudo que avaliou os efeitos da exposição aguda ao diesel, foi demonstrado que a inflamação e o estresse oxidativo foram maiores no encéfalo de camundongos machos, comparados às fêmeas. O mesmo estudo concluiu que uma determinada enzima com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (PON2), é expressa de modo diferente em machos e fêmeas, apresentando maior expressão e atividade nas fêmeas e, além disso, evidenciou que o estrogênio poderia estar envolvido na expressão desta enzima. Estudos *in vitro* demonstraram que as células neurais de camundongos machos são mais suscetíveis à neurotoxicidade do que as células de camundongos fêmeas (COLE et al., 2016).

Em estudo realizado com ratos fêmeas e machos, a fim de verificar os efeitos do consumo do álcool no tecido cardíaco, foi observado que o álcool afeta o coração dos animais do sexo masculino e feminino de forma diferente. O coração das fêmeas se mostrou protegido dos efeitos tóxicos provocados pelo etanol, e os machos, apresentaram anormalidades estruturais significativas. Isso possivelmente ocorreu devido aos mecanismos de adaptação utilizado por cada sexo. Enquanto os machos mostraram gerar mais energia mitocondrial, a fim de restaurar a eficiência contrátil cardíaca, as fêmeas se adaptaram aumentando a troponina, e assim, mantendo a contração cardíaca. Porém, no primeiro caso, o aumento da atividade mitocondrial podia também levar ao aumento da produção de EROs, e desta forma, trazer dano oxidativo ao tecido, o que não acontece na adaptação usada pelas fêmeas (FOGLER et al., 2011).

O papel das características sexuais deve ser investigado quanto a proteção ou suscetibilidade dos sexos. Desta forma, se torna importante considerar ambos os sexos ao se investigar a neuroinflamação e a neurodegeneração.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar os efeitos da deficiência nutricional de tiamina em associação com amprólio no sistema nervoso de camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, sob os aspectos bioquímicos e comportamentais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Aprimorar o modelo dietético desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental da UFNT para indução de DT com amprólio em camundongos, através da avaliação de parâmetros bioquímicos e comportamentais, determinando a dose e o tempo de tratamento com amprólio suficientes para desenvolvimento de alterações nos animais;
2. Determinar as alterações comportamentais das fêmeas pós-indução de DT com amprólio;
3. Determinar o perfil de modulação da via de sinalização de ERK1/2 no tálamo e córtex cerebral de camundongos machos e fêmeas na DT induzida por diferentes doses de amprólio em um período de tratamento fixo (curva dose-resposta);
4. Determinar o perfil de modulação de ERK1/2 no tálamo e córtex cerebral dos camundongos machos e fêmeas em resposta à indução de DT por amprólio, em dose pré-determinada em função do tempo (curva de tempo);
5. Observar a participação do estresse oxidativo e da inflamação nos distúrbios neurológicos gerados pela DT com amprólio em camundongos fêmeas, a partir da utilização de Trolox (antioxidante) e DMSO (anti-inflamatório).

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z. et al. Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: state of play revisited. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, n. 02, p. 337-350, 2011.
- ALTEMUS, M. et al. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Front Neuroendocrinol**, v. 35, n. 3, p. 320-330, 2014.
- ÁLVAREZ, M. J. S.; VERA, D. G. Z. Déficit de Tiamina: Beriberi y síndrome de Wernick-Korsakoff. **Revista Medicina**, v. 13, n. 2, 2008.
- ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature Medicine**, v. 10, p. 18-25, 2004.
- BUTTERWORTH, R. F. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 189-96, 2009.
- CABELLO-VERRUGIO, C. et al. Oxidative stress in disease and aging: mechanisms and therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p.1-2, 2016.
- CICCIA, R. M.; LANGLAIS, P. J. An examination of the synergistic interaction of ethanol and thiamine deficiency in the development of neurological signs and long-term cognitive and memory impairments. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 24, n. 5, p. 622-34, 2000.
- COLE, T. B. et al. Sex and genetic differences in the effects of acute diesel exhaust exposure on inflammation and oxidative stress in mouse brain. **Toxicology**, v. 374, p. 1-9, 2016.
- COOK, SIMON J. et al. Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signaling. **The FEBS Journal**, v. 284, p. 4177-4195, 2017.
- DE FREITAS SILVA, D. M.; FERRAZ, V. P.; RIBEIRO, A. M. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 177, n. 2, p. 289-93, 2009.
- FOGLER, L. R. et al. Functional proteomic analysis reveals sex-dependent differences in structural and energy-producing myocardial proteins in rat model of alcoholic cardiomyopathy. **Physiol Genomics**, v. 43, p. 346-356, 2011.
- FRIJHOFF, J. et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 23, n. 14, p. 1144-1170, 2015.
- GRALAK, M. A. et al. Thiamine deficiency affects glucose transport and  $\beta$ -oxidation in rats. **Journal Animal Physiology Nutrition**, v. 103, p. 1629-1635, 2019.
- LEE, J. K.; KIM, N. J. Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 22, n. 1287, 2017.

- KOPELMAN, M. D. et al. The Korsakoff syndrome: clinical aspects, psychology and treatment. **Alcohol and Alcoholism**, v. 44, n. 2, p. 148-54, 2009
- KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 689-737, 2012.
- MARTIN, P. R., SINGLETON, C. K., HILLER-STURMHOFEL, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Research and Health**, v. 27, p. 134-142, 2003.
- MEDEIROS, R. C. N. et al. Thiamine deficiency modulates p38 MAPK and Heme Oxygenase-1 in mouse brain: association with early tissue and behavioral changes. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 4, p. 940-955, 2020.
- MORAES, J. O. et al. Amprolium Exposure Alters Mice Behavior and Metabolism in Vivo. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 1, n. 4, p. 272-281, 2018.
- OLIVEIRA, F. A. et al. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: role of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. **Brain Research**, v. 1134, n. 1, p. 79-86, 2007.
- OLIVEIRA, N. A. C. et al. A deficiência de tiamina e niacina como fator de risco para doenças neurológicas. **Revista Infarma**, v. 31, n.2, p. 80-85, 2019.
- RESENDE, L. S. et al. Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 2, p. 421-5, 2012.
- ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK – Activates Protein Kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, p. 320-344, 2004.
- SEN, Chandan K. et al. Tocotrienols: the emerging face of natural vitamin E. **Vitamin and Hormones**, v. 76, 2007.
- SINGLETON, C. K. MARTIN, P. R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Current Molecular Medicine**, v. 1, p. 197-207, 2001.
- THOMAZ, K. C. V. et al. Alcoolismo e deficiência de tiamina associada à síndrome de Wernicke-Korsakoff. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 3, p. 94-100, 2014.
- TYLICKI, Adam et al. Thiamine and selected thiamine antivitamin – biological activity and methods of synthesis. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 1, 2018.
- VIGIL, F. A. et al. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 140-142, 2010.
- WANG, W. et al. Memory-related synaptic plasticity is sexually dimorphic in rodent hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 37, p. 7935-7951, 2018.

WILLIAMS, Robert. Recollection of the "Beriberi-Preventing Substance". **Nutrition Reviews**, vol. 11, n. 09, p. 257-259, 1953.

## **CAPÍTULO 2. Perfil da modulação de ERK1/2 por amprólio no sistema nervoso central de camundongos machos e fêmeas**

---

## RESUMO

A tiamina é uma vitamina pertencente ao complexo B, também conhecida como vitamina B1 (T+). Sua deficiência no organismo pode acarretar alterações nos sistemas cardiovascular e nervoso. Este estudo investigou os efeitos da deficiência nutricional da tiamina com amprólio no sistema nervoso de camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, sob os aspectos bioquímicos. Foram avaliados os perfis de modulação da fosforilação de ERK1/2 no córtex cerebral e tálamo dos animais expostos ao modelo, em diferentes doses de amprólio e tempos de tratamento. Nos camundongos machos, observamos progressivo aumento da fosforilação de ERK1/2, tanto no córtex cerebral quanto no tálamo, em resposta à dose de amprólio. Nas fêmeas, por outro lado, não observamos uma resposta progressiva na modulação de ERK1/2 em relação ao aumento da dose de amprólio, evidenciando-se um aumento abrupto da fosforilação nas doses mais altas de 60 e 80 mg/kg. Nos camundongos machos, observamos ainda, aumento da fosforilação de ERK1/2 no córtex cerebral em todos os tempos de tratamento de DT com amprólio utilizados. Nas fêmeas, o perfil de modulação de ERK1/2 na DT com amprólio foi similar em ambas as estruturas e nos diferentes tempos de tratamento. Os resultados mostram que o método de indução de deficiência dietética de tiamina com amprólio é eficiente, evidenciando alterações bioquímicas no sistema nervoso similares a outros modelos reconhecidos, que utilizam o análogo químico piritiamina. Ademais, o estudo evidencia diferenças na resposta à DT com amprólio entre camundongos machos e fêmeas em relação à fosforilação de ERK1/2, mas demonstra que camundongos fêmeas respondem positivamente ao método e também podem ser utilizados como animais-modelo para estudo da DT.

**Palavras-chave:** Deficiência de tiamina. Neurodegeneração. MAPK.

## 1 INTRODUÇÃO

A tiamina, também conhecida como vitamina B1, tem função importante no organismo por atuar como coenzima e participar do metabolismo de carboidratos na sua conversão em energia celular. Desta forma, a deficiência de tiamina (DT) provoca uma série de complicações em diversos tecidos, bem como desordens no catabolismo da glicose e geração de ATP, desordens encefálicas relacionadas ao estresse oxidativo e alterações nos neurotransmissores, inflamação e morte celular. Os tecidos cardíaco e nervoso costumam ser os mais afetados pela DT, por serem órgãos com alta taxa metabólica e energética. A DT é uma desordem de caráter nutricional que interfere no metabolismo enzimático celular, podendo gerar neuroinflamação e neurodegeneração, que ainda precisam ser investigados (ÁLVAREZ; VERA, 2008).

O estresse oxidativo e a neurodegeneração, além de estarem presentes entre as desordens provocadas pela DT, também estão relacionados a outras doenças como Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica (ELA) (NUNES, 2016). Estudos anteriores têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio (EROs), certas citocinas e moléculas inflamatórias, podem provocar alterações nas vias de sinalização celular, podendo resultar em diversas enfermidades com características inflamatórias. Existe uma correlação entre as EROS e a inflamação, e tanto o estresse oxidativo quanto as citocinas pró-inflamatórias, como TNF e interleucinas, estão relacionados à ativação da via da p38<sup>MAPK</sup>. Desta forma, as vias de sinalização das MAPKs podem ter suas atividades alteradas devido a sua interação molecular com as EROS. Entretanto, estudos também mostraram que o uso de antioxidantes pode reverter os efeitos nocivos gerados pelas EROS, diminuindo o acúmulo dessas substâncias intracelularmente e, assim, evitando a ativação das MAPKs (ZHANG et al., 2016).

Os modelos experimentais de DT para estudo *in vivo* em animais de laboratório possibilitam a investigação aprofundada em bases anatômicas, fisiológicas e celulares de distúrbios neurológicos que ocorrem na deficiência. Existem dois modelos experimentais bem determinados para roedores que são utilizados para o estudo da DT (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). O primeiro método induz a DT através da utilização de dietas livres de vitamina B1, por um período de tempo suficiente para depletar os estoques de tiamina corporal (3-4 semanas). O segundo modelo gera uma DT de forma mais rápida, combinando a alimentação com ração

livre de tiamina com a administração (injeções intraperitoneais, i.p.) de piritiamina (inibidor da tiamina pirofosfocinase). Este segundo modelo, denominado DT induzida por piritiamina, induz uma progressão estereotipada dos sinais clínicos neurológicos e comportamentais que foram mapeados para alterações específicas na neuroanatomia e neuroquímica, mimetizando a doença natural descrita para a DT (ZHANG et al., 1995; HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

Existem também estudos que utilizam outros análogos químicos da tiamina em roedores, como o amprólio (GREENWOOD; PRATT, 1985; RINDI et al., 2003). Entretanto, estes estudos abordam aspectos farmacológicos da substância, e seus mecanismos e efeitos não têm sido ainda bem caracterizados. Mas estudos sugerem que a ação *in vivo* do amprólio na indução de DT possa ser melhor que o clássico modelo com piritiamina (BUNIK; TYLICKI; LUKASHEV, 2013). Recentemente, estudos de indução de DT com amprólio em camundongos demonstraram desenvolvimento de distúrbios comportamentais e metabólicos significativos nos animais (PEREIRA et al., 2017; MORAES et al., 2018).

Ademais, recentemente tem havido forte movimentação para incluir ambos os sexos em estudos com animais (HUGHES, 2019). No entanto, diferenças biológicas entre machos e fêmeas ocorrem em vários aspectos. Por exemplo, diferentes manifestações comportamentais com interferências associadas ao sexo são bem conhecidas (ALTEMUS, 2006; WANG et al., 2018). Variações hormonais associadas às fases reprodutivas femininas interferem em diversos aspectos do comportamento (ALTEMUS; SARVAIYA; EPPERSON, 2014). Da mesma forma, diferenças na resistência antioxidante e inflamação entre machos e fêmeas são bem determinadas (NETTO et al., 2017; RIETJENS et al., 2018). Estudos demonstram maior resistência ao estresse oxidativo e neuroinflamação no sexo feminino (FOGLE et al., 2011; DAS et al., 2017; COLE et al., 2016).

Nesse sentido, nesse trabalho objetivamos aprimorar o modelo de indução de deficiência dietética de tiamina com amprólio, determinando uma dose eficiente e um tempo de exposição suficiente para observar alterações importantes, e avaliar os efeitos da DT com amprólio em machos e fêmeas, a fim de verificar se ocorre alguma interferência na resposta ao modelo experimental.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizados 156 camundongos, sendo 62 machos e 94 fêmeas da linhagem Swiss, com 50 dias de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT). Os animais foram separados em grupos e mantidos em gaiolas apropriadas forradas com maravalha, contendo água e ração à vontade, e foram manipulados e eutanasiados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFT (CEUA-UFT, protocolo 23.101.001.708/2019-63).

### 2.2 Indução de deficiência de tiamina

Foi utilizado no estudo um modelo *in vivo* de deficiência dietética de tiamina em conjunto com a administração do antagonista de tiamina amprólio (MORAES et al., 2018). Os camundongos foram separados em 13 grupos de machos e 13 grupos de fêmeas (n = 6 por grupo; 8 grupos tratados e 5 grupos controles para cada categoria) e submetidos a dois diferentes protocolos de tratamentos, para analisar as alterações em dose-reposta ao amprólio (protocolo 1), e em diferentes tempos de indução de DT com amprólio (protocolo 2, curva de tempo).

No protocolo 1, para avaliação do perfil de alterações em função da dose de amprólio (curva dose-resposta), os camundongos machos e fêmeas foram tratados por 20 dias com injeções intraperitoneais (i. p.) diárias de solução salina (NaCl 0,9%, grupos controles) ou amprólio (diluído em solução salina), nas doses de 20, 40, 60 e 80 mg/kg, totalizando 5 grupos. Durante este período de tratamento, o peso dos animais e o consumo de ração foram verificados diariamente. Após o período de tratamento, foram realizadas as análises.

No protocolo 2, para avaliação do perfil de alterações em função do tempo de exposição ao amprólio (curva de tempo), grupos de machos e fêmeas foram tratados diariamente com solução salina (NaCl 0,9% i. p., grupos controles) ou amprólio (i. p.) na dose de 60 mg/kg durante 5, 10, 15 ou 20 dias, totalizando 8 grupos de tratamentos para cada sexo. Neste protocolo, a dose utilizada foi determinada pelos ensaios anteriores (protocolo 1), utilizando-se a dose associada à mais intensa modulação das

MAPKs. O peso dos animais e o consumo de ração também foram verificados diariamente durante este experimento. As análises dos diferentes grupos foram realizadas após cada período de tratamento (5, 10, 15 ou 20 dias).

Os grupos controle receberam ao longo de todo o tratamento ração padrão AIN-93M (PRAG Soluções Biociências, SP, Brasil) *ad libitum*, segundo o *American Institute of Nutrition* (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os grupos deficientes (tratados com amprólio) receberam ração deficiente em tiamina AIN-93DT (PRAG Soluções Biociências, SP, Brasil) durante os períodos de indução de deficiência. Os constituintes da dieta DT são idênticos aos da dieta padrão, exceto a falta da vitamina.

### 2.3 Western blot

Após os tratamentos, os animais foram eutanasiados e tiveram o córtex cerebral e o tálamo dissecados e homogeneizados em solução tampão contendo 200 mM de Tris, 40 mM de EDTA, 4% de SDS, como pH 6,8. Logo em seguida a solução passou por fervura durante 5 minutos. Após a fervura, foi realizada uma diluição da amostra na proporção 1:4 em solução contendo 40% de glicerol, 50 mM de Tris e azul de bromofenol, acrescida de  $\beta$ -mercaptoetanol, para concentração final de 5%. A concentração das proteínas totais presentes nas amostras foi determinada pelo método de Lowry modificado (MEDEIROS et al., 2020).

Posteriormente, as amostras foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema *wet* e as formas totais e fosforiladas foram identificadas pelo uso de anticorpos específicos para ERK1/2 (Sigma-Aldrich, MO, EUA). A revelação foi realizada por cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e a densitometria das bandas foi quantificada pelo programa Image J<sup>®</sup> (National Institutes of Health, EUA). O nível de fosforilação de ERK1/2 foi determinado a partir da relação entre a densidade óptica da banda fosforilada com a banda total (MEDEIROS et al., 2020). O controle da carga de proteína foi realizado com o uso do anticorpo anti- $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich, MO, EUA).

## 2.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  E. P. M. A avaliação dos resultados dos experimentos de dose-resposta foi feita por análise de regressão não linear, e a significância estatística foi determinada pela análise de variância de uma ou duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Curva de dose-resposta

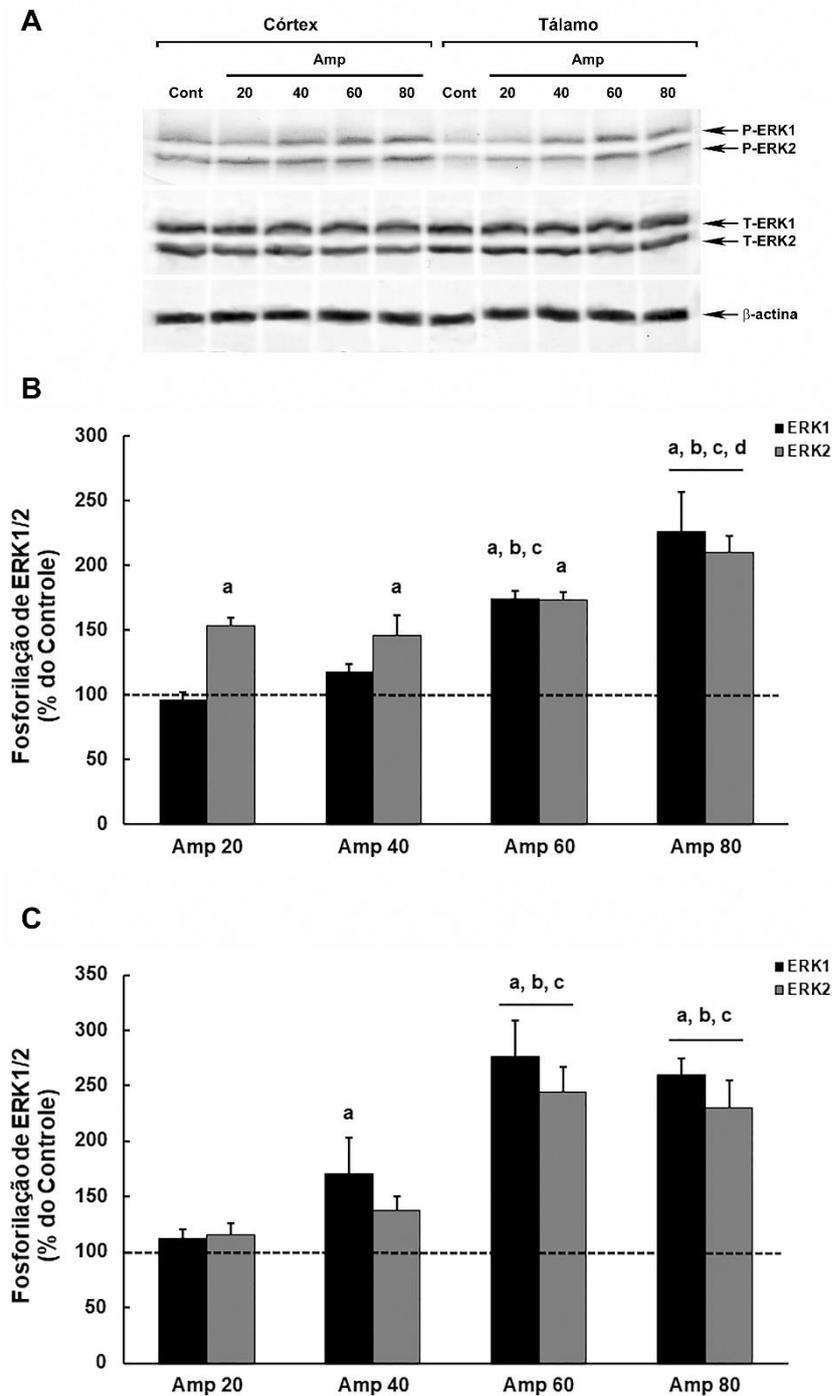
Nos camundongos machos, observamos progressivo aumento da fosforilação de ERK1/2, tanto no córtex cerebral quanto no tálamo, em resposta à dose de amprólio (Figura 1). No tálamo, a modulação de ERK1/2 foi nitidamente mais intensa, atingindo aumentos de 175% (ERK1) e 144% (ERK2) na dose de 60 mg/kg de amprólio, em relação ao controle (ERK1,  $p < 0,01$ ; ERK2  $p < 0,01$ ). Entretanto, não houve diferença nos aumentos de fosforilação de ERK1/2 entre as duas doses mais altas de 60 e 80 mg/kg (ERK1,  $p = 0,609$ ; ERK2,  $p = 0,540$ ).

Por outro lado, no córtex cerebral, a dose mais alta de amprólio (80 mg/kg) produziu as maiores alterações na modulação de ERK1/2, atingindo aumentos de 125% (ERK1) e 110% (ERK2) em relação ao controle (ERK1,  $p = 0,02$ ; ERK2,  $p = 0,01$ ). Além disso, no córtex cerebral houve um perfil de aumento de fosforilação mais progressivo, evidenciando-se diferenças nas intensidades de modulação de ERK1/2 entre as duas doses mais altas de 60 e 80 mg/kg (ERK1,  $p = 0,02$ ; ERK2  $p = 0,01$ ) (Figura 1B).

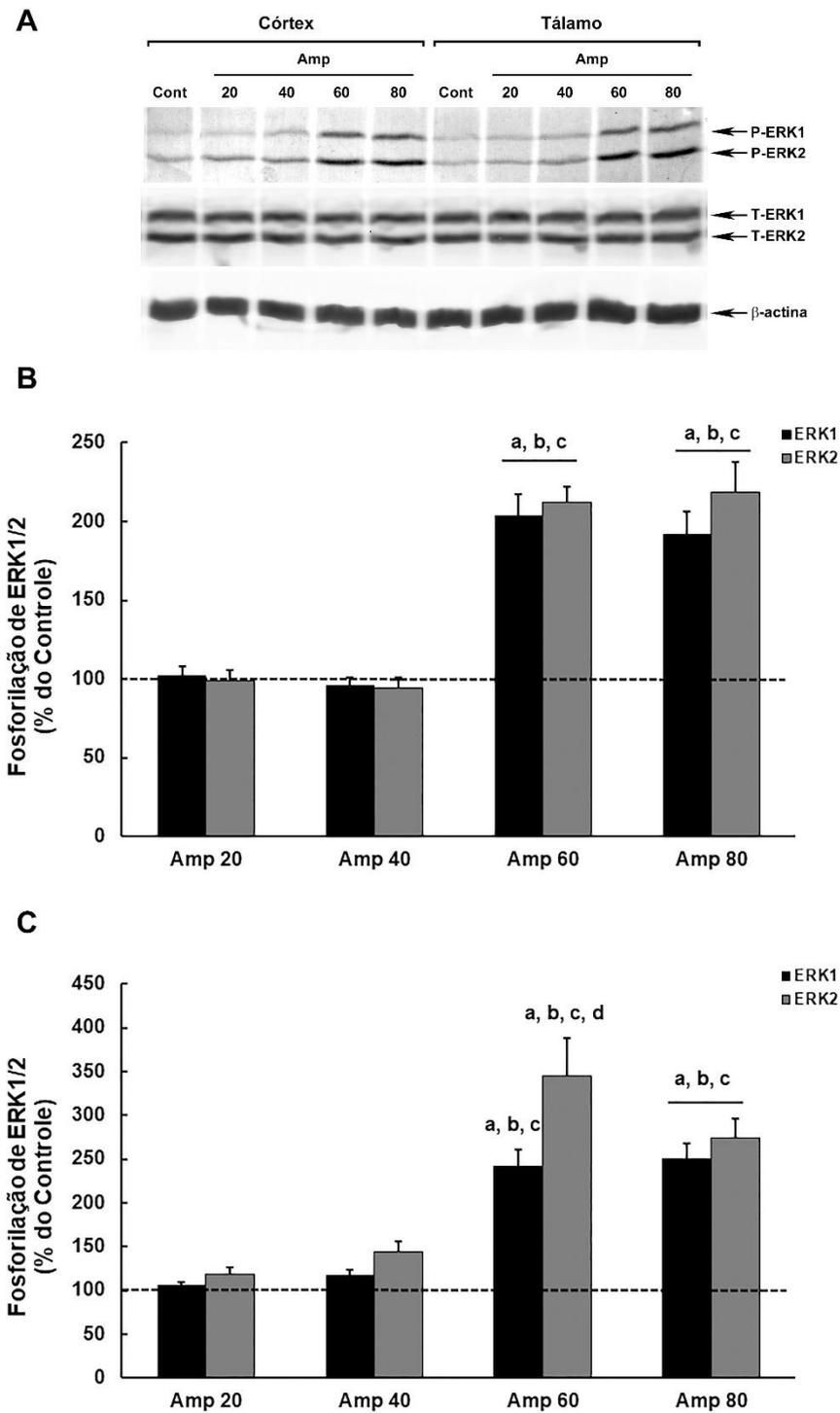
Nas fêmeas, por outro lado, não observamos uma resposta progressiva na modulação de ERK1/2 em relação ao aumento da dose de amprólio, evidenciando-se um aumento abrupto da fosforilação nas doses mais altas de 60 e 80 mg/kg (Figura 2). No córtex, a ERK1 apresentou aumentos de 103 e 92% nas doses de 60 e 80 mg/kg, respectivamente, em relação ao controle ( $p < 0,01$ ), e a ERK2 aumentou 112 e 118% em relação ao controle ( $p < 0,01$ ), nas duas doses mais altas.

No tálamo, porém, os aumentos de fosforilação de ERK nas fêmeas foram mais intensos, atingindo aproximadamente 160% de aumento na ERK1 nas doses 60 e 80

mg/kg e na ERK2 na dose de 80 mg/kg, em relação ao controle ( $p < 0,01$ ), e até 245% de aumento da fosforilação de ERK2 na dose de 60 mg/kg, em relação ao controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 2C).



**Figura 1.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos machos deficientes em tiamina com diferentes doses de amprólio. Painel mostra imagens representativas de *immunoblottings* (A) e quantificações de ERK1/2 no córtex cerebral (B) e no tálamo (C). 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. *a*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, *b*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Amp 20, *c*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Amp 40, *d*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Amp 60.



**Figura 2.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos fêmeas deficientes em tiamina com diferentes doses de amprólio. Painel mostra imagens representativas de *immunoblottings* (A) e quantificações de ERK1/2 no córtex cerebral (B) e no tálamo (C). 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. *a*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, *b*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Amp 20, *c*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Amp 40, *d*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Amp 80.

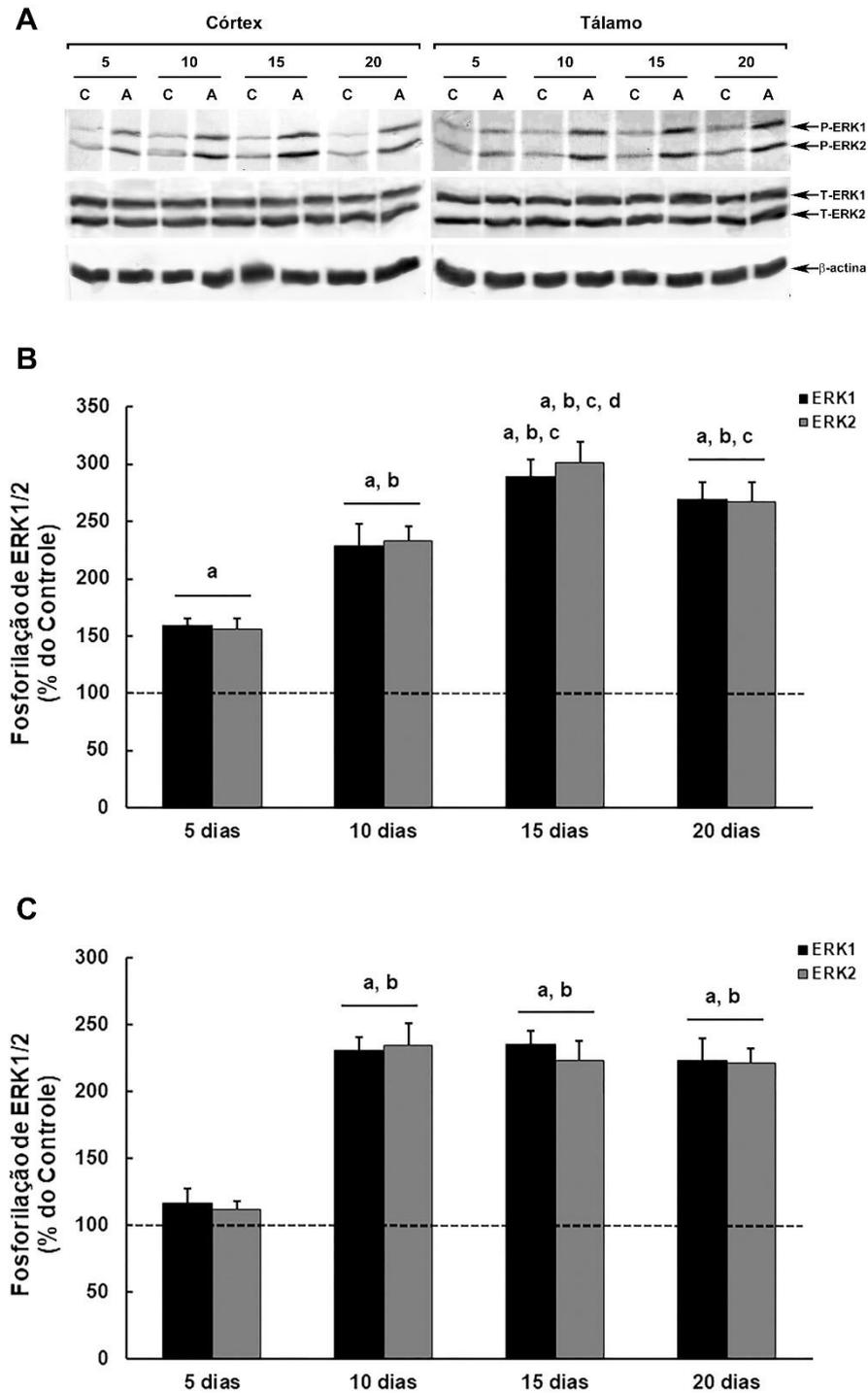
### 3.2 Curva de tempo

Após a indução de DT por 20 dias com a determinação da dose de tratamento que melhor evidenciasse a modulação de ERK, tanto em camundongos machos quanto em fêmeas, avaliamos qual o tempo necessário para que os animais deficientes com amprólio exibissem significativo incremento da fosforilação de ERK1/2, no córtex cerebral e tálamo. Nesse sentido, utilizamos a dose de 60 mg/kg, considerando que as respostas de modulação da fosforilação foram significativas e suficientes, em ambos os sexos.

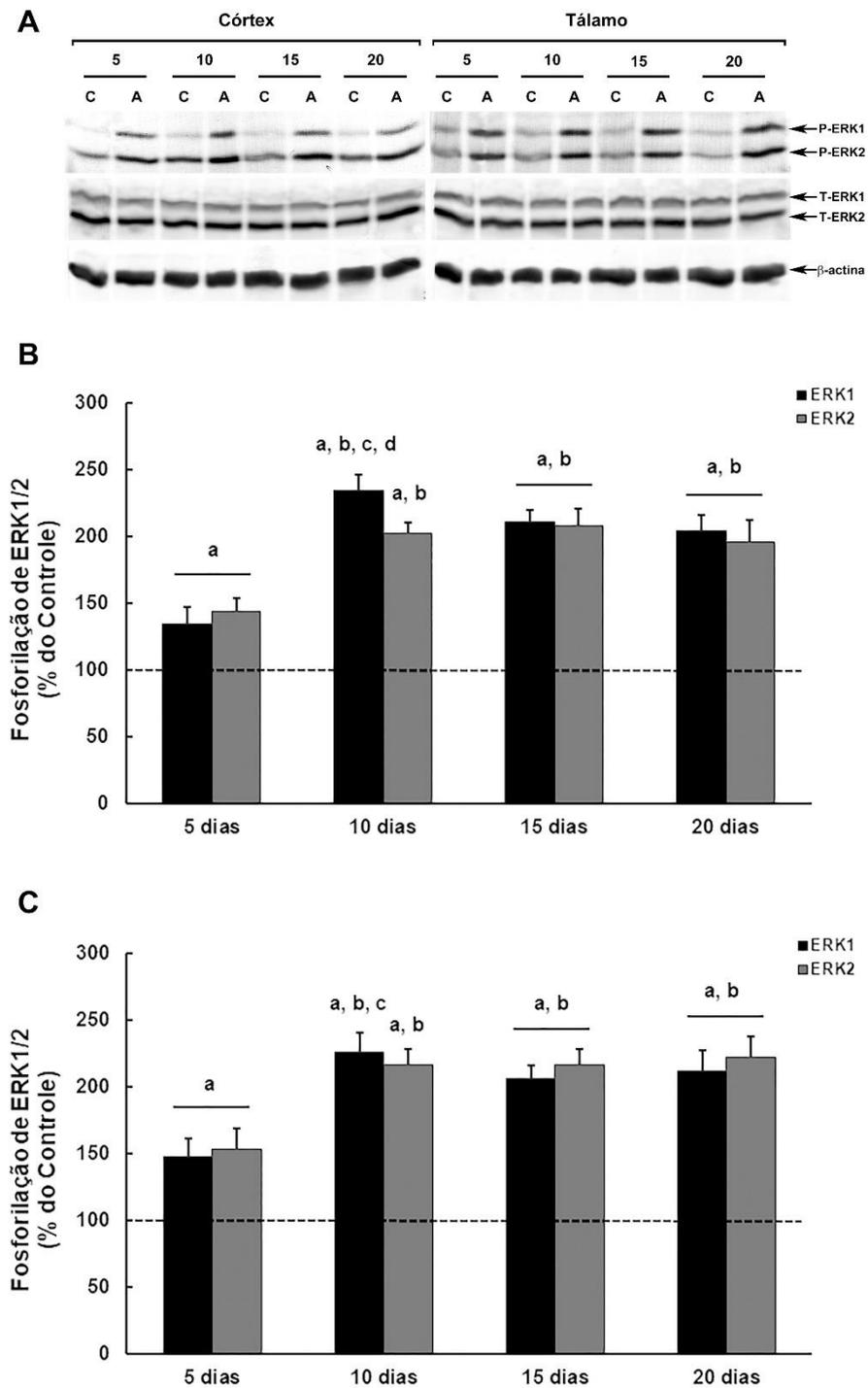
Nos camundongos machos, observamos aumento da fosforilação de ERK1/2 no córtex cerebral em todos os tempos de tratamento de DT com amprólio (Figura 3). Entretanto, a modulação de ERK1/2 foi nitidamente mais intensa quando os tratamentos com amprólio atingiram 15 e 20 dias, com aumentos na fosforilação de até 189% (ERK1) e 201% (ERK2) após 15 dias de indução de DT ( $p < 0,01$ , em relação aos controles).

Por outro lado, no tálamo, observamos alterações na modulação de ERK1/2 somente a partir do décimo dia de tratamento (Figura 3C). Entretanto, nos animais tratados por 10, 15 ou 20 dias com amprólio, os aumentos de fosforilação de ERK1/2 foram similares entre si ( $\cong 130\%$ ,  $p < 0,01$  em relação aos controles), evidenciando a formação de um platô na atividade de ERK após 10 dias de DT.

Nas fêmeas, por outro lado, o perfil de modulação de ERK1/2 na DT com amprólio foi similar em ambas as estruturas e nos diferentes tempos de tratamento (Figura 4). Observamos aumento da fosforilação de ERK em todos os tempos analisados, com aumentos de fosforilação mais intensos a partir do décimo dia, com níveis de  $\cong 115\%$  maiores em relação aos controles ( $p < 0,01$ ), tanto no córtex cerebral quanto no tálamo (Figura 4B e C).



**Figura 3.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos machos deficientes em tiamina com amprólio na dose de 60 mg/kg, submetidos a diferentes tempos de tratamento (5, 10, 15 ou 20 dias). Painel mostra imagens representativas de *immunoblottings* (A) e quantificações de ERK1/2 no córtex cerebral (B) e no tálamo (C). Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens relativas aos controles (considerados 100%,  $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. *a*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, *b*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado por 5 dias, *c*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado por 10 dias, *d*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado por 20 dias.



**Figura 4.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos fêmeas deficientes em tiamina com amprólio na dose de 60 mg/kg, submetidos a diferentes tempos de tratamento (5, 10, 15 ou 20 dias). Painel mostra imagens representativas de *immunoblottings* (A) e quantificações de ERK1/2 no córtex cerebral (B) e no tálamo (C). Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens relativas aos controles (considerados 100%,  $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan.  $a$   $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle,  $b$   $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado por 5 dias,  $c$   $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado por 15 dias,  $d$   $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado por 20 dias.

## 4 DISCUSSÃO

A deficiência de tiamina e seus efeitos no organismo têm sido investigada por diversos pesquisadores através de experimentos em animais, onde pôde-se observar danos, principalmente, nos tecidos encefálico e cardíaco. Os modelos experimentais utilizados variam em dieta deficiente em tiamina associada ou não, a outros tratamentos, sendo a pirritiamina o análogo mais comumente utilizado. A associação de uma dieta DT com outro protocolo se torna interessante, pois acelera o processo e o aparecimento dos sinais e sintomas neurológicos nos animais, que podem ser observados a partir do 13º dia de indução da deficiência quando utilizadas injeções de pirritiamina (RESENDE, 2012). Porém, neste estudo, optou-se pela utilização de injeções de amprólio por via intraperitoneal, por também ser um análogo da tiamina, além de ser de mais fácil acesso. Diferentemente da pirritiamina, o amprólio age fora da célula, inibindo através de competição o transporte da tiamina para o interior da célula e, desta forma, gerando o déficit celular mesmo quando o nutriente ainda está presente no organismo (TYLICKI et al., 2017).

Estudos sobre deficiência de tiamina em roedores de laboratório demonstraram ser viável o uso de amprólio associado à dieta deficiente em vitamina B1, evidenciando manifestações de alterações comportamentais e metabólicas características da DT, em um tempo de exposição dos animais reduzido (MORAES et al., 2018, PEREIRA et al., 2017). Entretanto, apesar destas evidenciações inéditas da eficácia do uso do amprólio para indução de DT em roedores, ainda não estavam definidos a dose mais adequada e o tempo mínimo necessário para que os animais exibissem alterações neurológicas importantes. Para isso, neste estudo utilizamos como parâmetro a modulação da fosforilação de ERK1/2 em estruturas encefálicas criticamente afetadas na DT em roedores, de acordo com estudos anteriores (GOMES et al., 2021). Observamos que, dentro dos parâmetros avaliados, a dose e o tempo suficientes para produção de alteração neural foi de 60 mg/kg e 10 dias de tratamento, evidenciadas principalmente no tálamo, a região encefálica considerada mais sensível à DT (VETRENO et al., 2012). É interessante observar que as modulações nas vias de sinalização de ERK1/2 associadas à DT com amprólio, se aproximaram cronologicamente às alterações neurológicas que ocorrem nos modelos que utilizam o clássico método com pirritiamina (10 dias de tratamento) (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013; MEDEIROS et al., 2020; GOMES et al., 2021), entretanto,

sem exibir manifestações graves (perda de consciência, convulsão e coma) e geralmente, fatais. Além disso, e de modo muito importante, nosso estudo evidenciou que camundongos fêmeas podem ser igualmente utilizados para investigações de alterações neurais na DT, com o uso do amprólio.

O camundongo é o animal comumente utilizado em estudos experimentais *in vivo*, e nos experimentos relacionados ao efeitos neurológicos provocados pela DT não é diferente, sendo utilizado, na maioria dos estudos, animais machos. Desta forma viu-se a necessidade de analisar os efeitos da indução de DT no tecido nervoso de ambos os sexos dos animais e analisar se poderiam ocorrer diferenças, além de observar outros parâmetros como consumo de ração e variação de peso das fêmeas afim de comparar os resultados com outros estudos realizados.

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível aprimorar o modelo de indução de deficiência dietética de tiamina associada ao amprólio, desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), determinando-se a dose e o tempo de exposição mais eficientes para a observação de alterações neurais importantes nas fêmeas e machos avaliados, como o perfil de modulação das vias de sinalização das MAPKs. A dose de amprólio e o tempo de indução de DT, determinados através deste estudo, foi de 60 mg/kg e 10 dias, respectivamente.

Na determinação da dose foi observado que ambos os sexos apresentaram alteração celular provocada pela DT. Porém, foi observado uma maior resistência nos camundongos do sexo feminino, nas doses mais baixas.

## REFERÊNCIAS

ALTEMUS, M. Sex differences in depression and anxiety disorders: potential biological determinants. **Hormones and Behavior**. v. 50, n. 4, p. 534-538, 2006.

ALTEMUS, M.; SARVAIYA, N.; EPPERSON, C. N. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 35, n. 3, p. 320-330, 2014.

ALVARENGA, P. G. M. et al. Estudo *in vitro* do efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) e do óleo essencial de *Ageratum fastigiatum* nas propriedades biomecânicas de leucócitos humanos: uma análise por meio de citometria de fluxo, microscopia óptica

e confocal. In: **Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos**, n. 14, p. 946-955, 2017.

ÁLVAREZ, M. J. S.; VERA, D. G. Z. Déficit de Tiamina: Beriberi y síndrome de Wernick-Korsakoff. **Revista Medicina**, v. 13, n. 2, 2008.

BUNIK, V. I.; TYLICKI, A.; LUKASHEV, N. V. Thiamin diphosphate-dependent enzymes: From enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models. **FEBS Journal**, v. 280, n. 24, p. 6412–6442, 2013.

COLE, T. B. Sex and genetic differences in the effects of acute diesel exhaust exposure on inflammation and oxidative stress in mouse brain. **Toxicology**. v. 374, n. 30, p. 1-9, 2016.

DAS, S. K. Females are Protected from Iron\_Overload Cardiomyopathy Independent of Iron Metabolism: Key Role of Oxidative Stress. **Journal of the American Heart Association**. v. 6, n. 1, 6:e003456, 2017.

FOGLE, R. L. et al. Functional proteomic analysis reveals sex-dependent differences in structural and energy-producing myocardial proteins in rat model of alcoholic cardiomyopathy. **Physiological Genomics**. v. 43, n. 7, p. 346-356, 2011.

GOMES, K. C. et al. Thiamine deficiency and recovery: impact of recurrent episodes and beneficial effect of treatment with Trolox and dimethyl sulfoxide. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 394, n. 11, p. 2289-2307, 2021.

GRALAK, M. A. et al. Thiamine deficiency affects glucose transport and  $\beta$ -oxidation in rats. **Journal Animal Physiology Nutrition**, v. 103, p. 1629-1635, 2019.

GREENWOOD, J.; PRATT, O. E. Comparison of the effects of some thiamine analogues upon thiamine transport across the blood-brain barrier of the rat. **Journal of Physiology**, 1985.

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.

HUGHES, R. N. Sex still matters: has the prevalence of male-only studies of drug effects on rodent behaviour changed during the past decade? **Behavioural Pharmacology**. v. 30, n. 1, p. 95-99, 2019.

JHALA, S. S.; HAZELL, A. S. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. **Neurochemistry International**, v. 58, n. 3, p. 248- 60, 2011.

MEDEIROS, R. C. N. et al. Thiamine deficiency modulates p38 MAPK and Heme Oxygenase-1 in mouse brain: association with early tissue and behavioral changes. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 4, p. 940-955, 2020.

MORAES, J. O. et al. Amprolium Exposure Alters Mice Behavior and Metabolism in Vivo. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 1, n. 4, p. 272-281, 2018.

NARDONE, R.; HÖLLER, Y.; STORTI, M.; CHRISTOVA, M.; TEZZON, F.; GOLASZEWSKI, S.; TRINKA, E.; BRIGO, F. Thiamine deficiency induced neurochemical, neuroanatomical, and neuropsychological alterations: A reappraisal. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

NETTO, C.A. et al. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. **Journal of Neuroscience Research**. v. 95, n. 1-2, p. 409-421, 2017.

PAVLOVA, O. et al. Thiamine deficiency in rats affects thiamine metabolism possibly through the formation of oxidized thiamine pyrophosphate. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**, v. 1865, 2021.

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.

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 Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RIETJENS, I. M. C. M. et al. Use of proteomics to detect sex-related differences in effects of toxicants: implications for using proteomics in toxicology. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 48, n. 8, 2018.

RINDI, G.; PATRINI, C.; NAUTI, A.; BELLAZZI, R.; MAGNI, P. Three thiamine analogues differently alter thiamine transport and metabolism in nervous tissue: an in vivo kinetic study using rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 18, n. 4, p. 245–63, 2003.

SANTOS, I. F. C. et al. Avaliação do efeito anti-inflamatório do dimetilsulfóxido em cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária e submetidas à mastectomia unilateral. **PUBVET**, v. 14, n. 11, p. 1-11, 2020.

TANEV, K. S.; ROETHER, M.; YANG, C. Alcohol dementia and thermal dysregulation: a case report and review of the literature. **American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias**, v. 23, n. 6, p. 563-570, 2008.

TYLICKI, Adam et al. Thiamine and selected thiamine antivitamin – biological activity and methods of synthesis. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 1, 2018.

VETRENO, R. P.; RAMOS, R. L.; ANZALONE, S.; SAVAGE, L. M. Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Brain Research**, v. 1436, p. 178–92, 2012.

WANG, W. et al. Memory-Related Synaptic Plasticity Is Sexually Dimorphic in Rodent Hippocampus. **Journal of Neuroscience**. v. 38, n. 37, p. 7935-7951, 2018.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative medicine Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

ZHANG, S. X. et al. Excitotoxic Cytopathology, Progression, and Reversibility of Thiamine Deficiency-induced Diencephalic Lesions. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 54, n. 2, p. 255–267, 1995.

### **CAPÍTULO 3. Deficiência de tiamina com amprólio em camundongos fêmeas: envolvimento de estresse oxidativo e inflamação**

---

#### **1 INTRODUÇÃO**

Para obter-se um tratamento eficaz de certa doença é importante entender a sua fisiopatologia. A falta da tiamina, nutriente essencial para o bom funcionamento do organismo, resulta em diversas consequências a nível celular e sistêmico, como: alterações nos neurotransmissores e na utilização da glicose como fonte de energia, acidose láctica, apoptose, estresse oxidativo e inflamação. A tiamina atua como cofator no metabolismo da glicose, e desta forma sua deficiência está relacionada a um metabolismo oxidativo prejudicado, associado ao baixo nível de ATP em tecidos com grande gasto energético, como o tecido nervoso. Esse déficit energético leva a excitotoxicidade e consequente neurodegeneração (MORAES et al., 2018; ABDOU; HAZELL, 2014).

A neuroinflamação está presente em diversas doenças neurológicas, como acidente vascular encefálico (AVE), esclerose múltipla, Alzheimer e deficiência de tiamina (DT). Na DT o processo inflamatório inclui edema, formação de vacúolos fagocitários, alteração na morfologia das células da glia e aumento da reatividade microglial, resultando em suprarregulação dos processos inflamatórios, seus genes de transcrição e moléculas pró-inflamatórias (ABDOU; HAZELL, 2014; HAZELLY; BUTTERWORTH, 2009).

O estresse oxidativo é um dos principais responsáveis pela morte celular, e ocorre devido ao desequilíbrio entre a síntese e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A célula possui um mecanismo de proteção localizado na mitocôndria a fim de prevenir a progressão do estresse oxidativo e evitar danos a célula. Porém, quando há comprometimento desse mecanismo a oxidação se torna descontrolada, levando a célula ao processo de apoptose. No processo de neurodegeneração, as principais EROs envolvidas incluem: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HAZELL et al., 2013).

Sabendo-se das consequências geradas pela DT e dos possíveis envoltimentos da inflamação e do estresse oxidativo no processo de neurodegeneração, torna-se importante o uso de substâncias neuroprotetoras com ação antioxidante, como o Trolox, e anti-inflamatória, como o dimetil sulfóxido

(DMSO), como ferramentas para compreensão da patogenia da neurodegeneração associada à DT, bem como na avaliação de potenciais substâncias terapêuticas neuroprotetoras.

O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-ácido tetrametilcroman-2-carboxílico) é um antioxidante exógeno análogo à vitamina E e solúvel em água, e seu uso tem sido comum em experimentos que visam demonstrar seu potencial antioxidante (BOULEBD, 2019). O DMSO é um composto orgânico proveniente do processamento do petróleo, que possui enxofre em sua formulação. Têm sido descritas mais de trinta propriedades farmacológicas do DMSO, dentre as quais suas ações anti-inflamatórias, antioxidante, analgésica e carreadora de substâncias. O DMSO possui baixa toxicidade e é excretado pelas vias respiratórias e urinária (ALVARENGA et al., 2017; SANTOS et al., 2020).

Devido ao pouco conhecimento dos efeitos da DT sobre animais de laboratório fêmeas, e do pouco conhecimento sobre a patogenia dos distúrbios neurológicos associados à DT, investigamos a participação do estresse oxidativo e da inflamação na deficiência nutricional de tiamina com amprólio em camundongos fêmeas, através de avaliações comportamentais e de sinalização celular.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, com 50 dias de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT). Os animais foram separados em grupos e mantidos em gaiolas apropriadas forradas com maravalha, contendo água e ração à vontade, e foram manipulados e eutanasiados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFT (CEUA-UFT, protocolo 23.101.001.708/2019-63).

### **2.2 Indução de deficiência de tiamina**

Foi utilizado no estudo o modelo de deficiência dietética de tiamina em conjunto com injeções de amprólio (MORAES et al., 2018). Os camundongos foram separados

em seis grupos (n = 6 por grupo) e submetidos a diferentes tratamentos. Três foram grupos controle, que receberam solução salina (grupo Cont, NaCl 0,9%), antioxidante Trolox (Grupo Tr, 1 mg/kg) ou anti-inflamatório dimetilsulfóxido (DMSO; grupo DmsO, 1 ml/kg); e três foram grupos deficientes, que receberam amprólio isoladamente (grupo Amp, 60 mg/kg) ou amprólio associado aos neuroprotetores Trolox (grupo Amp+Tr) ou DMSO (grupo Amp+DmsO). Todas as substâncias foram administradas via intraperitoneal (i.p.) por 20 dias consecutivos. Os volumes injetados foram ajustados para 0,1 ml/10 g de peso corporal (CALINGASAN et al., 1996; CORDOVA et al., 2012). Os grupos controle (Cont, Tr e DmsO) receberam ao longo de todo o tratamento ração padrão AIN-93M (PRAG Soluções Biotecnológicas, SP, Brasil), segundo o *American Institute of Nutrition* (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os grupos deficientes (Amp, Amp+Tr e Amp+DmsO) receberam ração deficiente em tiamina AIN-93DT (PRAG Soluções Biotecnológicas, SP, Brasil) durante o período de tratamento. 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 seus pesos corporais e consumo de ração foram monitorados diariamente.

### 2.3 Análise comportamental

Para os testes de comportamento, os animais foram testados em rotarod e na arena de campo aberto. 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).

No rotarod a tarefa consistiu de duas etapas: condicionamento (treino) e teste (CORDOVA et al., 2012). O treino, com objetivo de alcançar valores basais semelhantes para todos os grupos, consistiu em condicionar os animais no cilindro estacionário do equipamento de rotarod (Insight Equipamentos Científicos, SP, Brasil) 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 eram submetidos à no máximo duas sessões adicionais de condicionamento. A falha na terceira sessão de condicionamento era critério de exclusão para as sessões de teste. Trinta minutos após a última sessão de condicionamento, os animais eram testados no rotarod e o tempo de latência da queda gravado para determinar o grau de coordenação motora. O teste consistiu de 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, realizado 24 h após o último dia dos tratamentos.

Os testes de campo aberto foram realizados em arena circular de 300 mm de diâmetro, com base acrílica branca dividida em 12 quadrantes e parede cilíndrica de acrílico transparente (Bonther, SP, Brasil). Os testes, com duração de 10 min, avaliaram os seguintes parâmetros: distância percorrida (número de quadrantes ultrapassados com os quatro membros), número de bolos fecais, número de levantamentos (*rearing*; levantamentos completos dos dois membros anteriores) e o número de movimentos de limpeza (*grooming*) (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 h após o último dia dos tratamentos (MORAES et al., 2018). Os resultados são expressos em porcentagem das aferições dos últimos dias em relação ao dia zero (100%).

## 2.4 Western blot

Após os tratamentos, os animais foram eutanasiados e tiveram o córtex cerebral e o tálamo dissecados e homogeneizados em solução tampão contendo 200 mM de Tris, 40 mM de EDTA, 4% de SDS, como pH 6,8. Logo em seguida a solução passou por fervura durante 5 minutos. Após a fervura, foi realizada uma diluição da amostra na proporção 1:4 em solução contendo 40% de glicerol, 50 mM de Tris e azul de bromofenol, acrescida de  $\beta$ -mercaptoetanol, para concentração final de 5%. A concentração das proteínas totais presentes nas amostras foi determinada pelo método de Lowry modificado (MEDEIROS et al., 2020).

Posteriormente, as amostras foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema *wet* e as formas totais e fosforiladas foram identificadas pelo uso de anticorpos específicos para ERK1/2 (Sigma-Aldrich, MO, EUA). A revelação foi realizada por cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e a densitometria das bandas foi quantificada pelo programa Image J<sup>®</sup> (National Institutes of Health, EUA). O nível de fosforilação de ERK1/2 foi determinado a partir da relação entre a densidade óptica da banda fosforilada com a banda total (MEDEIROS et al., 2020). O controle da carga de proteína foi realizado com o uso do anticorpo anti- $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich, MO, EUA).

## 2.5 Análise estatística

Os dados são expressos como média  $\pm$  E. P. M. A avaliação dos resultados foi determinada pela análise de variância de uma ou duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado. Os resultados são considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Ganho de peso e consumo de ração

Foi observado nas fêmeas deficientes em tiamina tratadas com amprólio (grupo Amp) uma redução no peso corporal após 20 dias de tratamento (Tabela 1) em comparação com o grupo controle (grupo Cont) ( $p < 0,01$ ). O mesmo perfil foi observado nas fêmeas deficientes que foram tratadas com Trolox (grupo Amp+Tr;  $p < 0,01$  em relação ao controle) e com DMSO (grupo Amp+DMSO;  $p < 0,01$  em relação ao controle). Nos grupos controles tratados com as substâncias neuroprotetoras, o uso do Trolox e do DMSO não alterou o peso corporal dos animais (grupo Tr,  $p = 0,570$ ; grupo DMSO,  $p = 0,156$ , relativos ao grupo Cont).

**Tabela 1.** Ganho de peso corporal de camundongos fêmeas no modelo de deficiência de tiamina com amprólio, simultaneamente tratados ou não com Trolox ou DMSO.

	Peso (g) - dia zero	Peso (g) - dia 20	Ganho de peso (g)
<b>Cont</b>	35,68 $\pm$ 1,68	41,17 $\pm$ 2,40	5,48 $\pm$ 1,22
<b>Amp</b>	33,77 $\pm$ 0,29	30,60 $\pm$ 0,35	-3,17 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
<b>Amp+Tr</b>	35,30 $\pm$ 5,10	27,65 $\pm$ 3,75	-7,65 $\pm$ 1,35 <sup>a</sup>
<b>Amp+Dmso</b>	37,80 $\pm$ 3,90	32,20 $\pm$ 2,54	-5,60 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>
<b>Tr</b>	39,30 $\pm$ 4,30	46,05 $\pm$ 4,75	6,75 $\pm$ 0,45
<b>Dmso</b>	31,75 $\pm$ 3,15	33,95 $\pm$ 3,25	2,20 $\pm$ 0,10

Os camundongos em diferentes grupos de tratamento receberam ração AIN-93M e solução salina (grupo Cont, NaCl a 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (grupo Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox (grupo Amp+Tr), ração AIN-93DT e amprólio com DMSO (grupo Amp+Dmso), ração AIN-93M e Trolox (grupo Tr), e ração AIN-93M e DMSO (grupo Dmso). Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. do ganho de peso corporal (g) durante o período experimental, derivados de seis replicatas independentes. Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. *a*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Cont.

Com relação ao consumo de ração (Tabela 2), as fêmeas deficientes tratadas com amprólio apresentaram redução acentuada no consumo, quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). Resultados similares foram observados nos animais deficientes tratados com Trolox (grupo Amp+Tr,  $p < 0,01$  em relação ao grupo Cont) ou DMSO (grupo Amp+DMSO,  $p < 0,01$  em relação ao grupo Cont). O uso de Trolox e DMSO *per se* (grupos Tr e Dms) não alterou o consumo de ração por estes animais.

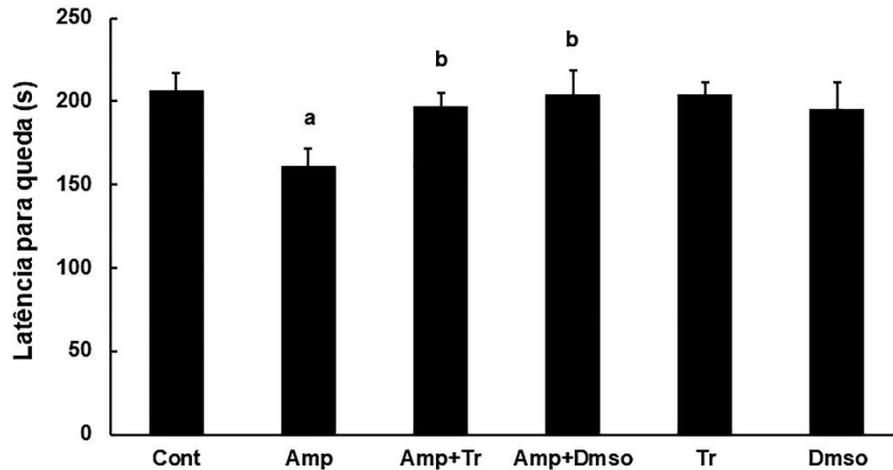
**Tabela 2.** Consumo de ração dos camundongos fêmeas no modelo de deficiência de tiamina com amprólio, simultaneamente tratados ou não com Trolox ou DMSO.

	Consumo (g) - dia zero	Consumo (g) - dia 20	Varição (g)
<b>Cont</b>	5,00 ± 0,55	3,80 ± 0,55	-1,20 ± 0,34
<b>Amp</b>	4,55 ± 0,34	2,02 ± 0,46	-2,53 ± 0,21 <sup>a</sup>
<b>Amp+Tr</b>	4,55 ± 0,36	2,18 ± 0,44	-2,37 ± 0,13 <sup>a</sup>
<b>Amp+Dms</b>	4,99 ± 0,20	2,27 ± 0,10	-2,72 ± 0,16 <sup>a</sup>
<b>Tr</b>	5,03 ± 0,32	4,01 ± 0,51	-1,02 ± 0,19
<b>Dms</b>	4,78 ± 0,30	4,24 ± 0,24	-0,55 ± 0,42

Os camundongos em diferentes grupos de tratamento receberam ração AIN-93M e solução salina (grupo Cont, NaCl a 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (grupo Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox (grupo Amp+Tr), ração AIN-93DT e amprólio com DMSO (grupo Amp+Dms), ração AIN-93M e Trolox (grupo Tr), e ração AIN-93M e DMSO (grupo Dms). Dados são expressos como média ± E.P.M. do consumo de ração (g) durante o período experimental, derivados de seis replicatas independentes. Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Cont.

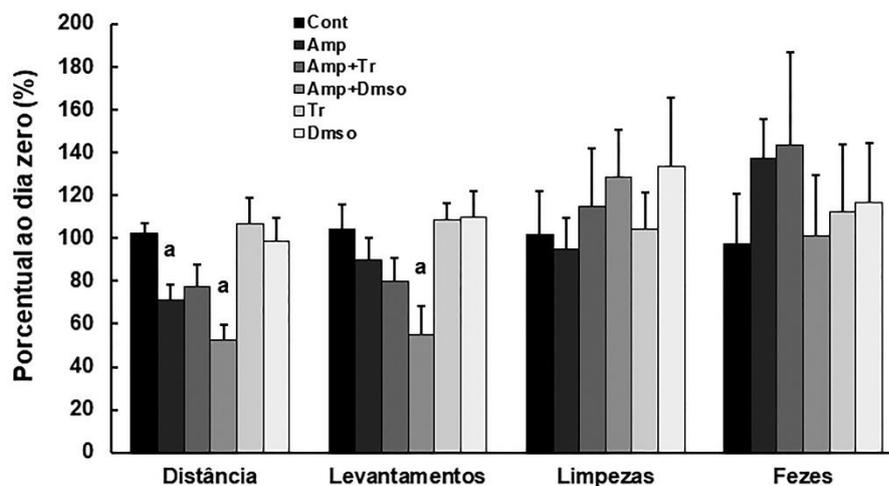
### 3.2 Análises comportamentais

No teste de rotarod (Figura 1) as fêmeas deficientes em tiamina (grupo Amp) após 20 dias de tratamento apresentaram menor tempo de latência para a queda (168,25 s ± 8,9,  $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle (Cont = 206,6 s ± 10,10). Entretanto, o uso concomitante do Trolox (grupo Tr) e do DMSO (grupo Dms) reverteu o efeito da DT nos animais (grupo Amp+Tr,  $p < 0,05$ ; grupo Amp+DMSO,  $p < 0,05$ ).



**Figura 1.** Teste de coordenação motora do rotarod em camundongos fêmeas deficientes em tiamina com amprólio. Dados são expressos como média (s)  $\pm$  E.P.M. (n = 6). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. a  $p \leq 0,05$  comparado ao controle, b  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo Amp.

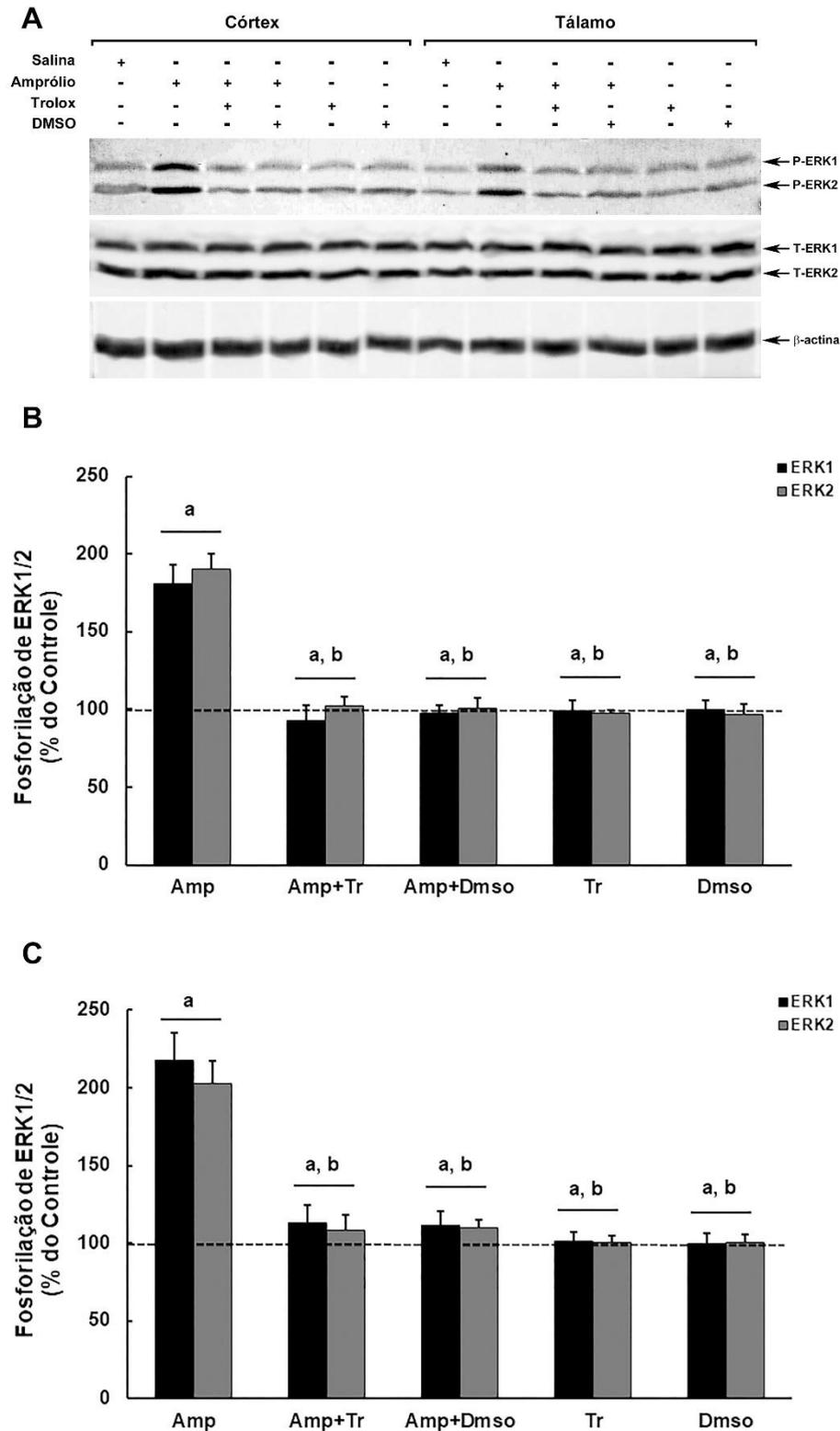
No teste de campo aberto (Figura 2) as fêmeas deficientes (grupo Amp) apresentaram redução de 28,91% na distância percorrida em comparação com o grupo controle ( $p < 0,02$ ). A associação do Trolox (grupo Tr) e do DMSO (grupo Dms o) não reverteu este efeito (grupo Amp+Tr,  $p = 0,599$ ; grupo Amp+DMSO,  $p = 0,136$ ). Houve ainda, redução na atividade exploratória do grupo Amp, sem reversão dos efeitos quando os animais foram tratados com a associação de Trolox ou de DMSO. Não foi observada alteração nos parâmetros limpeza e eliminação de bolos fecais em todos os grupos.



**Figura 2.** Teste de campo aberto em camundongos fêmeas deficientes em tiamina com amprólio. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) das porcentagens relativas ao dia zero. Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. a  $p \leq 0,05$  comparado ao controle.

### 3.3 Avaliação da modulação de ERK1/2

Na avaliação da participação do estresse oxidativo e da inflamação na modulação de vias de sinalização celular no SNC em camundongos fêmeas deficientes em tiamina, observamos um interessante efeito sobre a via da ERK1/2 (Figura 3). Tanto no córtex cerebral, quanto no tálamo, os animais deficientes (grupos Amp) exibiram aumento da fosforilação de ERK1/2 em aproximadamente 100% ( $p < 0,01$ , em relação aos controles). Entretanto, em ambos os grupos deficientes tratados com Trolox (grupo Amp+Tr) ou DMSO (grupo Amp+DmsO), houve supressão total do aumento de fosforilação de ERK1/2 ( $p < 0,01$ , em relação aos grupos Amp), tanto no córtex cerebral quanto no tálamo, evidenciando a forte participação do estresse oxidativo e da inflamação na modulação desta via nas fêmeas (Figura 3).



**Figura 3.** Perfil de fosforilação de ERK1/2 no sistema nervoso de camundongos fêmeas deficientes em tiamina com amprólio, tratados ou não com Trolox ou DMSO. Painele mostra imagens representativas de *immunoblottings* (A) e quantificações de ERK1/2 no córtex cerebral (B) e no tálamo (C). Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens relativas aos controles (considerados 100%,  $n = 6$ ). Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. *a*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, *b*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Amp.

## 4 DISCUSSÃO

A atuação da tiamina como coenzima importante na geração de energia no interior da célula é bastante conhecida, portanto a deficiência ou bloqueio dessa molécula pode levar a quadros de déficit energético e conseqüentemente disfunções no organismo pela carência energética (ÁLVAREZ, VERA, 2008).

As primeiras manifestações observadas nas fêmeas deficientes estão relacionadas ao peso e ao consumo de ração, onde pode ser observado uma redução significativa no peso corporal em conjunto com a redução no consumo de ração pelos animais, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o uso de substâncias neuroprotetoras (Trolox e DMSO) não foi o suficiente para reverter o quadro de anorexia apresentado pelos animais. Este resultado encontrado em fêmeas é condizente com as manifestações apresentadas em outros estudos, que utilizaram animais machos (MORAES et al., 2018; PEREIRA et al., 2017), mostrando que a tiamina desempenha um importante papel na regulação do consumo de ração e, conseqüentemente, no ganho de peso corporal (GRALAK et al., 2019; PAVLOVA et al., 2021; PEREIRA et al., 2017). Estes estudos mostram ainda, que o sexo dos animais não parece influenciar negativamente na utilização destes parâmetros.

A neuroinflamação é hoje reconhecida como um componente importante para uma variedade de doenças, dentre elas a DT. Recentemente, demonstrou-se que existem regiões do encéfalo mais vulneráveis à DT, pela presença de maior transcrição de genes relacionados às citocinas pró-inflamatórias. A inflamação também está envolvida na produção de peroxissomos e conseqüente, dano à membrana mitocondrial e sua função, resultando em aumento de EROs relacionadas ao estresse oxidativo (HAZELL, 2013). No presente estudo realizado em camundongos fêmeas, foi observado o papel na neuroinflamação e do estresse oxidativo no córtex cerebral e tálamo que, através do uso concomitante do Trolox (antioxidante) ou do DMSO (anti-inflamatório) foi possível alterar totalmente o aumento da fosforilação de ERK1/2 em ambas as estruturas.

A ação Trolox e DMSO também foi observada nos testes comportamentais (rotarod), mantendo o tempo de latência para queda nas fêmeas deficientes que utilizaram as substâncias, evidenciando a influência da inflamação e do estresse oxidativo na atividade motora do animal. Entretanto, no teste de campo aberto não foi observada reversão dos danos provocados pela DT quando utilizados Trolox e DMSO,

indicando que outras vias possam estar envolvidas nesse processo. O mesmo padrão foi observado em experimentos de indução de DT em machos (MORAES et al., 2018).

## 5 CONCLUSÃO

Foi possível observar alterações comportamentais em fêmeas deficientes, como perda de coordenação motora, observada através do teste do rotarod. Além disso, apresentarem menor atividade locomotora, com redução da distância percorrida e da atividade exploratória.

O uso do Trolox ou do DMSO aumentou o tempo de latência para queda, porém, não alterou a atividade exploratória dos animais (distância percorrida e levantamento). As fêmeas deficientes apresentaram redução no peso corporal e no consumo de ração, e estes efeitos não foram revertidos com o uso do Trolox ou DMSO.

O tálamo e o córtex cerebral são áreas bastante afetadas pela DT, e houve um aumento considerável na fosforilação de ERK1/2 nesses tecidos, nos animais deficientes com amprólio.

O estresse oxidativo e a inflamação estão presentes no distúrbio neurológico gerado pela deficiência de tiamina em fêmeas, evidenciado pelo uso do Trolox e do DMSO, que são capazes de controlar significativamente esses efeitos no tecido nervoso.

## REFERÊNCIAS

ABDOU, E.; HAZELL, A. S. Thiamine Deficiency: an update of pathophysiologic mechanisms and future therapeutic considerations. **Neurochemical Research**, v. 40, p. 353-361, 2014.

ALVARENGA, P. G. M. et al. Estudo *in vitro* do efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) e do óleo essencial de *Ageratum fastigiatum* nas propriedades biomecânicas de leucócitos humanos: uma análise por meio de citometria de fluxo, microscopia óptica e confocal. In: **Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos**, n. 14, p. 946-955, 2017.

ÁLVAREZ, M. J. S.; VERA, D. G. Z. Déficit de Tiamina: Beriberi y síndrome de Wernick-Korsakoff. **Revista Medicina**, v. 13, n. 2, 2008.

BOULEBD, H. Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and Theoretical study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1201, p. 127-210, 2019

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.

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

GRALAK, M. A. et al. Thiamine deficiency affects glucose transport and  $\beta$ -oxidation in rats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, p. 1629-1635, 2019.

HAZELL, A. S. et al. The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: a multifactorial targeting issue. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 796-802, 2013.

HAZELLY, A. S.; BUTTERWORTH, R. F. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. **Alcohol & Alcoholism**, v. 44, n. 2, p. 141-147, 2009. MEDEIROS, R. C. N. et al. Thiamine deficiency modulates p38 MAPK and Heme Oxygenase-1 in mouse brain: association with early tissue and behavioral changes. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 4, p. 940-955, 2020.

MORAES, J. O. et al. Amprolium Exposure Alters Mice Behavior and Metabolism in Vivo. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 1, n. 4, p. 272-281, 2018.

PAVLOVA, O. et al. Thiamine deficiency in rats affects thiamine metabolism possibly through the formation of oxidized thiamine pyrophosphate. **General Subjects**, v. 1865, 2021.

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.

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 Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

SANTOS, I. F. C. et al. Avaliação do efeito anti-inflamatório do dimetilsulfóxido em cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária e submetidas à mastectomia unilateral. **PUBVET**, v. 14, n. 11, p. 1-11, 2020.

## CAPÍTULO 4. Considerações Finais

---

A partir destes estudos foi desenvolvido e padronizado um novo método de indução de deficiência de tiamina em camundongos com o uso do amprólio. Foi estipulado dose e tempo de exposição necessários para que os efeitos da DT possam ser observados nos animais *in vivo* e no tecido nervoso, mas sem a presença de sinais graves, como desenvolvimento de convulsão e morte do animal, como ocorre nos estágios avançados da deficiência com o uso da piritiamina.

Durante o estudo foi observado que a DT se desenvolve de forma diferente em camundongos machos e fêmeas, indicando que as fêmeas possuem algum mecanismo de proteção ou adaptação, que nos machos não foi observado. É interessante buscar entender em trabalhos posteriores, o porquê desta divergência presente entre os sexos e quais mecanismos possam estar relacionados à esta proteção. É importante, portanto, também considerar ambos os sexos em estudos experimentais de indução de DT.

Muito ainda precisa ser estudado para compreender as vias de sinalização envolvidas em processos neurodegenerativos, incluindo a deficiência de tiamina. Porém, com este estudo, temos hoje mais informações acerca desta enfermidade tão pouco mencionada, mas tão presente na nossa sociedade. Estudos como este trazem não só informações, mas também soluções para o tratamento e melhoria da qualidade de vida de parte da população.

Para a obtenção de um tratamento eficaz, é importante primeiramente entender a causa, o desenvolvimento e os mecanismos envolvidos em determinada doença. A realização de estudos em animais nos traz informações que somente são possíveis de se observar *in vivo*, e desta forma, pesquisas desta natureza são de extrema importância para a elucidação dos processos envolvidos no desenvolvimento de diversas doenças.