

Rogério de Freitas Lacerda

Alterações cognitivas espaciais e parâmetros neuroquímicos cerebrais
associados aos processos de morte celular em modelos experimentais de
deficiência de tiamina e/ou consumo de etanol

Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
Março de 2020

Rogério de Freitas Lacerda

Alterações cognitivas espaciais e parâmetros neuroquímicos cerebrais
associados aos processos de morte celular em modelos experimentais de
deficiência de tiamina e/ou consumo de etanol

Tese submetida ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Ângela Maria Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis
Gomes

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2020

043 Lacerda, Rogério de Freitas.
Alterações cognitivas espaciais e parâmetros neuroquímicos cerebrais associados aos processos de morte celular em modelos experimentais de deficiência de tiamina e/ou consumo de etanol [manuscrito] / Rogério de Freitas Lacerda. - 2020.
284 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Ângela Maria Ribeiro. Co-orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica. 2. Disfunção Cognitiva. 3. Deficiência de Tiamina. 4. Cálcio. 5. Caspases. 6. Morte Celular. 7. Ratos Wistar. 8. Ratos Sprague-Dawley. I. Ribeiro, Ângela Maria. II. Gomes, Dawidson Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

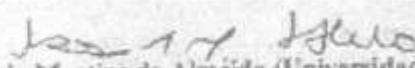
CDU: 577.1

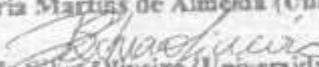


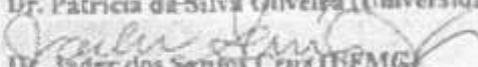
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ROGÉRIO DE FREITAS LACERDA.
 Aos cinco dias do mês de março de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Alterações cognitivas espaciais e parâmetros neuroquímicos cerebrais associados aos processos de morte celular em modelos experimentais de deficiência de tiamina e/ou consumo de etanol", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ângela Maria Ribeiro, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Dawidson Assis Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Rosa Maria Martins de Almeida (Universidade Federal do Rio Grande Do Sul), aprovado; Dr. Patrícia da Silva Oliveira (Universidade Federal da Bahia), aprovado; Dr. Jader dos Santos Cruz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Anilton Cesar Vasconcelos (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Ângela Maria Ribeiro - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

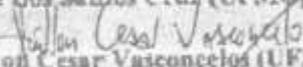
APROVADO
 REPROVADO

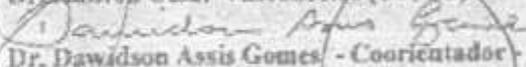
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de março de 2020.

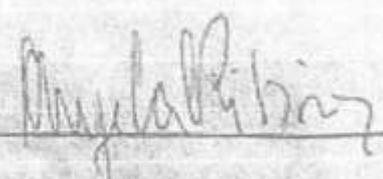

 Dr. Rosa Maria Martins de Almeida (Universidade Federal do Rio Grande Do Sul)


 Dr. Patrícia da Silva Oliveira (Universidade Federal da Bahia)


 Dr. Jader dos Santos Cruz (UFMG)


 Dr. Anilton Cesar Vasconcelos (UFMG)


 Dr. Dawidson Assis Gomes - Coorientador (UFMG)


 Dr. Ângela Maria Ribeiro - Orientadora (UFMG)



Agradecimentos

Parece ontem, 4 anos se passaram com um piscar de olhos. Hoje estou terminando meu doutorado, preste a começar novos caminhos. Ao longo desse tempo conheci pessoas, tive alegrias, dificuldades. São coisas da vida que aprendemos a lidar e nos fortalece cada vez mais. Aprendi muito, ouvindo, debatendo e jogando conversa fora, percebendo as sutilezas do discurso de cada um. Aprendi muito e espero ter contribuído com a história de cada um. Cada um com sua individualidade me ajudaram e me fizeram crescer. Hoje um ciclo termina, mas espero que todos possam crescer e ser vitoriosos em suas escolhas. Faço minhas palavras alguns versos de Oswaldo Montenegro, músico brasileiro, que em uma de suas músicas, citada logo abaixo, expressa um pouco desses sentimentos.

Agradecimento especial à minha orientadora, professora Ângela, ao meu coorientador, professor Dawidson, à professora Lisa que conheci e trabalhei pouco tempo, mas de forma intensa. Agradeço ainda à Cida, amiga do dia-a-dia, com seu apoio incondicional durante essa trajetória, tanto nas questões burocráticas, como pessoais. Agradeço aos amigos Poliana, Isabela, Valéria, Flávio, Mariana, Carolina, aos IC: Marina, Carol, Maria Eugénia que contribuíram com meus esforços; aos ICs que se juntaram posteriormente, Briana e Lucas.

Agradeço ainda aos amigos feitos no programa de Pós-graduação, amizade que levo pra vida. Orlando, Alexandre e não menos importante Jamil.

Agradeço aos amigos feitos durante as disciplinas de Bases, os das conversas de corredor, nos quais convivemos pouco, mas que participaram dessa trajetória.

Por último e não menos importante a minha esposa, Suzana, não por esta trajetória, mas por muitas que convivemos ao longo destes 14 anos de casados.

Enfim o meu muito obrigado.

"Estrada Nova"

*“Eu conheço o medo de ir embora
Não saber o que fazer com a mão
Gritar pro mundo e saber
Que o mundo não presta atenção
Eu conheço o medo de ir embora
Embora não pareça, a dor vai passar
Lembra se puder
Se não der, esqueça
De algum jeito vai passar
O sol já nasceu na estrada nova
E mesmo que eu impeça, ele vai brilhar
Lembra se puder
Se não der esqueça
De algum jeito vai passar
Eu conheço o medo de ir embora
O futuro agarra a sua mão
Será que é o trem que passou
Ou passou quem fica na estação?
Eu conheço o medo de ir embora
E nada que interessa se pode guardar
Lembra se puder
Se não der esqueça
De algum jeito vai passar”*

Oswaldo Montenegro

RESUMO

Diferentes modelos experimentais têm sido utilizados para se estudar aspectos moleculares e comportamentais de processos neurodegenerativos, sendo um desses modelos a deficiência de tiamina (DT), associada ou não ao consumo de etanol, em roedores. Apesar dos vários estudos, muitos pontos continuam obscuros, como p.ex. os mecanismos moleculares envolvidos na morte neuronal, as diferenças de suscetibilidade entre as regiões cerebrais e as relações entre alterações neurobiológicas e aspectos cognitivos. Os objetivos do presente estudo foram verificar os impactos da DT e/ou do consumo de etanol sobre parâmetros relacionados à morte neuronal, em estágios diferentes do processo, em três regiões (córtex pré-frontal-CPF, hipocampo e tálamo) do cérebro de ratos. Os parâmetros analisados foram níveis de Ca^{2+} , atividade de caspases (3/7, 8 e 9), expressão de genes codificadores de caspases (*CASP*s), receptores (*AMPA1*), canais iônicos (*CACNA1C*), intermediários da neurotransmissão (*AKT1*, *MAPK8*, *NFκβ*) e fator neurotrófico (*BDNF*). Além disto, avaliamos o desempenho cognitivo dos animais em tarefas de navegação espacial. Observamos déficits cognitivos significativos, no aprendizado e memória, e várias alterações neuroquímicas dependentes da região e do estágio dos tratamentos. Ocorreu uma redução reversível na tiamina mono (TMP) e difosfato (TDP), em todos os tecidos analisados. Além disto, a DT afetou a atividade das caspases 3/7, 8 e 9. No CPF, as atividades das caspases-8 e 3 se encontraram reduzidas, após período de recuperação. No hipocampo, observamos redução das atividades das caspases-8 e 9, no último dia do episódio de DT. Em relação a expressão gênica, observamos efeito reversível (aumento da expressão dos *AMPA1* e *CACNA1C*) no CPF, durante o episódio de DT. Esses dados indicam papéis importantes dos canais de Ca^{+2} -voltagem dependente e dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos, como coparticipantes do processo de morte neuronal (marcação com iodeto de propídio-IP aumentada). No hipocampo, diferentemente do CPF, observamos um aumento apenas da expressão do *CACNA1C* no último dia do episódio. No tálamo, ocorreu um aumento da expressão do *AMPA1* e redução do *CACNA1* durante o episódio de DT, sendo que ambos se encontraram reduzidos após 24 h de recuperação. Durante o episódio de DT, os níveis do íon Ca^{+2} livre aumentaram no CPF, retornando a valores dos controles, após período de recuperação. O aumento da $[Ca^{2+}]$ intracelular no CPF pode ser um dos fatores responsáveis pela inibição da enzima fosfatase que degrada TTP, o que explicaria o aumento que observamos na [TTP] nesta região. Por outro lado,

no hipocampo e no tálamo não observamos aumento na $[Ca^{2+}]$. Testes de viabilidade celular, usando marcação IP, mostraram um aumento da morte celular no último dia do episódio de DT, tanto no CPF e aparente efeito da DT nas regiões do hipocampo (CA3 e DG). Após período de recuperação de 4 semanas, animais do grupo DT, que não foram submetidos ao teste cognitivo, apresentaram redução na expressão dos genes *CASP3*, *MAPK8*, *CACNA1C* no tálamo. Esse efeito não foi observado nos animais submetidos à tarefa cognitiva. Isto indica um provável efeito, direto ou indireto, do treino cognitivo sobre a regulação da expressão desses genes no tálamo. Verificamos ainda sinergismo entre os efeitos do consumo crônico de etanol e DT, em relação à diminuição na expressão dos genes *CASP3*, *CASP8*, *AKT1*, *MAPK8*, *NFκβ*, *BDNF*, no hipocampo. Alterações na atividade das caspases no hipocampo, observadas concomitantemente com a marcação com IP, indicaram a ocorrência de processo de morte celular neste tecido. Concluímos que, os mecanismos que levam à morte celular, induzida por DT e/ou Etanol, são distintos nas três regiões cerebrais. Os achados do presente estudo mostram pela primeira vez que a DT/consumo crônico de etanol afetam componentes moleculares envolvidos em sistemas de controle da viabilidade celular e que, existem diferenças no mecanismo molecular relacionado à susceptibilidade das regiões cerebrais. As alterações neurobiológicas observadas no CPF e no hipocampo, podem representar parte importante dos mecanismos subjacentes ao processo neurodegenerativo responsável pelos déficits cognitivos espaciais induzidos pela DT e/ou etanol.

ABSTRACT

Different experimental models have been used to study molecular and behavioural aspects of neurodegenerative processes. One of these models is rodents submitted to thiamine deficiency (TD), associated or not with ethanol consumption. Despite several studies, many points remain unclear, such as the molecular mechanisms involved in neuronal death, the differences in susceptibility between brain regions and the relationships between neurobiological changes and cognitive aspects. The objectives of the present study were to verify the impacts of TD and/or ethanol consumption on parameters related to neuronal death, at different stages of the process, in three regions (prefrontal cortex-PFC, hippocampus and thalamus) of the rat brain. The parameters analysed were Ca^{2+} levels, activity of caspases (3/7, 8 and 9), expression of caspase encoding genes (*CASP*s), receptors (AMPA1), ion channels (*CACNA1C*), neurotransmission intermediates (*AKT1*, *MAPK8*, *NFK β*) and neurotrophic factor (*BDNF*). In addition, the cognitive performance of animals in space navigation tasks was assessed. We observed significant cognitive deficits, in learning and memory, and several neurochemical changes depending on the region and treatment stage. There was a reversible reduction in monophosphate thiamine (TMP) and diphosphate (TDP) in all tissues analysed. Moreover, the caspase 8 and 3 activities were reduced in PFC, after a recovery period. In the hippocampus, we observed a reduction in the activities of caspases 8 and 9, on the last day of the TD episode. Regarding gene expression, we observed a reversible effect (increased expression of *AMPA1* and *CACNA1C*) in the PFC during the TD episode. These data indicate important roles of the Ca^{+2} -dependent-voltage channels and glutamate ionotropic receptors as co-participants in the process of neuronal death (increased propidium iodide [PI] labelling). In the hippocampus, unlike the PFC, we observed only an increase in the expression of *CACNA1C* on the last day of the episode. In the thalamus, there was an increase in the expression of AMPA1 and a reduction in *CACNA1C* during the TD episode, and both were reduced after 24 hours of recovery. During the TD episode, the Ca^{+2} levels increased in the PFC, returning to the values of the controls after a recovery period. The increase in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in the PFC may be one of the factors responsible for the inhibition of the phosphatase enzyme that degrades TTP, which would explain the increase that we observed in the [TTP] in this *region*. Conversely, in the hippocampus and thalamus we not observed an increase in $[\text{Ca}^{2+}]$. Cell viability tests, using PI labelling, showed an increase in cell death on the

last day of the TD episode, in the PFC and apparent effect of DT on hippocampus (CA3 and DG). After a recovery period of 4 weeks, animals from the TD group, which were not submitted to the cognitive test, showed a reduction in the expression of *CASP3*, *MAPK8*, *CACNA1C* genes in the thalamus. These effects were not observed in animals submitted to cognitive task. It indicates a probable effect, direct or indirect, of cognitive training on the regulation of the expression of these genes in the thalamus. We also found synergism between the effects of chronic ethanol consumption and TD, in relation to the decrease in the expression of *CASP3*, *CASP8*, *AKT1*, *MAPK8*, *NFκβ*, *BDNF* genes in the hippocampus. Changes in caspase activity in the hippocampus, observed concomitantly with the labelling with PI, indicated the occurrence of a cell death process in this tissue. We concluded that the mechanisms that lead to cell death, induced by TD and/or Ethanol, are distinct among the three brain regions. The findings of the present study show that TD/ethanol chronic consumption affect molecular components involved in cell viability control systems and that there are differences in the molecular mechanism related to the susceptibility of brain regions. The neurobiological changes observed here, in the PFC and hippocampus, might represent important part of the mechanisms subjacent to the neurodegenerative process responsible for spatial cognitive deficits induced by TD and/or ethanol.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTAS DE FIGURAS.....	14
LISTAS DE TABELAS	17
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	18
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	20
2. INTRODUÇÃO GERAL.....	24
<i>Aspectos Gerais</i>	<i>24</i>
Neurodegeneração	26
Doenças Neurodegenerativas.....	26
<i>Receptores AMPA, Níveis de Ca⁺² e Canais de cálcio: papel na neurodegeneração.....</i>	<i>51</i>
Memória e Aprendizado: Aspectos cognitivos	60
Deficiência em tiamina associado ou não ao etanol	74
3. HIPÓTESES ESPECIFICAS	87
4. OBJETIVOS	88
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	89
Aclimação dos animais e Etapas que antecederam o início dos experimentos	89
Modelos e Desenho Experimentais.....	90
<i>Deficiência de tiamina induzida por pirritiamina</i>	<i>93</i>
<i>Deficiência de tiamina induzida por pirritiamina, associada ao consumo crônico de etanol</i>	<i>96</i>
Estudo comportamental:	100
<i>Aparato</i>	<i>101</i>
<i>Memória Operacional</i>	<i>102</i>
<i>Aprendizado e Memória de referência</i>	<i>103</i>
<i>Aprendizado e Memória Operacional: Treino e Teste no LAM</i>	<i>103</i>
<i>Aprendizado e memória de referência: Treino e Teste</i>	<i>105</i>

Estudos Histológicos e dosagens neuroquímicas.....	108
<i>Determinações das concentrações de tiamina e seus derivados fosforilados</i>	109
<i>Determinações das atividades de caspases canônicas</i>	111
<i>Dosagem dos níveis de cálcio livre</i>	113
<i>a) Ajuste das condições ótimas para dosagem de cálcio em amostras de tecido cerebral, utilizando microplaca e kit comercial</i>	113
<i>b) Determinações dos níveis de cálcio nas amostras biológicas</i>	115
<i>Dosagem de proteína total</i>	116
<i>Teste de Viabilidade Celular – MTT</i>	117
<i>Teste de Viabilidade Celular – Calceína e Iodeto propídio</i>	118
<i>Análise de qPCR (Exps. IV, V e VI)</i>	119
Análise Estatística.....	123
6. RESULTADOS	126
Modelo Experimental	126
Estudos Comportamentais: aspectos cognitivos espaciais	134
<i>Dados Comportamentais dos Experimentos II e III: ratos Wistar</i>	134
<i>Dados Comportamentais do Experimento IV: ratos Sprague Dawley</i>	145
Estudos Histológicos e Neuroquímicos	150
<i>Concentrações de tiamina e isoformas fosforiladas:</i>	150
<i>Níveis de cálcio livre</i>	157
<i>Atividades das caspases</i>	160
<i>Viabilidade Celular – MTT = Atividades desidrogenases mitocondriais</i>	164
<i>Ensaio de Viabilidade celular – Calceína e Iodeto de Propídio</i>	166
<i>Expressão Gênica</i>	173
7. DISCUSSÃO	221
Modelo Experimental	221
Estudos Comportamentais: aspectos cognitivos espaciais	223
Estudos Histológicos e Neuroquímicos	226
<i>Concentrações de tiamina e isoformas fosforiladas:</i>	226
<i>Níveis de cálcio livre</i>	231
<i>Atividades das caspases</i>	233
<i>Ensaio de Viabilidade celular – Calceína e Iodeto de Propídio</i>	237
<i>Expressão Gênica</i>	239

8.	CONCLUSÕES GERAIS	249
13.	REFERÊNCIAS.....	252
13.	ANEXOS.....	275

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA MOSTRANDO OS TIPOS DE MORTE CELULAR.....	32
FIGURA 2: VIA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA APOPTOSE.....	43
FIGURA 3: MODELO DE FUNCIONAMENTO DE RECEPTORES DE DEPENDÊNCIA (DEPENDENCE RECEPTORS)	45
FIGURA 4: DIAGRAMA DA TOPOLOGIA DA SUBUNIDADE ALFA DO CANAL DE CÁLCIO DEPENDENTE DE VOLTAGEM (CAV-1.2). FIGURA MODIFICADA E RETIRADA DO ARTIGO DOS AUTORES ZAMPONI ET AL., (2015).....	56
FIGURA 5: ESQUEMA INDICANDO ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CÁLCIO (INFLUXO ATRAVÉS DE CANAIS CAV) E MORTE CELULAR....	59
FIGURA 6: FLUXOGRAMA DOS TIPOS DE MEMÓRIAS,.....	62
FIGURA 7: ESQUEMA INDICANDO AS INTERCONVERSÕES ENZIMÁTICAS DA TIAMINA E SEUS DERIVADOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS, DE ACORDO COM OS AUTORES BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, (2009) E BUTTERWORTH, (2003).....	79
FIGURA 8: DESENHO EXPERIMENTAL DOS EXPERIMENTOS (I –IV) COM DT	96
FIGURA 9: DESENHO EXPERIMENTAL DOS EXPERIMENTOS (V E VI) COM DT ASSOCIADA COM CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL	100
FIGURA 10: FOTO DA SALA DE EXPERIMENTAÇÃO (LANEC) MOSTRANDO UMA VISÃO SUPERIOR DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.	102
FIGURA 11: DIAGRAMA DO LAM, INDICANDO OS QUADRANTES, A POSIÇÃO DA PLATAFORMA EM CADA DIA/SESSÃO, DURANTE A REALIZAÇÃO DO TREINO E TESTE DE MEMÓRIA OPERACIONAL.....	104
FIGURA 12: DIAGRAMA DO LAM INDICANDO OS QUADRANTES E POSIÇÃO DA PLATAFORMA, DURANTE O TREINO E TESTE DE MEMÓRIA ESPACIAL DE REFERÊNCIA.....	106
FIGURA 13: FIGURAS MOSTRANDO OS PLANOS DE CORTES PARA OBTENÇÃO DAS TRÊS ESTRUTURAS CEREBRAIS.	109
FIGURA 14: ESBOÇO DA REAÇÃO CATALÍTICA DAS ENZIMAS CASPASES.	112

FIGURA 15: CONCENTRAÇÕES (MÉDIA +/- SEM) DE CÁLCIO.....	115
FIGURA 16: ESBOÇO DA REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT EM FORMAZAN (DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS).....	117
FIGURA 17: CONSUMO DE RAÇÃO (MÉDIA +/- SEM), EXPRESSO EM GRAMAS, DURANTE O EPISÓDIO DE DT.....	127
FIGURA 18: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	129
FIGURA 19: VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL (MÉDIA +/- SEM), EM GRAMAS (G), DOS ANIMAIS DOS TRÊS GRUPOS EXPERIMENTAIS: DT	130
FIGURA 20: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	132
FIGURA 21: VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL (MÉDIA +/- SEM), EM GRAMAS (G), DOS ANIMAIS DOS QUATRO GRUPOS EXPERIMENTAIS. CP E CP- LAM (DIFERENÇA EM RELAÇÃO À EXPERIÊNCIA COGNITIVA) E DT E DT-LAM (DIFERENÇA EM RELAÇÃO À EXPERIÊNCIA COGNITIVA). DT	133
FIGURA 22: CURVAS DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA ESPACIAL OPERACIONAL E DE REFERENCIA, EXPRESSOS COMO LATÊNCIA PARA ENCONTRAR A PLATAFORMA.	136
FIGURA 23: CURVAS DO DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO TESTE DE MEMÓRIA OPERACIONAL, EXPRESSOS COMO “EFICIÊNCIA”, MÉDIA +/- SEM, PARA CADA GRUPO CP E DT, NAS TRÊS TENTATIVAS DE CADA DIA/SESSÃO.....	139
FIGURA 24: DADOS DO TESTE COMPROBATÓRIO, EXPRESSOS EM LATÊNCIA (MÉDIA +/- SEM): MEMÓRIA DE REFERÊNCIA (PAINEL A, 1 ^o MIN) E EXTINÇÃO (PAINEL B, 2 ^o MIN).....	143
FIGURA 25: DADOS DO TESTE COMPROBÁTORIO, EXPRESSOS COMO A QUANTIDADE DE VEZES QUE O ANIMAL CRUZA O LOCAL ONDE SE ENCONTRAVA A PLATAFORMA (POSIÇÃO DA PLATAFORMA DURANTE O TREINO), MÉDIA +/- SEM.	145
FIGURA 26: CURVAS DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA ESPACIAL OPERACIONAL E DE REFERENCIA, EXPRESSOS COMO LATÊNCIA PARA ENCONTRAR A PLATAFORMA.	148
FIGURA 27: DADOS DO TESTE COMPROBÁTORIO, EXPRESSOS COMO A QUANTIDADE DE VEZES QUE O ANIMAL CRUZA O LOCAL ONDE SE	

ENCONTRAVA A PLATAFORMA (POSIÇÃO DA PLATAFORMA DURANTE O TREINO), MÉDIA +/- SEM.....	150
FIGURA 28: NÍVEIS DE CÁLCIO LIVRE (MÉDIA +/- SEM, EM $\mu\text{G}/\text{MG}$ DE TECIDO) NO MEIO EXTRACELULAR + CITOSOL, EM AMOSTRAS DO CPF (PAINEL A), HIPOCAMPO (PAINEL B) E TÁLAMO (PAINEL C).....	160
FIGURA 29: ATIVIDADES DAS CASPASES 8, 9 E 3/7, NO CPF, HIPOCAMPO E TÁLAMO, DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CP E DT NOS TEMPOS T2 E T6.	163
FIGURA 30: ATIVIDADES DAS DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS.....	165
FIGURA 31: IMAGENS REPRESENTATIVAS (PAINEL A) E DADOS QUANTITATIVOS (PAINEL B) DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A MARCAÇÃO COM IP E CALCEÍNA, EM AMOSTRAS DO CPF DOS ANIMAIS DOS GRUPOS DT E CP (CONTROLE PAREADO).	168
FIGURA 32: IMAGENS REPRESENTATIVAS (PAINEL A) E DADOS QUANTITATIVOS (PAINEL B) DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A MARCAÇÃO COM IP E CALCEÍNA, EM AMOSTRAS DE SUBREGIÕES DO HIPOCAMPO, DOS ANIMAIS DOS GRUPOS DT E CP (CONTROLE PAREADO).....	170
FIGURA 33: IMAGENS REPRESENTATIVAS (PAINEL A) E DADOS QUANTITATIVOS (PAINEL B) DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A MARCAÇÃO COM IP E CALCEÍNA, EM AMOSTRAS DO TÁLAMO DOS ANIMAIS DOS GRUPOS DT E CP (CONTROLE PAREADO).	172
FIGURA 34: DADOS (MÉDIA, EM NEGRITO +/- SEM, EM ITÁLICO) DA EXPRESSÃO DOS GENES CASP8, CASP9, CASP3, AKT1, AMPA1, MAPK8, NFKB1, CACNA1C E BDNF	180
FIGURA 35: DADOS (MÉDIA, EM NEGRITO +/- SEM, EM ITÁLICO) DA EXPRESSÃO DOS GENES CASP8, CASP9, CASP3, AKT1, AMPA1, MAPK8, NFKB1, CACNA1C E BDNF	195
FIGURA 36: DADOS (MÉDIA, EM NEGRITO +/- SEM, EM ITÁLICO) DA EXPRESSÃO DOS GENES CASP8, CASP9, CASP3, AKT1, AMPA1, MAPK8, CACNA1C E NFKB1, EM AMOSTRAS DO CPF	203
FIGURA 37: DADOS (MÉDIA, EM NEGRITO +/- SEM, EM ITÁLICO) DA EXPRESSÃO DOS GENES CASP8, CASP9, CASP3, AKT1, AMPA1, MAPK8, CACNA1C E NFKB1, EM AMOSTRAS DO HIPOCAMPO.....	211

FIGURA 38: DADOS (MÉDIA, EM NEGRITO +/- SEM, EM ITÁLICO) DA EXPRESSÃO DOS GENES CASP8, CASP9, CASP3, AKT1, AMPA1, MAPK8, CACNA1C E NFKB1, EM AMOSTRAS DO TÁLAMO	220
---	-----

LISTAS DE TABELAS

TABELA I: RESUMO GERAL DOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DOS TRATAMENTOS COM DT ASSOCIADA OU NÃO AO CONSUMO DE ETANOL.....	92
TABELA II: LOCAL (QUADRANTES) DE LIBERAÇÃO DOS ANIMAIS EM CADA TENTATIVA PARA AS CINCO DIAS/SESSÕES DO TREINO (APRENDIZADO) E TESTE COMPROBATÓRIO (MEMÓRIA DE REFERÊNCIA) ESPACIAL.....	106
TABELA III: PRIMERS E SEQUENCIAS DO QPCR UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.	123
TABELA IV: TIAMINA E DERIVADOS (CPF, H E T).....	154

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aCSF – *Artificial Cerebrospinal Fluid* (Fluido Artificial Cérebro Espinhal)

AL – *Adjacent left* (Quadrante adjacente esquerdo)

APAF-1 - *Apoptotic protease activating factor 1* (Fator apoptótico ativador de protease
1)

APO-1 - *Apoptosis antigen 1* (Antígeno apoptótico)

AR – *Adjacent right* (Quadrante adjacente direito)

CA1 – *Cornu Ammonis 1*(Corno de Amon)

CA3 – *Cornu Ammonis 3*(Corno de Amon)

Calceína-AM – Calceína acetometil ester

CD95 – *Cluster of differentiation 95* (Grupo de diferenciação 95)

CPF – **C**órtex **P**ré-**F**rontal

DMSO – **D**imetilsulfóxido

DT – **D**eficiência de **t**iamina

DTT – 1,4-**D**itiotreitol

FAS - *First apoptosis signal* (Primeiro sinal apoptótico)

GD – Giro denteado

HPLC - *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta
eficiência)

IP – Iodeto de Propídio

LAM – Labirinto aquático de Morris

MO – Memória Operacional

MR – Memória Referencial

MTT – 4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol brometo

OP – *Opposite quadrant* (Quadrante oposto)

PTD – *Pyriithiamine induced thiamine deficiency* (DT induzida por piritiamina)

Rcf – *Relative Centrifugal Force* (Força centrífuga relativa)

RLU – *Relative Light Unit* (Unidade relativa de luminêscencia)

TDP – Tiamina difosfato

TMP – Tiamina monofosfato

TNF- α - *Tumor necrosis fator alfa* (Fator de necrose tumoral alfa)

TQ – *Target Quadrant* (Quadrante alvo)

TTP – Tiamina trifosfato

qPCR- *Quantitative real time-PCR* (PCR quantitativo em tempo real)

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Uma das questões importantes da neurobiologia é entender os mecanismos moleculares subjacentes às doenças neurodegenerativas, ou perda neuronal, associados às alterações comportamentais e cognitivas observadas em várias doenças do sistema nervoso central (SNC). O grupo de pesquisa do LANEK (BUENO, K.O. *et al.*, 2015; FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 1998; PIRES *et al.*, 2005; RESENDE, 2012) e outros autores (HIRSCH; PARROTT, 2012; INABA *et al.*, 2016; JHALA; HAZELL, 2011; SAVAGE, LISA M.; HALL; RESENDE, 2012) têm utilizado a deficiência de tiamina (DT), associada ou não ao consumo de etanol, como um modelo para estudar as alterações neurobiológicas e suas relações com aspectos comportamentais. Em vários estudos, utilizando roedores como modelo experimental, observamos que a DT induz déficits na aquisição de uma tarefa espacial, sendo que os efeitos dependem da etapa do processo de aprendizado, ocorrendo de forma mais pronunciada e significativa nas sessões iniciais e/ou intermediárias do treino. Em estudos prévios, mostramos que se for dada ao animal a oportunidade de repetir a tarefa por várias vezes, os efeitos da DT são revertidos por ação da própria repetição da tarefa, indicando que as alterações neurobiológicas podem ser revertidas com o treino cognitivo (BUENO, K.O. *et al.*, 2015; RESENDE, 2012; VIGIL *et al.*, 2010). A partir desses achados, podem se considerar que mesmo que a DT induza disfunções no SNC, que podem evoluir para a morte neuronal, outros fatores podem atuar antes do estabelecimento de lesões irreversíveis, revertendo os danos, como p.ex. por meio da estimulação da neurogênese. Resultados recentes, obtidos pelo nosso grupo, confirmaram essa hipótese, mostrando que dois desses fatores são o BDNF e a IL-1 β , sendo que os níveis do BDNF no hipocampo, alterados pelo treino, estão diretamente

relacionados à reversão do déficit cognitivo induzido pela DT (SENA, 2019). Outros autores (VEDDER; SAVAGE, 2017) mostraram que após aplicação exógena de BDNF, observaram reversão dos efeitos da DT sobre funções cognitivas, como por exemplo, os déficits nos processos de aprendizagem e memória espacial. Esses dados reforçam ainda mais as evidências de que o BDNF é importante para modular a plasticidade e adaptação neural dentro do circuito hipocampo-diencefálo (TSANOV *et al.*, 2011). Outros dados de estudos de análise proteômica, obtidos pelo nosso grupo (NUNES; GÓMEZ-MENDOZA; *et al.*, 2018), indicam que a tiamina e suas formas fosforiladas, além de participarem do metabolismo energético como coenzimas, podem desempenhar funções específicas no SNC. Trabalhos anteriores do nosso grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e de outros autores (MOREIRA-LOBO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2007) mostram evidências de um possível papel da tiamina e/ou seus derivados fosforilados na modulação de canais iônicos. Uma questão que levantamos é se a tiamina e/ou suas formas fosforiladas teriam, em regiões específicas do SNC, alguma função na manutenção da viabilidade celular. Essa hipótese é sustentada pelo fato dos danos induzidos pela DT serem região-específica. Essa questão está parcialmente baseada no fato de que uma disfunção de processos metabólicos energéticos, devido à falta de tiamina, iria acarretar morte celular mais generalizada e não região-específica, principalmente, considerando que os neurônios são células aeróbicas. Portanto, no presente estudo, decidimos investigar os efeitos da DT, associada ou não ao consumo de etanol, sobre parâmetros envolvidos com a morte e sobrevivência celular em três regiões que possuem susceptibilidade diferente em relação aos danos morfológicos (lesões) causados pela DT. Sabendo que o consumo de etanol é uma das principais causas de DT, decidimos incluir mais esse fator em alguns experimentos desenhados para se entender a contribuição dessas duas variáveis independentes (DT e consumo de etanol)

sobre componentes associados aos processos de manutenção ou perda da viabilidade celular. Em trabalho anterior (PEREIRA *et al.*, 1998; PIRES *et al.*, 2005), mostramos que a contribuição do consumo de etanol e DT na indução de disfunções colinérgicas cerebrais são distintas. Até o presente momento, não existem estudos abordando as consequências da DT (em três regiões cerebrais), associada ou não ao etanol, sobre os níveis de tiamina e seus derivados fosfatados e sobre componentes celulares que desempenham funções na manutenção da viabilidade celular e/ou apoptose. Com esse foco, apresentamos abaixo três questões centrais levantadas no presente estudo e que estão especificadas na seção Objetivos.

- i. Quais são os níveis de tiamina e suas formas fosforiladas em diferentes regiões do SNC, durante e após um episódio DT? Seriam diferentes após um episódio de DT sistêmico?
- ii. Como o episódio da DT, associado ou não ao consumo de etanol, afeta componentes moleculares que são importantes na viabilidade celular e/ou participam do processo de neurodegeneração?
- iii. As alterações cognitivas estariam relacionadas com os efeitos distintos da DT e/ou consumo de etanol sobre parâmetros neurobiológicos envolvidos com a morte celular?

Ao longo dos últimos quatro anos, uma série de experimentos foi executada com a finalidade de responder as questões colocadas acima e os dados obtidos foram compilados e serviram de base para o presente trabalho. Os dados aqui apresentados foram coletados em experimentos realizados no Brasil (Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular – LANECS, na Universidade Federal de Minas Gerais /

Brasil) e nos EUA (Universidade de Binghamton, Estado de Nova York) como parte do programa de Doutorado Sanduíche, contemplado pela CAPES.

As amostras biológicas foram coletadas em diferentes tempos, ou seja, durante e após períodos de recuperação dos insultos (DT e/ou Etanol), possibilitando avaliações dos efeitos dos tratamentos em diferentes momentos do processo. Foram executados 6 experimentos independentes, nos quais os dados coletados serviram para testar as hipóteses levantadas.

2. INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos Gerais

Durante o processo de plasticidade¹ neuronal acontecem dois fenômenos opostos, conhecidos como neurogênese² e neurodegeneração³, que em condições fisiológicas se encontram em um equilíbrio dinâmico. Alguns estímulos ou insultos podem levar a disfunções que culminam com morte celular demasiada, resultando em desequilíbrio, e consequente sobreposição da neurodegeneração sobre a neurogênese. O inverso também pode acontecer, pela ação de agentes neurotróficos que estimulam a neurogênese e se contrapõe à neurodegeneração. Pode também ocorrer uma disfunção no processo de neurogênese e a neurodegeneração se sobrepor. A ocorrência de um desequilíbrio em sistemas moleculares envolvidos nesses processos, por exemplo, com predominância da perda de neurônios e/ou diminuição da neurogênese, desloca o equilíbrio e acarreta danos que caracterizam uma série de doenças conhecidas como doenças neurodegenerativas. Tal fato pode ocasionar perda celular em regiões importantes do Sistema Nervoso Central (SNC), levando a déficits em processos cognitivos. A morte neuronal é a principal característica patológica da neurodegeneração em condições como, doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson, doença de Huntington e Síndrome de Wernicke-Korsakoff (WKS: *Wernicke-Korsakoff Syndrome*). Todas apresentando causas diversas, mas com elementos comuns, cada vez mais reconhecidos como importantes nas etapas finais e convergentes da

¹ Plasticidade (Neuroplasticidade): capacidade do sistema nervoso de modificar sua estrutura e função em decorrência de experiências - estímulos do meio ambiente. (TURRIGIANO; NELSON, 2000).

² Neurogênese: processo de formação de novos neurônios no cérebro, provenientes de células-tronco neurais. (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999)

³ Neurodegeneração: perda progressiva da estrutura ou funcionamento dos neurônios, culminando com a morte celular. (RUBINSZTEIN, 2006)

casca que culmina com a morte neuronal (por exemplo, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e agregação proteica desordenada) (LIU; KE; LUO, 2017)

Para estudar o fenômeno da neurodegeneração, no presente trabalho, utilizamos o modelo experimental da WKS ocasionada pela depleção sistêmica da tiamina (vitamina B1), associada ou não ao consumo de etanol. Existem várias evidências mostrando que o consumo crônico de etanol associado a falta de tiamina pode causar a WKS (Harper, 1983; Kril, 1995; Pittella e Giannetti, 1994). Tanto a deficiência de tiamina (DT), como o consumo de etanol causam perdas neuronais em região específicas do SNC e déficit em processos de aprendizado e memória, observados tanto em humanos, como em roedores (BUENO, K.O. *et al.*, 2015; DI MARCO *et al.*, 2018; RESENDE, 2012; SAVAGE, LISA M. *et al.*, 1997; SAVAGE, LISA M.; HALL; RESENDE, 2012; SECHI; SERRA, 2007; SENA, 2019).

Um dado interessante, a ser destacado, é que no caso do envelhecimento e da Doença de Alzheimer, da mesma forma que a DT e/ou consumo crônico de etanol, foram observados déficits nos processos de aprendizagem e memória espacial (BRANDEIS; BRANDYS; YEHUDA, 1989; D'HOOGHE; DE DEYN, 2001; HORT *et al.*, 2007).

Dados obtidos em estudo anterior, realizado pelo nosso grupo (PIRES *et al.*, 2001, 2005), sugerem que o sistema colinérgico parece responder de forma diferente à DT e ao consumo crônico de etanol. A associação desses dois tratamentos induz um efeito maior na liberação estimulada do neurotransmissor acetilcolina (ACh) do que o causado por cada um deles separadamente. Dados do nosso grupo também sugerem que o efeito do consumo crônico de etanol e da DT sobre aspectos comportamentais não é

sinérgica. Mostramos que nos estágios iniciais da disfunção cerebral por DT, antes do desenvolvimento de lesões estruturais cerebrais, o consumo crônico de etanol pode modificar as disfunções bioquímicas induzidas pela deficiência. Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos responsáveis pelos efeitos, no SNC, da DT e do consumo de etanol, muitos pontos continuam obscuros, como por exemplo, a contribuição desses insultos na indução da morte celular em regiões cerebrais.

Alguns dos mecanismos que levam à morte celular, como apoptose e necrose, entendidos como independentes, possuem características em comum e podem coparticipar em muitas condições de saúde ou de doença (KRISTIANSEN; HAM, 2014; LA ROVERE *et al.*, 2016). O processo de morte celular é regulado e a compreensão de cada uma das vias e interfases dos sistemas moleculares que fazem parte deste processo é fundamental para o desenvolvimento de estratégias racionais de intervenção, no caso das doenças neurodegenerativas ou do próprio envelhecimento fisiológico. Ou seja, conhecer os mecanismos de ativação e regulação dos processos que culminam com a morte celular poderá contribuir para o desenvolvimento de tratamentos de indivíduos portadores de doenças neurodegenerativas, câncer, doenças autoimunes e doenças hepáticas, nas quais a morte de célula representa um evento comum (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; NIJHAWAN; HONARPOUR; WANG, 2000; SAIKUMAR *et al.*, 1999; SOLÁ, S *et al.*, 2001).

Neurodegeneração

Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são processos que levam a destruição progressiva e, em alguns casos, irreversível de células do SNC. Dependendo do tipo de

doença, podem acontecer de maneira gradativa, com o paciente perdendo suas funções motoras e cognitivas. Como citado anteriormente, temos como exemplos a doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer e a síndrome WKS. A seguir relatamos breves informações sobre algumas delas.

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva que representa a sexta causa principal de morte e a causa mais comum de demência em todo o mundo. Ao longo das últimas décadas, avanços significativos foram feitos no entendimento da DA, por meio da investigação dos mecanismos moleculares subjacentes à componentes como, peptídeo β -amilóide, proteína *tau*, parâmetros colinérgicos e glutamatérgicos entre outros, com focos no metabolismo e aspectos genéticos. Apesar dos progressos, não existem ainda tratamentos modificadores da doença e capazes de interromper os processos neurodegenerativos (morte celular) responsáveis pelos sintomas devastadores, cognitivos e comportamentais, da doença. Esta perspectiva centra-se no valor de modelos e instrumentos que possibilitam o estudo das vias e componentes responsáveis pela viabilidade neuronal e desencadeamento de processos que levam à morte celular descontrolada (DE PAULA; GUIMARÃES; FORLENZA, 2009; NASERI *et al.*, 2019; PICKETT *et al.*, 2019). A DT representa um desses modelos úteis para o estudo desses processos vinculados à neurodegeneração (Liu, *et al.*, 2017). Várias semelhanças existem entre a DT e a DA, principalmente em detrimento da redução do metabolismo da glicose no cérebro (GIBSON *et al.*, 2016).

A síndrome de WKS é acarretada pela deficiência grave de tiamina induzida pelo consumo de álcool (ARUMUGAN, 2019), desnutrição e hiperêmese gravídica (BAKER *et al.*, 1999; HAZELL; BUTTERWORTH; HAKIM, 1993) e fatores genéticos relacionados ao metabolismo da tiamina (DHIR *et al.*, 2019) e em doenças gastrintestinais (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009). A DT pode resultar em uma

doença conhecida como Encefalopatia de Wernicke (EW), cujos principais sintomas são: oftalmoplegia, ataxia, perda de memória, confusão mental (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009) e hipoatividade da marcha e da postura (ZUBARAN, C; FERNANDES; RODNIGHT, 1997). A EW, se não tratada, leva a uma condição mais grave que é a Síndrome de Wernicke-Korsakoff, caracterizada pelo surgimento de déficits cognitivos, neurológicos e comportamentais, frequentemente encontrados em pacientes com diagnóstico de alcoolismo crônico (HARPER, 1998; HAZELL; BUTTERWORTH, 2009) e também em modelos experimentais (CICCIA; LANGLAIS, 2000). A WKS é caracterizada por graves problemas cognitivos, tais como déficits na memória explícita e funções executivas (KASSE *et al.*, 2019).

As características compartilhadas entre a DT e doenças neurodegenerativas primárias constituem uma plataforma única na pesquisa sobre doenças neurodegenerativas (GIBSON *et al.*, 2016). Por possuírem etapas moleculares similares, relacionadas ao processo de morte neuronal, o uso do modelo da DT como instrumento na pesquisa básica se torna uma vantagem, uma vez que o pesquisador conhece a causa primária da neurodegeneração e, portanto, tem mais controle da variável independente.

Mecanismos de Morte celular

O processo de morte celular regulada (RCD: *Regular Cell Death*) está envolvido em dois cenários diametralmente opostos. Por um lado, o RCD pode ocorrer na ausência de qualquer perturbação ambiental exógena, operando, portanto, como um efeito incorporado de programas fisiológicos lógicos de desenvolvimento ou "turnover"/

renovação de tecidos. Estas formas completamente fisiológicas de RCD são geralmente referidas como morte celular programada (PCD: *Programmed Cell Death*).

Por outro lado, a RCD pode ter origem em perturbações do microambiente intracelular ou extracelular, quando tais perturbações são demasiado intensas ou prolongadas que as respostas adaptativas não conseguem “tamponar” com o estresse celular induzidos por elas e restaurar a homeostase. No entanto, enquanto as respostas adaptativas (AR: *Adaptative Response*) ao estresse operam a nível celular (que por extensão promove a manutenção da homeostase ao nível do organismo ou da colônia), a RCD opera diretamente ao nível do organismo ou da colônia, apesar da homeostase celular. Essa função homeostática não apenas reflete a eliminação de células inúteis ou potencialmente perigosas, mas também a capacidade das células moribundas de expor ou liberar moléculas que alertam o organismo ou colônia sobre uma ameaça potencial. Tais sinais de perigo comumente chamados de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou alarminas. Um fato interessante é que existem evidências que essas moléculas possuem um papel importante no caso de injúrias no SNC. Por exemplo, a lesão cerebral precoce resultante de isquemia global transitória pode liberar moléculas que podem ser críticas para iniciar e manter a resposta inflamatória (CHAUDHRY *et al.*, 2018; WILKINS *et al.*, 2017). No SNC, as DAMPs, como citocromo C (CytC), fator de transcrição mitocondrial A (TFAM: *mitochondrial transcription factor*) e cardiolipina, tem sido estudadas como componentes importantes nos distúrbios cerebrais, como nas doenças neurodegenerativas, p.ex. D. de Parkinson e D. de Alzheimer (BAJWA; POINTER; KLEGERIS, 2019).

A morte celular manifesta-se com alterações morfológicas macroscópicas. Os mecanismos pelos quais células mortas e seus fragmentos são descartados têm sido historicamente empregados para classificar a morte celular em três formas diferentes:

(1) morte celular tipo I ou apoptose, exibindo encolhimento citoplasmático, condensação de cromatina (piognose), fragmentação nuclear (cariorexia), “bolhas” na membrana plasmática, culminando com a formação de pequenas vesículas aparentemente intactas (comumente conhecidas como corpos apoptóticos) que são eficientemente absorvidas por células com atividade fagocitária e degradadas dentro de lisossomos; **(2) morte ou autofagia celular tipo II**, manifestando-se com vacuolização citoplasmática extensa e culminando, de forma semelhante ao tipo I, com captação fagocitária e consequente degradação lisossômica; e **(3) morte ou necrose celular tipo III**, não apresentando características distintas de morte celular tipo I ou II, mas terminando com a eliminação de cadáveres celulares na ausência de envolvimento fagocitário e lisossômico. Esta classificação morfológica ainda é amplamente empregada, independentemente de múltiplas limitações, e ressalvas. Apesar de serem considerados mecanismos independentes, esses podem coparticipar na morte celular que acontece tanto no estado fisiológico como patológico (GALLUZZI, L. *et al.*, 2012; GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018).

Com o propósito de criar uma classificação adequada dos diferentes tipos de morte celular, em 2005 foi criado um comitê de nomenclatura de morte celular (NCCD: *Nomenclature Committee on Cell Death*). Em 2009, apoptose, necrose e catástrofe mitótica foram os termos utilizados pelo NCCD para classificar a morte das células, sendo essa classificação feita a partir das características morfológicas das alterações. No ano de 2012, foi disponibilizada uma classificação baseada nas características bioquímicas dos eventos, e novos termos foram incluídos, como apoptose extrínseca, apoptose intrínseca caspase-dependente, apoptose intrínseca caspase-independente, necrose regulamentada, morte celular autofágica e catástrofe mitótica. Além disto, foram adicionados outros tipos, tais como anoikis, entosis, partanatos, piroptosis,

NETosis e cornificação (GALLUZZI, L. *et al.*, 2012). Como o campo continuou a se expandir e novos mecanismos, com múltiplas vias, de morte celular estão sendo evidenciados, em 2018 o Comitê de Nomenclatura (NCCD) propôs uma nova classificação de tipos de morte celular, distinguindo aspectos essenciais (causais) dos aspectos acessórios (correlativos) do processo de morte celular. O foco principal tem sido colocado nos módulos de tradução de sinal envolvidos na iniciação, execução e propagação da morte celular, bem como na relevância fisiopatológica de cada um dos principais tipos de morte celular regulada (RCD: *Regulated Cell Death*). As definições dos termos (doze ao todo) estão apresentadas abaixo, para os tipos de morte celular que estão apresentados na **Figura 1** e são: apoptose intrínseca, apoptose extrínseca, necrose-transição de permeabilidade mitocondrial (MPT: *mitochondrial permeability transition*), necroptose, ferroptose, piroptose, partanatos, entótica, NETótica, lisossômica, autofágica e, imunogênica. A seguir apresentamos detalhes sobre algumas dessas categorias de morte celular e para uma revisão das demais, não mencionadas aqui, sugerimos consultar (GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018).

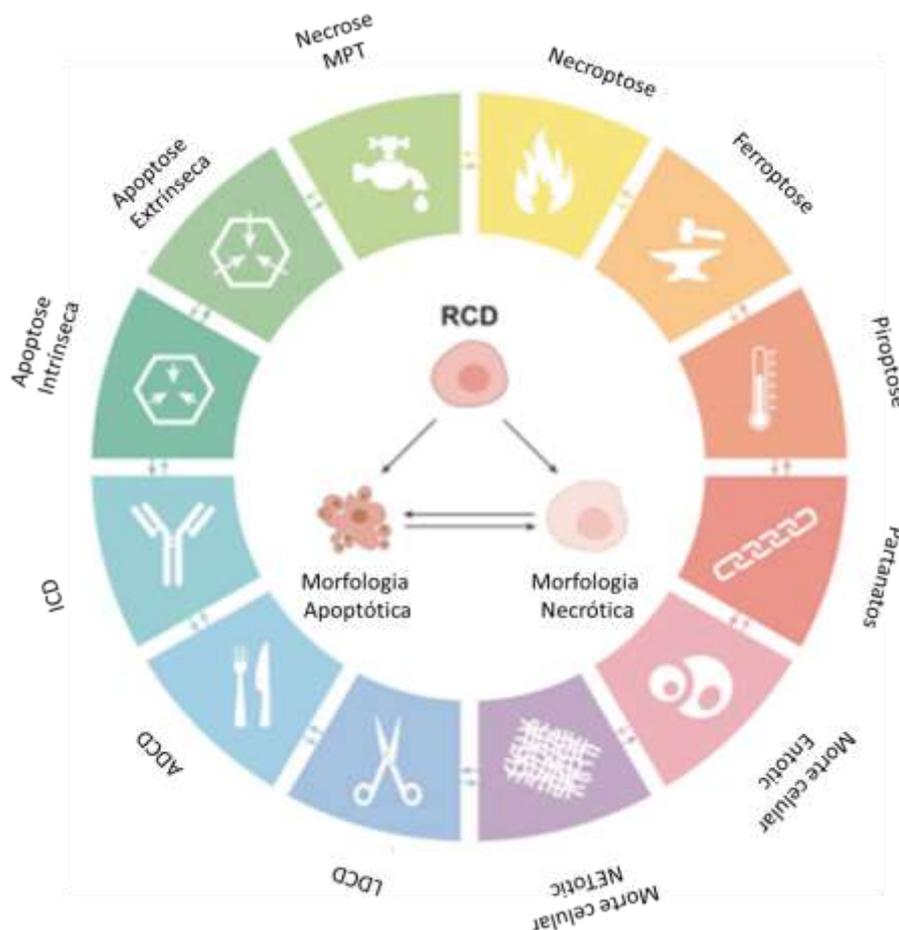


Figura 1: Esquema mostrando os tipos de morte celular

Figura modificada, extraída de GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018. Critérios adotados para divisão em 14 definições ou tipos de morte celular foram os processos de tradução de sinal, envolvidos na iniciação, execução e propagação da morte celular, bem como critérios fisiopatológicos de cada um. Morte celular dependente de autofagia (ADCD: *autophagy-dependent cell death*), Morte celular imunogênica (ICD: *immunogenic cell death*), Morte celular dependente de lisossomo (LDCD: *lysosome-dependent cell death*), Permeabilidade mitocondrial transitória (MPT: *mitochondrial permeability transition*).

Lista de definições

Definições dos termos: RCD: *Regulated Cell Death*

1. **Apoptose intrínseca:** Tipo de RCD iniciada por perturbações do microambiente extracelular ou intracelular, demarcado pela *mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP), e precipitado por caspases executoras, principalmente CASP3, sem envolvimento de receptores da membrana plasmática.
2. **Apoptose extrínseca:** Variante específica do RCD iniciada por perturbações do microambiente extracelular detectadas por receptores de membrana plasmática,

- propagadas pela CASP8 e precipitadas por caspases executoras, principalmente a CASP3.
3. **Autofágica (ADCD: *autophagy-dependent cell death*):** Uma forma de RCD que depende mecanicamente da maquinaria (ou seus componentes) do processo autofágico.
 4. **Entótica:** Um tipo de RCD que se origina da internalização celular dependente de actomiosina (entose) e é executada por lisossomas.
 5. **Ferroptose:** É uma forma de RCD iniciada por transtornos específicos do microambiente intracelular, como a peroxidação lipídica grave, que depende da geração de ROS e da disponibilidade de ferro. Mecanismo pelo qual as células mortas e seus fragmentos são absorvidos por fagócitos e eliminados.
 6. **Imunogênica (ICD: *immunogenic cell death*):** Uma forma de RCD que é suficiente para ativar uma resposta imune adaptável em hospedeiros imunocompetentes.
 7. **Lisossômica (LDCD: *lysosome-dependent cell death*):** Um tipo de RCD demarcada por permeabilização primária da membrana lisossômica (LMP: *lysosomal membrane permeabilization*) e precipitada por catepsinas, com envolvimento opcional de MOMP e caspases.
 8. **Necroptose:** Uma modalidade de RCD desencadeada por perturbações da homeostase extracelular ou intracelular que depende criticamente do domínio de linhagem mista de kinases como pseudocinase (MLKL: *mixed lineage kinase domain like pseudokinase*), e de receptores com interação serina/treonina cinase 3 (RIPK3: *receptor interacting serine/threonine kinase 3*) e (pelo menos em algumas configurações) da atividade cinase do RIPK1: *receptor interacting serine/threonine kinase 1*.
 9. **Necrose- transição de permeabilidade mitocondrial (MPT: *mitochondrial permeability transition- driven necrosis*):** Forma específica de RCD desencadeada por perturbações do microambiente intracelular e dependência da *cyclophilin D* (CYPD).
 10. **NETótica:** Uma modalidade de RCD dependente de ROS e restrita a células de derivação hematopoiética e associada à extrusão NET.
 11. **Partanatos:** Uma modalidade de RCD iniciada pela hiperativação da PARP1 e precipitada por uma consequente catástrofe bioenergética associada à degradação do DNA dependente do *Apoptose Inducing fator* (AIF) da mitocôndria e dependente de MIF.
 12. **Piroptose:** Um tipo de RCD que depende criticamente da formação de poros da membrana plasmática pelos membros da família da proteína gasdermina, muitas vezes (mas nem sempre) como consequência da ativação da caspase por um processo inflamatório.

Apoptose

A apoptose se refere à um tipo de morte celular programada, regulada por genes. Quando ocorre a apoptose, uma célula sofre retração, aumento da densidade, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos (por meio da invaginação da membrana celular). As células apoptóticas retêm a integridade da membrana plasmática e a atividade metabólica (em algum grau) à medida que o processo avança para a sua conclusão, o que permite a rápida eliminação por

macrófagos ou outras células com atividade fagocitária (um processo conhecido como eferocitose) (GREEN; OGUIN; MARTINEZ, 2016). A apoptose e consequente eferocitose nem sempre são imunologicamente silenciosas, como pensado anteriormente. A apoptose *in vitro*, em estágio final, é geralmente seguida da quebra completa da membrana plasmática e da aquisição de um morfótipo necrótico (necrose secundária) (BERGHE *et al.*, 2010).

Na maioria dos casos, a apoptose pode ser desencadeada de duas formas: i) estimulação intrínseca por meio da via de sinalização mitocondrial; ou ii) estimulação extrínseca por meio da ativação de dois tipos de receptores, *Death Receptors* (DR)s presentes na superfície celular, incluindo receptores TNF α : *Tumor Necrose Factor*, ou ativação de receptores de dependência, que possuem como ligante alguns tipos de neurotrofinas (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; SAIKUMAR *et al.*, 1999). Tanto a apoptose intrínseca como na extrínseca, a ativação de cisteína-aspartato-proteases (caspases) é necessária e estas vias são conhecidas como dependentes de caspases, conforme classificação de 2012, pelo NCCD. Entretanto, evidências mostram que a apoptose pode ocorrer mesmo após a inibição das caspases, evidenciando-se a existência de outros mecanismos de apoptose, conforme considerado na classificação de 2018 (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; GULLIZZI *et al.* 2018).

A apoptose pode ser ativada por proteínas caspases (EC 3.4.22), entre essas as dependentes de cálcio, denominadas calpaínas (E.C. 3.4.22.52), pertencentes à família das cisteínas proteases por possuírem uma cisteína no sítio ativo e clivam substratos proteicos em ligações peptídicas contendo ácido aspártico. Na cascata de ativação de algumas caspases estão envolvidas modificações celulares, como aquelas relacionadas às disfunções mitocondriais e/ou por meio de receptores iniciadores apoptótico, da

família de receptores TNF. Essas modificações celulares via mitocôndria ou receptores plasmáticos, que levam à morte celular, serão abordadas a seguir e estão relacionadas às vias intrínseca e extrínseca, respectivamente.

Apoptose Intrínseca

A ***apoptose intrínseca*** é uma forma de morte celular regulada, iniciada por uma variedade de perturbações microambientais, incluindo (mas não se limitando a) remoção do fator de crescimento, dano ao DNA, estresse do retículo endoplasmático (RE), sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse de replicação, alterações nos microtúbulos ou defeitos mitóticos (GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018).

O passo crítico para a apoptose intrínseca é a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP: *mitochondrial outer membrane permeabilization*) (TAIT; GREEN, 2010), que é controlada por componentes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família proteica BCL2, reguladora da apoptose (BCL2: *B-Cell Lymphoma Protein 2, Apoptosis Regulator*), um grupo de proteínas que compartilham um a quatro domínios da homologia BCL2 (ou seja, BH1, BH2, BH3 e BH4) (CZABOTAR *et al.*, 2014). Os componentes pró-apoptóticos da família de proteínas BCL2, BAK e BAX (que contêm domínios BH) são ativados via transcrição ou pós-tradução, quando organelas específicas ou compartimentos celulares sofrem perturbações da homeostase, operando de fato como transdutores celulares de sinalização de estresse (VILLUNGER *et al.*, 2003).

BAX e BAK são os únicos membros da família BCL2 que até o momento sabe-se atuarem em células de mamíferos por sua capacidade de formar poros através da

membrana mitocondrial externa (OMM: *outer mitochondrial membrane*) e, possivelmente, outras membranas intracelulares. Em condições fisiológicas, o BAX cicla continuamente entre a OMM e o citosol. Em contraste, o BAK reside constitutivamente na OMM, onde se insere dentro da camada lipídica através do seu terminal C hidrofóbico com interação com o canal aniônico dependente de voltagem 2 (VDAC2: *voltage dependent anion channel 2*). Após a indução da apoptose, a retrotranslocação do BAX cessa à medida que os reservatórios mitocondriais do BAX e BAK passam por ativação direta ou indireta por proteínas BH3 pró-apoptóticas (TODT *et al.*, 2015). Estes membros pró-apoptóticos da família proteica BCL2 (que contêm um único domínio BH3) são ativados na transcrição ou pós-tradução quando organelas específicas ou compartimentos celulares experimentam perturbações da homeostase, operando de fato como transdutores celulares de sinalização de estresse (GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018). A visão atual é que BAX e BAK ativados formam homodímeros ou heterodímeros, resultando na liberação de proteínas-BH3 e oligomerização por dímero. A oligomerização acaba levando à montagem de um poro lipídico que altera a permeabilidade mitocondrial e causa rearranjos profundos da ultraestrutura mitocondrial (DEWSON; KLUCK, 2009; SHAMAS-DIN *et al.*, 2011).

A permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MOMP) promove a liberação citosólica de fatores apoptogênicos que normalmente residem no espaço intermembrana mitocondrial (TAIT; GREEN, 2010). Estas proteínas mitocondriais incluem (mas não estão limitadas a) citocromo C somático (CYCS), que opera na cadeia respiratória mitocondrial, proteínas mitocondriais ativadoras de caspases (SMAC/DIABLO: conhecida como “segundo ativador mitocondrial de caspases”, SMAC: *second mitochondrial activators of caspases*), fator indutor de apoptose (AIF: *apoptose inducer factor*), endonuclease G e proteína A2 de alta temperatura. A liberação

de CYCS e SMAC para o citosol é favorecida pela remodelação da crista mitocondrial, que se baseia na oligomerização e ativação da OPA1 mitocondrial, como a dinamina-GTPase (OPA1) (FREZZA *et al.*, 2006), que são GTPases responsáveis pela reciclagem de vesículas sinápticas. Esses processos causam um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativando um mecanismo de amplificação dos sinais apoptóticos (GALLUZZI, L. *et al.*, 2012).

O *pool* citosólico de CYCS liga-se ao fator 1 ativador de peptidase apoptótica (APAF1: *apoptotic peptidase activating factor 1*) e à pro-caspase 9 (ProC9), de forma dependente de ATP, para constituir o complexo supramolecular conhecido como apoptossoma, responsável pela ativação da CASP9 (FERRARO *et al.*, 2010; LI, PENG *et al.*, 1997; RIEDL; SALVESEN, 2007). Esta ativação ocorre por meio da ligação da ProC9 ao domínio de recrutamento de caspase (CARD: *caspase recruitment domain*) da proteína APAF-1 e, uma vez na sua forma ativa (CASP9), deve permanecer ligado ao apoptossoma para manter uma atividade catalítica substancial. Em seguida, o iniciador CASP9 cliva e ativa caspases da fase de execução da apoptose, como Caspase-3 (CASP3) e Caspase-7 (CASP7), por meio de proteólise que rearranja *loops* proteicos críticos na formação de sítios ativos (CAVALCANTE *et al.*, 2019). Quando ativadas, as caspases de execução podem clivar e ativar outras caspases de execução em um sistema de *feedback* durante essa fase (amplificação da execução da apoptose). A CASP3 favorece a fragmentação do DNA ao catalisar a inativação proteolítica da subunidade alfa do fator de fragmentação de DNA. CASP3 e CASP7 facilitam, sem serem indispensáveis, a RCD (KUIDA, 2000; LI, PING *et al.*, 2017; ZHIVOTOVSKY *et al.*, 1999). A cinase, Akt, proteína cinase B (PKB), uma serina/treonina cinase específica desempenha um papel na fosforilação de várias proteínas celulares. Estudos tem mostrado que esta proteína possui ação no Apaf-1 inibindo o processo apoptótico

(ZHOU et al., 2000).

Outro fator que vem sendo cada vez mais estudado é o “Fator Indutor de Apoptose”-AIF, mencionado acima, o qual “reconhece” os estímulos apoptóticos e induz condensação da cromatina e produção de fragmentos de DNA, por meio da migração da mitocôndria para o núcleo. Esse fator age de forma independente da ativação das caspases (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

Por outro lado, também existem membros da família de proteínas BCL2 que atuam como anti-apoptóticos, diminuindo a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (MOMP: *mitochondrial outer membrane permeabilization*). Estas proteínas anti-apoptóticas, como as pró-apoptóticas, também contêm os quatro domínios BH e são geralmente inseridas na membrana externa da mitocôndria ou na membrana do RE. Os membros anti-apoptóticos da família BCL2 promovem a sobrevivência celular por: (1) regulação da homeostase Ca^{2+} no RE (MONACO *et al.*, 2015; RONG; DISTELHORST, 2008); (2) promoção do metabolismo bioenergético na interação com a F_1F_0 -ATP sintase (ALAVIAN *et al.*, 2012); e (3) contribuição para a regulação da homeostase – redox (VELAITHAN *et al.*, 2011). A maioria dos membros da família BCL2 pró-sobrevivência inibem BAX e BAK, impedindo sua oligomerização e atividade de formação de poros, seja diretamente, após o sequestro físico na OMM, ou indiretamente, após o sequestro de ativadores proteicos-BH3.

Em resumo, um grande conjunto de evidências sugere que as caspases precipitam apoptose intrínseca, uma vez que um ponto limite irreversível (até então mal definido) for atingido, mas elas não são essenciais, pois, o bloqueio da ativação pós-mitocondrial das caspases por meios genéticos ou com inibidores farmacológicos específicos, geralmente retarda (mas não impede) a apoptose intrínseca *in vitro* e *in vivo*

(pelo menos no sistema de mamíferos), uma vez que as células podem mudar os para outros tipos de RCD.

O NCCD propõe definir a apoptose intrínseca como uma forma de RCD iniciada por perturbações do microambiente intracelular ou extracelular, demarcada pelo MOMP e precipitada por caspases executoras de apoptose, principalmente CASP3 (**Figura 2**).

Apoptose Extrínseca

A via extrínseca envolve a ativação de dois tipos de receptores presentes na membrana plasmática celular, conhecidos como (i) **receptores de morte celular** ou receptores de sinalização de apoptose e, representados por dois grupos (**Figura 2**) (ii) **receptores de dependência (*Dependence Receptors*)**, (**Figura 3**) cuja ativação ocorre quando os níveis de seu ligante específico caem abaixo de um limiar específico (GALLUZZI *et al.*, 2018). A seguir descrevemos algumas informações sobre mecanismos funcionais dessas duas subclasses de receptores, de acordo com dados obtidos por vários autores e apresentados na revisão realizada por GALLUZZI *et al.*, 2018.

(i) Os receptores de morte celular incluem (mas não estão limitados a): Receptor de morte de superfície de células Fas (FAS: Fas cell surface death receptor); também conhecido como CD95 ou APO- 1, e receptor TNF, membro da superfamília 1A (TNFRSF1A; mais conhecido como TNFR1), 10A (TNFRSF10A; mais conhecido como TRAILR1 ou DR4), e 10B (TNFRSF10B; mais conhecido como TRAILR2 ou DR5).

A ativação dos receptores da morte desencadeiam ativação da caspases-8, que por sua vez ativa a caspase-3/7 culminando na apoptose (FUCHSLOCHER CHICO; SAGGAU; ADAM, 2017; LINKERMANN; GREEN, 2014; NAGATA; TANAKA, 2017; OBERST, 2016). Como regra geral, a ligação e ativação de receptores de morte induz a formação de um complexo dinâmico de multiproteína na extremidade intracelular do receptor, denominado "complexo de sinalização indutor de morte" (DISC: *death-inducing signaling complex*), "complexo I" e "complexo II", que operam como plataformas moleculares para regular a ativação e as funções da CASP8 (ou CASP10, em um número limitado de situações). O gene *CASP8* codifica a CASP8 que é sintetizada como um zimógeno e é a primeira caspase ativada na via extrínseca, o que ocorre após a formação do complexo DISC (STRASSER; JOST; NAGATA, 2009).

De acordo com o comitê (NCCD), a apoptose extrínseca representa um tipo de RCD iniciado por perturbações do microambiente extracelular que são detectadas por receptores da membrana plasmática, propagadas pela CASP8 (com o envolvimento opcional da MOMP), e precipitadas por caspases executoras da apoptose, principalmente CASP3.

Os mecanismos moleculares que regulam a atividade da CASP8, após a estimulação do receptor da morte, têm sido extensivamente investigados. Em particular, a maturação e ativação da CASP8 envolve uma cascata de eventos iniciada pela ligação do proCASP8 ao FAS, via domínio da morte (FADD: *Fas associated via death domain*) no DISC. Esta interação permite a montagem de um filamento linear das moléculas de CASP8 (dependendo do seu DED: *death effector domain*) que facilita a homodimerização e a consequente ativação por clivagem autoproteolítica.

Um papel fundamental neste cenário é mediado pelo c-FLIP, que é um composto da família da CASP8, que funciona como um regulador da CASP8. Evidências indicam que as variantes curtas do c-FLIP (c-FLIPS: *small*) e longa (c-FLIPL:*long*) inibem e ativam a CASP8, respectivamente, modulando a oligomerização da CASP8. A CASP8 ativada cliva c-FLIPL e os complexos heterodiméricos da CASP8 com c-FLIPL (mas não c-FLIPS) são dotados de atividade enzimática limitada, que favorece a oligomerização da CASP8 e sua conseqüente ativação. As isoformas c-FLIPL e CASP8 parecem ser recrutadas na "plataforma" DISC em níveis comparáveis, apoiando a noção de que níveis elevados de expressão de c-FLIPL inibem, ao invés de ativar, a apoptose extrínseca (CHANG *et al.*, 2002; GILOT *et al.*, 2005) possivelmente, por interromper a maturação do CASP8 (**Figura 2**).

O *CFLAR* (o gene codificador c-FLIP) está sob controle transcripcional direto por NFκB, o que contribui em grande parte para a sinalização do TNFR1 pro-sobrevivência. A atividade enzimática da CASP8 parece ser controlada por mecanismos pós-traducionais adicionais, incluindo (mas não limitado a): (1) fosforilação em Y380, que inibe a atividade autoproteolítica da CASP8 na ativação da SAF, (2) fosforilação em T273, que é catalisada pela cinase 3 (PLK3) no DISC e promove as funções apoptóticas da CASP8, e (3) des-ubiquitinação, que diminui a atividade do CASP8 e interrompe a apoptose extrínseca.

A sinalização do receptor de morte também pode levar à ativação de NFκB, geralmente resultando na sobrevivência celular associada a uma resposta inflamatória robusta. A capacidade de alguns receptores de morte incluindo TNFR1 de promover a ativação da NFκB sobre a ativação do CASP8 parece depender do grau de oligomerização do receptor (ou seja, trimerização vs. multimerização de ordem superior), das funções de "âncora" (ou seja, não enzimáticas) da CASP8, e a

consequente montagem de complexos do tipo TNFR1 contendo RIPK1 e LUBAC. A proteína TNF alfa-induzida 3 (TNFAIP3; mais conhecida como A20) inibe a ativação da CASP8 devido à sua capacidade de poliubiquinar a RIPK1. Um estudo recente sugere que a capacidade do TRAILR2 de enviar sinais pró-sobrevivência ao invés de pró-apoptóticos pode depender de sua localização preferencial fora das “jangadas” lipídicas = *Rafts* .

Outra análise sobre os efeitos sobre NFκB seria a ação da enzima akt, uma cinase que modularia a liberação do fator neurotrófico. O equilíbrio entre a vida e a morte pode depender de vias que expressam este fator. A ação é dependente do tipo celular, já que nos neurônios a falta ou redução de NFκB precede a apoptose pela diminuição da transcrição de genes antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-X L e Bfl-1 / A1) (CHIARUGI, 2002; PIZZI & SPANO, 2006), enquanto que nas células da glia há indução da produção de neurotoxinas que levam ao processo inflamatório (KEMPURAJ et al., 2016; SHABAB et al., 2016). Independentemente da via de ativação, há um consenso de que sua liberação e consequente ativação dependem da proteína IκB que quando fosforilada é degradada liberando o NFκB seqüestrado (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016; KARIN, 1999).

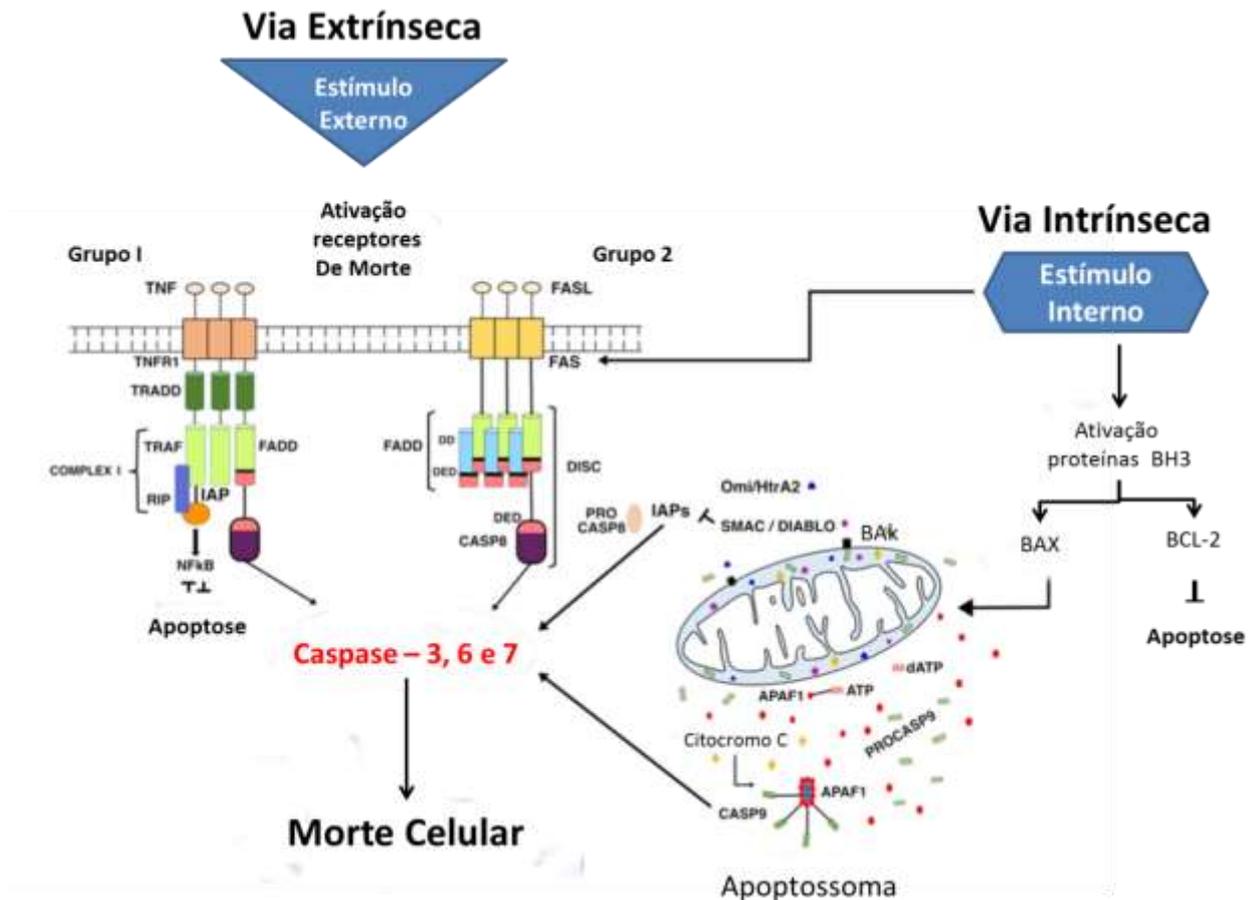


Figura 2: Via extrínseca e intrínseca da apoptose

A **via extrínseca** do processo de apoptose inicia pela ativação de receptores de morte (grupo 1 ou grupo 2), com consequente ativação da Casp8, seguida da ativação da Casp3, ou através de mecanismo indireto envolvendo a mitocôndria (não mostrado na figura). A **via intrínseca** ou clássica se inicia, por alterações intracelulares induzidas no meio extra ou intra celular, sem ativação de receptores de membrana, mas com ativação de proteínas BH3, que formam canais na membrana externa mitocondrial, resultando na liberação de CytC, formação de apoptossoma (+ Casp9) e ativação da Casp3. Nas duas vias (Extrínseca e Intrínseca) a ativação da Casp3, leva a morte celular. Para mais detalhes da figura, vide item Apoptose

Evidências de estudos sobre mecanismos associados a receptores de morte, mostraram que c-Jun N-terminal cinase - JNK (*MAPK8*) uma cinase que liga e fosforila em Ser-63 e Ser-73, é ativada pelo TNF- α causando a ativação da caspase-8 por meio da liberação seletiva do fator apoptótico Smac/Diablo (Segundo ativador mitocondrial de caspase / inibidor direto da proteína de ligação à apoptose com baixo pI) (PAPA et al., 2004b).

(ii) Os "receptores de dependência" (*Dependence Receptors*) foram descritos pela primeira vez em 1993. Desempenham papéis fundamentais em processos distintos, como o desenvolvimento, a oncogênese e a neurodegeneração. A família de "receptores de dependência" é composta por aproximadamente 20 membros, incluindo: (1) os receptores netrina 1 (NTN1), receptor netrina 1 DCC (DCC: *deleted in colorectal cancer*), receptor netrina A unc-5 (UNC5A), UNC5B, UNC5C e UNC5D; (2) o receptor neurotrófico - tirosina cinase 3 (NTRK3); e (3) o receptor "*sonic hedgehog*" (SHH).

A visão clássica dos receptores transmembrana é que eles são ativados quando se ligam aos seus respectivos ligantes, mas são relativamente inativos quando não estão ligados. Diferentemente, os "receptores de dependência" medeiam apoptose na ausência de seus ligantes, mas quando a concentração dos ligantes aumenta e esses se ligam e ativam esses receptores, a consequência é a manutenção da homeostase e sobrevivência da célula (**Figura 3**) (GOLDSCHNEIDER; MEHLEN, 2010).

Crescentes evidências suportam a visão de que os "receptores de dependência" também desempenham papéis cruciais no processo de neurodegeneração. Dados sobre o papel do receptor p75NTR no sistema nervoso central indicam que ratos *knockout* para p75NTR apresentaram aumento de marcadores colinérgicos no cérebro basal, bem como hipertrofia celular, aumento do número de fibras colinérgicas e aumento da potenciação a longo prazo (LTP: *long-term potentiation*) no hipocampo. Estes resultados sugerem que a ativação do p75NTR inibe a função colinérgica septohipocampal. Além disso, os ratos que expressam a proteína precursora da β -amilóide (APP: *amyloid precursor protein*) mutante sueca são um modelo para a doença de Alzheimer, e aqueles *knockout* para p75NTR apresentaram um melhor desempenho em testes de memória do que aqueles que eram do tipo selvagem para p75NTR.

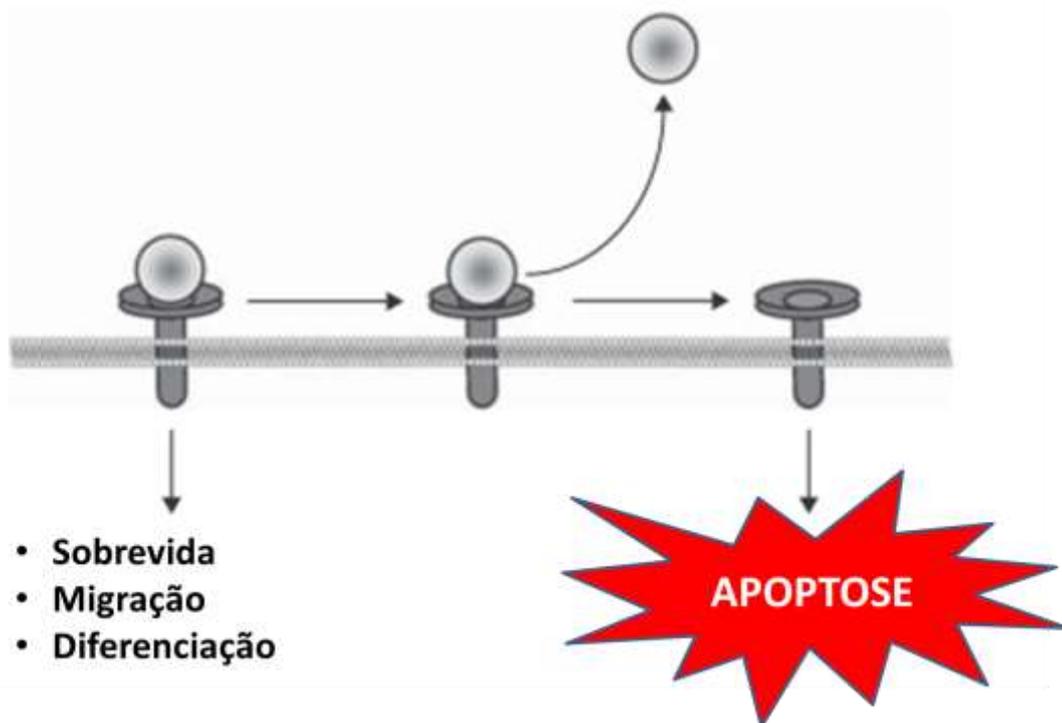


Figura 3: Modelo de funcionamento de Receptores de Dependência (Dependence Receptors)

Figura modificada, extraída de GOLDSCHNEIDER; MEHLEN, (2010). Os receptores de dependência possuem um estado ativo que traduz um sinal positivo de diferenciação, migração ou sobrevivência, quando ligado ao agonista, ao passo que a ausência do ligante induz a apoptose.

Trabalhos colaborativos entre os laboratórios de Bredesen e Mehlen mostraram que a APP é um “receptor de dependência”(LOURENÇO *et al.*, 2009), com um ligante trófico (netrina-1) e um único sítio de clivagem caspase (Asp664) necessário para indução de apoptose; a clivagem caspase gera os peptídeos proapoptóticos Jcasp e C31. Além disso, o peptídeo amilóide β também se liga à APP, sendo um "ligante antitrófico" que compete com a netrina-1 pela interação com o APP, assim como compete com outros ligantes tróficos por seus respectivos receptores. Este efeito identifica o peptídeo amilóide β como a primeira "antitrofina" e sugere que seu acúmulo

pode desencadear um estado pró-morte específico, um estado antitrófico-resultando na perda sináptica, retração neurítica e morte neuronal, que caracteriza a doença de Alzheimer.

Os “receptores de dependência” partilham a propriedade de serem amplificadores da atividade de caspase. A maioria deles não induz apoptose na presença de inibidores de caspases (Mehlen e Thibert, 2004). Todos os “receptores de dependência” contêm, na sua parte intracelular, um domínio necessário para a indução da apoptose. Este domínio, o ADD (*addiction/dependence domain*) (Bredesen et al., 1998), é necessário e muitas vezes suficiente para a indução de morte celular. Pensa-se que a clivagem por caspase, exceto para p75NTR e integrina, é responsável por expor esse domínio ADD. Após a liberação/exposição do ADD recruta complexos ativadores de caspases que são diferentes daqueles implicados na ação dos “receptores de morte” (apoptose extrínseca) e das vias apoptóticas clássicas mitocondriais intrínsecas. Por exemplo, na ausência de netrina-1, o DCC recruta e ativa a caspase 9, permitindo assim a ativação da caspase 3, mas este processo não requer liberação do citocromo C e posterior formação de um complexo apoptossômico (CYTC/APAF-1/CASP9), como é o caso da via mitocondrial clássica (Forcet et al., 2001). O DCC não interage diretamente com a caspase 9, mas recruta uma ou mais proteínas adaptadoras/ancoradoras.

Em resumo, a apoptose extrínseca é um tipo de RCD induzida por perturbações do microambiente extracelular, que são detectadas por receptores de membrana plasmática, propagadas pela CASP8 (com o envolvimento opcional do MOMP), via “receptores de morte” ou CASP9, via “receptores de dependência” e precipitadas por caspases executoras de apoptose, principalmente, a CASP3.

Necrose- transição de permeabilidade mitocondrial

A necrose pode ser reconhecida precocemente e definida através de características patomorfológicas, que ocorrem quando as células ou o corpo são confrontados com uma intensa agressão externa. Trata-se de uma morte celular não programada, gerando processos mais danosos às células adjacentes e/ou ao organismo como um todo. Várias causas, incluindo trauma, podem levar a uma alteração da pressão osmótica ambiental interna, destruindo o equilíbrio da homeostase interna de um organismo e levando à necrose. Um conjunto de reações ocorre, incluindo perda da integridade da membrana celular, inchaço da membrana celular (devido à tonificação celular e disfunção de bomba de Na/K) e disfunção mitocondrial. Devido à ruptura da membrana celular, grande número de elementos intracelulares extravasa o que pode causar e agravar a inflamação dos tecidos circundantes (GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018; SOLÁ, S *et al.*, 2001). Existem processos que muito se assemelham com a necrose, como os caracterizados pela necroptose, descrito abaixo; o processo de transição da permeabilidade mitocondrial e o processo de morte denominado Partanatos. Todos esses são agrupados na denominação de necrose regulamentada ativados pela proteína de interação com o receptor, a RIP-cinase-3 (RIPK-3) (GALLUZZI, L. *et al.*, 2012; GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018). O processo de transição da permeabilidade mitocondrial, por exemplo, é iniciado por perturbações intracelulares de espécies oxidativas ou aumento do nível de cálcio citosólico. A abrupta queda de impermeabilidade a pequenos solutos através da membrana interna da mitocôndria resulta em uma rápida dissipação do potencial de membrana, quebra osmótica, tanto da membrana interna como externa da mitocôndria, e início do processo de morte celular (GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018). No nível bioquímico, a abertura de poros como os complexos de permeabilidade transitória (PTPC) por interações com peptídeos pro e

anti apoptóticos da família do BCL2, como BAX, BAK e BID como os BCL2 e BCL-Xl, citados anteriormente. Ainda pode ser observado o envolvimento de canais como o canal do tipo VDAC (*voltage-dependent anion channel*), proteína que possui ação no transporte de macro e micro componentes através da membrana externa da mitocôndria, responsável pelo transporte de íons, metabolitos celulares como NAD⁺/NADH, ADP/ATP, succinato, citrato, e íons, como o Ca²⁺, entre o citosol e a mitocôndria, que podem juntamente com proteínas presente na membrana do reticulo endoplasmático elevar o nível do íon cálcio mitocondrial e assim desencadear o processo de morte celular (BATHORI. *et al.*, 2006; GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018; SHOSHAN-BARMATZ *et al.*, 2009, 2010; TAN; COLOMBINI, 2007).

Necroptose

Existem outros processos de morte celular que permeiam os mecanismos de apoptose e necrose e podem também coexistir em um determinado estado fisiológico ou patológico (LA ROVERE *et al.*, 2016; WALLACH; KANG; KOVALENKO, 2014). Nas últimas décadas, uma nova forma, mais alternativa de necrose, chamada necroptose, tem sido considerada como um caminho alternativo para a morte celular. (DEGTEREV *et al.*, 2005). A necroptose distingue-se da morte celular passiva necrótica, na medida em que segue uma programação celular, envolvendo as proteínas cinases RIPK1 e RIPK3, que interage com os receptores do tipo TNF-R1 (FUCHSLOCHER CHICO; SAGGAU; ADAM, 2017; NEWTON *et al.*, 2019). A inicialização pelo receptor gera a formação do complexo I contendo as proteínas TRADD (do inglês: *TNF-Receptor Associated via Death Domain*); cIAPs (do inglês: *Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins*), TRAF2 (do inglês: *TNF receptor-*

associated factor 2) e RIPK1 (do inglês: *receptor-interacting kinase 1*). A poliubiquitinação de RIPK1 nos resíduos k11, k48 e k63 recruta a cinase I κ B (IKK: *I κ B kinase*) levando a ativação do fator de transcrição NF κ B juntamente com a ativação de um processo pro-inflamatório, suprimindo a célula do processo de morte celular (WANG, LAI; DU; WANG, 2008). Por um mecanismo que compromete a poliubiquitinação através da *TNF alpha-induced protein 3* (TNFAIP3; melhor conhecida como A20), RIPK1 se dissocia do receptor TNF-R1 e forma um complexo IIb citosólico com FADD, caspase-8 e RIPK3. Quando a atividade de caspase-8 é alta, esta cliva as proteínas cinases RIPK1 e RIPK3 promovendo a apoptose. No entanto, esta cisteína protease, caspase 8, pode ser inibida, abaixando-se assim a sua atividade pela formação de um complexo constituído pela própria caspase-8 e a proteína cFLIP (do inglês *FLICE-like inhibitory protein*). Com a baixa atividade ou mesmo sua ausência a proteína RIPK1 fosforilada recruta a proteína MLKL (do inglês: *Mixed lineage kinase domain-like*) formando o necrossoma. A proteína MLKL uma vez fosforilada transloca do citosol para a membrana levando ao processo de necroptose (ASHKENAZI; SALVESEN, 2014; FUCHSLOCHER CHICO; SAGGAU; ADAM, 2017; GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018).

Morte celular dependente de Autofagia

A morte celular autofágica é um tipo de RCD que depende da maquinaria autofágica ou dos seus componentes (MCARTHUR; KILE, 2018). Esse processo de morte celular, também chamado de morte celular programada tipo II, segundo a NCCD, se caracteriza pela formação de vesículas de dupla membrana que vão conter organelas ou outros materiais intracelulares, denominados de autofagosomos. Estes se fundem

com os lisossomos para que possam ser degradados e reciclados. A importância de dupla membrana se dá, pois após fusão com os lisossomos tudo que estiver dentro da camada mais externa será degradado, inclusive a própria membrana interna (MIZUSHIMA; OHSUMI; YOSHIMORI, 2002; TOOZE; YOSHIMORI, 2010). A formação do autofagossomos é controlada por proteínas atg ou proteínas relacionadas à autofagia, traduzidas do gene *ATG* (*AuTophagy related Genes*, gene relacionado com a autofagia) (TOOZE; YOSHIMORI, 2010).

As causas da autofagia são diversas e envolvem desde o estresse celular por hipóxia, radiação, tratamento e ação de produtos químicos, até a privação nutricional. Ainda deve se levar em conta, a duração e gravidade do fator estressante. O processo de autofagia possui mecanismo distinto de outros tipos de morte celular, atuando como mediador de processo fisiológico de morte celular ou na ausência de fatores apoptóticos, como as proteínas BAX e BAK e as próprias caspases (GALLUZZI, L. *et al.*, 2012). Esse processo de morte celular pode ainda atuar concomitantemente com outras vias, favorecendo e auxiliando outros processos. Por exemplo, temos a ferroptose promovida pela degradação autofágica da ferritina; a apoptose extrínseca que através da degradação autofágica da proteína tirosina fosfatase pode ser favorecida e ainda; o favorecimento da necroptose pela degradação autofágica de c-IAP1 e c-IAP2 (*inhibitor of apoptosis proteins*) (GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018).

Os mecanismos de morte celular fisiológica, como a autofágica, tem importância no SNC, pois após divisão mitótica há um acúmulo de proteínas e organelas defeituosas que devem ser degradadas e recicladas. Apesar do pouco conhecimento na formação de autofagossomos na célula neuronal, existe o problema na distorção de qualquer mecanismo, que pode levar à neurodegeneração e doenças como Alzheimer,

Huntington, e esclerose amiotrófica lateral se o processo tiver problemas na regulação (HARA *et al.*, 2006; KESIDOU *et al.*, 2013; KOMATSU *et al.*, 2006; MARÍÑO; MADEO; KROEMER, 2011; RUBINSZTEIN *et al.*, 2005).

Como mencionado acima, os demais tipos de morte celular não será detalhado aqui, mas pode ser revisto em GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018.

Receptores AMPA, Níveis de Ca^{+2} e Canais de cálcio: papel na neurodegeneração.

O funcionamento fisiológico do sistema nervoso, como os processos de neurotransmissão elétrica (HORMUZDI *et al.*, 2004) e química (CUEVAS, 2007), estão também envolvido em disfunções associadas a processos neurodegenerativos (KONDRATSKYI *et al.*, 2015; NOMURA *et al.*, 2014; ZHANG, LING *et al.*, 2011). Em células excitáveis, por exemplo, a entrada do íon cálcio e as alterações na concentração do cálcio citosólico favorecem uma cascata de reações intracelulares que podem desencadear processos de morte celular (HAJIEVA *et al.*, 2009; KONDRATSKYI *et al.*, 2015; MARK *et al.*, 2017). Importante destacar que os níveis de cálcio estão relacionados com a intensificação na produção de radicais de oxigênio (SOLÁ, SUSANA; MORGADO; RODRIGUES, 2013; TRETTER; DAM-VIZI, 2004), ativação de proteases (KERNER *et al.*, 2012); alteração na regulação de cinases (JHALA; HAZELL, 2011; SHOSHAN-BARMATZ *et al.*, 2009; SHOSHAN-BARMATZ; BEN-HAIL, 2012) e na fisiologia do impulso nervoso ao longo dos axônios (CUEVAS, 2007). Esses eventos concomitantes representam um conjunto de

fatores que podem desencadear e estão envolvidos com o processo de morte celular (LA ROVERE *et al.*, 2016; NAGY *et al.*, 2015).

A propagação do impulso nervoso ao longo dos circuitos neurais segue mecanismos de despolarização da membrana que, quando culminam nas sinapses, deve ser transmitida de um neurônio ao outro (DRUKARCH *et al.*, 2018). Com a entrada de cálcio por canais específicos, as vesículas contendo neurotransmissor, como o glutamato, são fundidas à membrana, liberando seu conteúdo na fenda sináptica. Nestas sinapses o papel do glutamato, como neurotransmissor excitatório, resulta na despolarização de membranas adjacentes. Este neurotransmissor atua através de diferentes receptores metabotrópicos (ligados à proteína G) e ionotrópicos dos tipos: N-metil D-Aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainatos, que favorecem o fluxo de íons através da membrana (DINGLELINE *et al.*, 1999; PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013; SONG; HUGANIR, 2002).

As alterações dos níveis de cálcio entre os compartimentos celulares podem acontecer por meio de canais específicos como os canais de cálcio dependente de voltagem ou por meio dos receptores AMPA e NMDA. Como visto acima, uma vez que os níveis de cálcio aumentam no citosol, ocorre à liberação de neurotransmissores que atuam em processos de transmissão química nas sinapses.

Os receptores AMPA ativados por glutamato intermediam o componente rápido da tradução de sinal excitatório nas sinapses químicas em todas as regiões do cérebro dos mamíferos. Os receptores AMPA são conjuntos tetraméricos compostos por quatro subunidades, GluA1-4 (ZHAO *et al.*, 2019). São expressos tanto em neurônios como nas células da glia, sendo que os mesmos são permeáveis ao cálcio e outros cátions,

como sódio e potássio. Como mencionado, os receptores AMPA são abundantes e amplamente distribuídos no SNC: hipocampo, camada externa do córtex, núcleos basais, regiões olfativas, septo lateral e amígdala são todos enriquecidos com as subunidades GluA1, GluA2 e GluA3. Em contraste, a expressão do GluA4 é menor em muitas regiões do SNC, exceto cerebelo, tálamo e tronco cerebral, onde a expressão é alta (BENKE *et al.*, 1998; GREGER; WATSON; CULL-CANDY, 2017).

A despolarização pós-sináptica induzida pela ativação dos receptores AMPA pode permitir o influxo de cálcio, através de receptores NMDA, pela reversão da oclusão desses receptores, que é feita pelo magnésio (MAYER; CRUNELLIP; KEMP, 1984; NOWAK *et al.*, 1984). A entrada do Ca^{2+} na zona ativa pré-sináptica, ocorre através de canais Ca^{2+} dependentes de voltagem (CaV), que são ativados por despolarização da membrana. O aumento da concentração de cálcio intracelular dispara a liberação de neurotransmissor a partir de vesículas sinápticas (SVs). Múltiplos mecanismos regulam a função dos canais de Ca^{2+} pré-sinápticos. A atividade dos canais para abertura, fechamento ou inativação em resposta à despolarização da membrana muda a cada poucos milissegundos, durante e após a atividade neuronal, resultando no controle da força sináptica.

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCCs: *voltage-gate calcium channels*) podem ser divididos em duas categorias, os que são ativados por alta voltagem, HVA (*high-voltage-activated*) com um limiar de ativação em tensões de membrana positivas para -20 mV, e os ativados por baixa voltagem, LVA (*low-voltage-activated*) atuando em uma tensão de membrana positiva para -70 mV, também chamados de canais de cálcio do tipo T, por possuem pequena amplitude da condutância e rápido decaimento (*T – Tiny; Transient*). Os canais de cálcio do tipo HVA são ainda subdivididos em canais do tipo L e canais pré sinápticos do tipo N, P/Q e R,

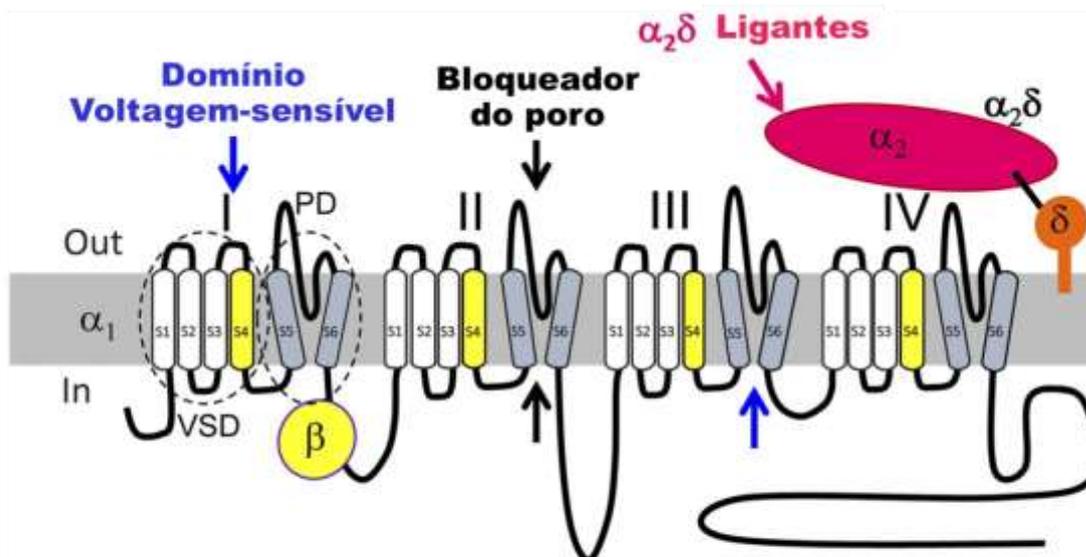
denominados CaV-2.1, CaV-2.2 e CaV-2.3 respectivamente. Os canais de cálcio do tipo L, devido à sua amplitude de condutância alta e cinética lenta de deterioração da corrente, foram assim nomeados (*L – Large; Long-lasting*), compostos por CaV-1.1, CaV-1.2, CaV-1.3, CaV-1.4. Enquanto dos canais de cálcio pré-sináptico do tipo N, pela sua localização (N – Neurônios), P/Q (P - células de Purkinje) e do tipo R por serem resistentes à algumas toxinas (BERGER; BARTSCH, 2014; KONDRATSKYI *et al.*, 2015; LACIONVA, 2005; MCKINNEY *et al.*, 2008; STRIESSNIG *et al.*, 2006; WEISS; ZAMPONI, 2017)

As primeiras investigações revelaram classes distintas de correntes de Ca²⁺ que foram identificadas com uma nomenclatura alfabética (TSIEN, R W *et al.*, 1988). Correntes tipo P/Q, tipo N e tipo R de Ca²⁺ são observadas principalmente em neurônios, requerem forte despolarização para ativação (TSIEN, RICHARD W; ELLINOR; HORNE, 1991), e são bloqueadas por toxinas polipeptídicas específicas de caramujos e venenos de aranha (MILJANICH; RAMACHANDRAN, 1995). As correntes de Ca²⁺ tipo P/Q e tipo N iniciam a liberação do neurotransmissor na maioria das sinapses rápidas (CATTERALL, 2000).

Os canais Ca²⁺ são compostos de quatro ou cinco subunidades distintas (**Figura 4**). A subunidade $\alpha 1$ incorpora o poro de condução, os sensores de voltagem e a aparelhagem do “portão” (*gating apparatus*), e os sítios alvos de toxinas e reguladores intracelulares. A subunidade $\alpha 1$ é composta por cerca de 2000 resíduos de aminoácidos e está organizada em quatro domínios homólogos (I-IV), conforme pode ser visto na **Figura 4**. Cada domínio é composto por seis hélices transmembrana α (S1 a S6) e um *loop P* associado à membrana entre S5 e S6. Os segmentos S1 a S4 servem como módulo sensor de tensão, enquanto os segmentos transmembrana S5 e S6, em cada domínio, e o *loop P* entre eles formam o módulo poroso (MOCHIDA, 2019).

Dependendo da estrutura do canal, pode ocorrer um aumento ou diminuição da sensibilidade, facilitação da internalização e, conseqüente degradação por lisossomos ou proteassomos. A subunidade β , uma proteína citosólica associada à primeira cadeia de α -hélice, possui domínio conservado SH3 e GK e, juntamente com a estrutura $\alpha 1$ é chamada de domínio alfa de interação (AID - *alpha-interaction domain*), possuindo efeito de aumentar a amplitude de corrente do canal (BERROW *et al.*, 1995; WEISS; ZAMPONI, 2017). Outra função da subunidade β é a facilitação de exportação para a membrana (BURAEI; YANG, 2010). Uma vez sintetizado, o canal pode ser exportado dependendo da presença ou não da subunidade β . Por exemplo, em canais CaV-1.2 a presença da subunidade β , desfavorece o sinal de retenção no retículo endoplasmático, pela não ligação dos *loops* das cadeias de α -hélices II-III; III-IV; e desliga as ligações das regiões N e C-terminal com uma proteína presente na membrana do retículo. Esses mecanismos favorecem a exportação para a superfície celular (BICHET *et al.*, 2000). Além disso, a subunidade β possui papel na proteção contra degradação pelos proteassomos, através da inibição do processo de ubiquitinação (BURAEI; YANG, 2010; WEISS; ZAMPONI, 2017).

Embora menos estudada, outra estrutura importante do canal é a γ , que trata-se de uma estrutura proteica transmembrana e com função modulatória do canal. Por exemplo, a redução na expressão desta subunidade γ é acompanhada por um aumento da densidade de corrente, tanto em canais HVA como LVA, em neurônios de retransmissão do tálamo-córtex (ZHANG, YI *et al.*, 2002).



Gerald W. Zamponi et al. Pharmacol Rev 2015;67:821-870

ASPET PHARMACOLOGICAL REVIEWS

Figura 4: Diagrama da topologia da subunidade alfa do canal de cálcio dependente de voltagem (CaV-1.2). Figura modificada e retirada do artigo dos autores ZAMPONI et al., (2015).

A figura mostra os 4 domínios (I, II, III e IV) contendo, cada um deles, 6 estruturas em α -hélices (S1 a S6). Associado ao canal observamos 4 diferentes subunidades, α_2 , β , γ , δ , que auxiliam nos processos regulatórios do canal. As α -hélices S1 a S4 dos domínios I a IV, fazem parte do domínio sensível a voltagem (Seta azul), enquanto as α -hélices S5 e S6 fazem parte do domínio do poro. O loop proteico entre as estruturas S5 e S6 do domínio II funciona como bloqueadores do canal (seta preta).

Os membros da subfamília VGCC do tipo L, CaV-1.1 e CaV-1.4 são expressos de forma mais restrita, enquanto os CaV-1.2 e CaV-1.3 são expressos em uma variedade de tecidos, como coração, músculos liso, pâncreas, fígado e principalmente no cérebro (ZAMPONI *et al.*, 2015). A isoforma CaV-1.2 é expresso em quase 90% do cérebro, enquanto a CaV-1.3 apresenta 10% de expressão (SINNEGGER-BRAUNS *et al.*, 2009; ZAMPONI *et al.*, 2015). Apesar da existência de 75% de sequência homóloga nos

genes que codificam estas isoformas de canais de cálcio, existe muita diferença nas funções desempenhadas por estes canais, como plasticidade sináptica, processos de aprendizado e memória e facilitação de migração de novos neurônios (STRIESSNIG *et al.*, 2006).

A isoforma CaV-1.2 é preferencialmente detectada em dendritos pós-sináptico (HELL *et al.*, 1993), e possuem as funções mencionadas acima, na plasticidade sináptica, processos de aprendizado e memória e facilitação de migração de novos neurônios em áreas do córtex pré-frontal, com conseqüente envolvimento em alterações emocionais, déficits cognitivos, como na memória de trabalho ou operacional (BERGER; BARTSCH, 2014; BIGOS *et al.*, 2010; PAULUS *et al.*, 2014; ZHANG, QIUMEI *et al.*, 2012).

Inativações específicas na expressão de mRNA de *CACNA1C* (CaV-1.2) durante a fase embrionária resultam na perda de receptores do tipo NMDA, independentes da formação de potencialização de longa duração (LTP: *Long-Term Potentiation*), consistentes com déficit de aprendizado e memória espacial, em tarefas no labirinto aquático de Morris (KANDEL, 2001; MOOSMANG *et al.*, 2005; WHITE *et al.*, 2008) O uso de antagonistas dos canais do tipo L facilitam tanto a aquisição quanto a retenção de memórias de referência espacial e memória de trabalho (operacional) em animais jovens (LEVY *et al.*, 1991; QUARTERMAIN; GARCIA; KWAN, 2001).

Foi observado que camundongos *knockout* para o gene *CACNA1C*, gene que codifica a isoforma CaV-1.2 e um dos objetos de estudo do presente trabalho, exibem sintomas de baixa atividade exploratória e comportamento agitado (DAO *et al.*, 2010). A diminuição da isoforma CaV-1.2 tem sido compensada pela permeabilidade de cálcio através de receptores do tipo AMPA, também avaliado no presente estudo, que na

ausência da subunidade GluA2 possibilitam a passagem desse íon, podendo assim afetar o funcionamento das sinapses (LANGWIESER *et al.*, 2010; MCKINNEY *et al.*, 2008). Ao contrário, a isoforma CaV-1.3 não apresenta as mesmas alterações no funcionamento das sinapses (CLARK *et al.*, 2003; MCKINNEY; MURPHY, 2006).

Os canais CaV-1.3 estão relacionados ao tronco cerebral auditivo (HIRTZ *et al.*, 2011; JURKOVICOVA-TARABOVÁ *et al.*, 2012) e com a doença de Parkinson, através da progressiva perda de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra*, causados pelo fluxo de cálcio e, conseqüente estresse mitocondrial.

A expressão gênica e a concentração proteica da isoforma CaV-1.3 estão aumentadas no hipocampo, na sub-região CA1, com a idade, o que pode levar à um prejuízo nas habilidades de aprendizado (THIBAUT; LANDFIELD, 1996; VENG; BROWNING, 2002).

Sabe-se ainda que desequilíbrios na homeostase do íon cálcio podem alterar a fisiologia celular, induzindo a apoptose dependente de caspases (LA ROVERE *et al.*, 2016; NAGY *et al.*, 2015; OSIEZAGHA *et al.*, 2013; ZIPFEL *et al.*, 2000). O excesso de cálcio intracelular induz danos mitocondriais que podem resultar na liberação do citocromo C no citosol (**Figura 5**). Conforme descrito no item “Morte Celular”, esse processo cria dois caminhos distintos para ativação da caspase-9 e caspase 3, culminando com a apoptose.

Um influxo de cálcio através de canais presente na membrana ou por receptores ionotróficos aumenta a concentração do íon na matriz do retículo, que através de proteínas poro, como MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*), VDAC (*Voltage-dependent anion channel*), proteína GRP75 e PI3R promovem o fluxo direto para o interior da mitocôndria. Esse processo ativa a caspase-9, pelo mecanismo já descrito, e

a caspase-12 diretamente no RE. (MORISHIMA *et al.*, 2002a). Segundo PATHWAY *et al.*, (2002), células *Apaf-1knockout* sofrem estresse e induzem apoptose, indicando que o complexo formado pelo citocromo C e Apaf-1 não é essencial para a apoptose e que a atividade da caspase-12 ativada em resposta ao estresse do RE, cliva a pró-caspase-9 para iniciar a cascata apoptótica (MORISHIMA *et al.*, 2002a).

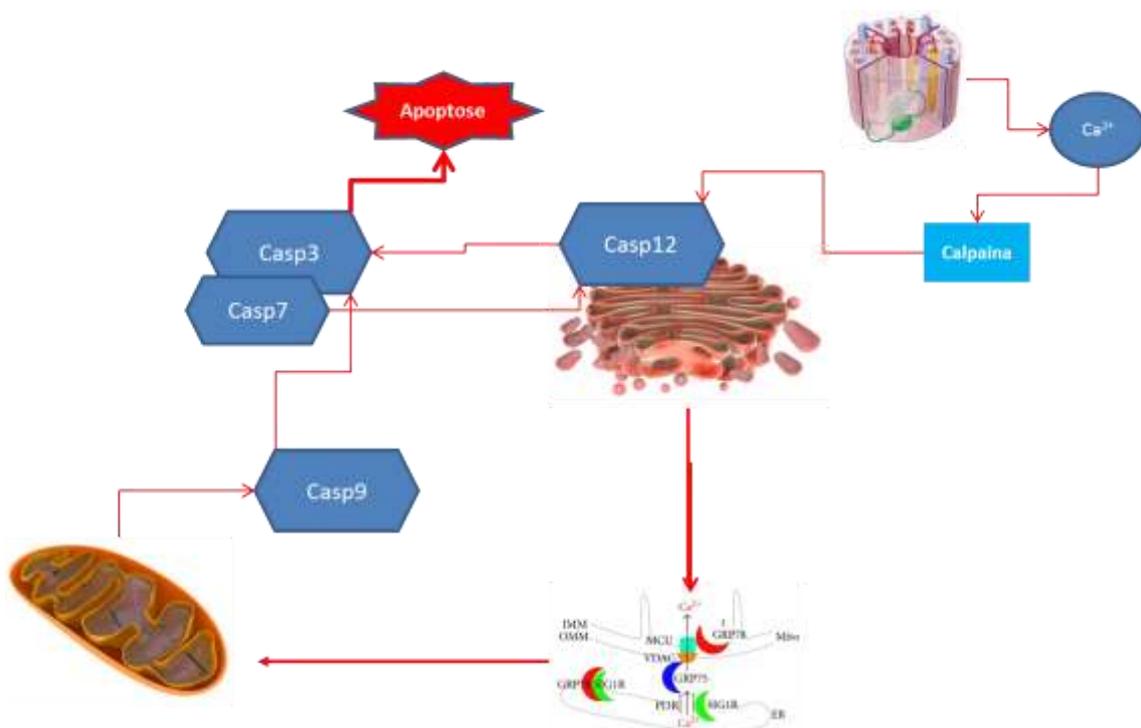


Figura 5: Esquema indicando associação entre os níveis de cálcio (influxo através de canais CaV) e Morte Celular.

As alterações dos níveis de cálcio pela passagem através de canais iônicos voltagem dependente (CaV), levam a ativação da Casp12 dentro do RE, resultando na ativação da CASP3 e apoptose. O aumento dos níveis do Ca^{+2} no RE pode também induzir a formação, de uma ponte entre a mitocôndria e reticulo endoplasmático, pelas proteínas poros MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*), VDAC (*Voltage-dependent anion channel*), proteína GRP75 (*anti-glucose-regulated protein 75 kDa*) e PI3R, resultando na liberação de CytC, formação de apoptossoma e ativação sequencial da CASP9, CASP3 e apoptose.

Memória e Aprendizado: Aspectos cognitivos

Platão em um de seus diálogos (*Fedon*, 387 a.C.) retrata que o conhecimento da verdade e da alma consiste na recordação, neste caso, todo conhecimento se retrata numa forma de lembrar. O filósofo e discípulo de Platão, Aristóteles, associa a noção de memória ao que conhecemos como lembrança, e considera que a memória não é parte da faculdade cognitiva, mas sim da sensitiva primária e, assim é passível de existir tanto no homem como nos animais (QUADROS, 2016; SMOLKA, 2000).

Em 1885, por meio de estudos realizados por Hermann Ebbinghaus (1850 – 1909), foram desenvolvidos e utilizados métodos experimentais para o estudo da memória, aproximando os conceitos de memória e aprendizagem, através de uma abordagem quantitativa. Outros estudiosos vieram posteriormente, como William James (1890), e propuseram uma divisão entre os fenômenos da percepção dos objetos e a memória dos mesmos. No século XX, através dos estudos de Endel Tulving (1983), percebe-se uma significativa contribuição no campo da cognição, com a proposição da teoria de dois sistemas de memória, a episódica e a semântica. Deste então, entendemos a memória como sendo a capacidade de adquirir, armazenar e recuperar (evocar) informações disponíveis. Em termos biológicos, os neurocientistas consideram o cérebro o principal órgão de processamento e armazenamento dessas informações. Com o conhecimento progressivo de novas doenças neurodegenerativas e os impactos sobre o desempenho cognitivo humano, cada vez mais os estudos sobre os substratos neurobiológicos de aspectos cognitivos e comportamentais tem recebido mais atenção (KANDEL, 2000, 1999, 2006).

A memória, baseada no tempo de armazenamento, pode ser dividida em diferentes tipos, como, curtíssima duração, curta, médio ou intermediária e de longo prazo. Iremos considerar aqui, as memórias de longa e de curta duração. Contudo,

ainda existe debate na literatura sobre a delimitação de tempo (minutos, horas, dias, semanas etc) entre essas categorias (COHEN; SQUIRE, 1980; KANDEL, 2000, 2001, 2006; LOMBROSO, 2004). Estudos de dissociação levaram Cohen (1984), Squire e Zola-Morgan (1991), e Squire (1992) a propor a distinção entre memória declarativa (ou explícita) e memória não-declarativa (ou implícita ou de procedimentos=procedural). Ambas são memórias de longo prazo. A memória declarativa refere-se à retenção de experiências sobre fatos e eventos do passado, i.e., o indivíduo tem acesso consciente ao conteúdo da informação, sendo essa memória adequada para arquivar associações arbitrárias após uma única experiência (COHEN 1984; SQUIRE, 1980; Squire, 1992) **(Figura 6)**. De acordo com esses autores, memória declarativa é flexível e prontamente aplicável a novos contextos e é esse o tipo de memória prejudicada em algumas doenças neurodegenerativas. As memórias declarativas são codificadas pelo hipocampo, córtex entorhinal e córtex perirrinal (tudo dentro do lobo temporal medial do cérebro), mas são consolidadas e armazenadas no córtex temporal e em outras regiões cerebrais. Por outro lado, as memórias não-declarativas (procedurais), não parecem envolver de forma mais abrangente o hipocampo e são codificadas e armazenadas pelo cerebelo, putamen, núcleo caudado e córtex motor, todos envolvidos no controle motor.

Em outras palavras, a memória declarativa, ou explícita, é aquela que pode ser declarada (fatos, nomes, acontecimentos, etc.) e é exercida de forma consciente, se referindo ao *knowing what*. Esse tipo de memória está associado a estruturas cerebrais do lobo temporal medial, como hipocampo e amígdala. A memória declarativa, por sua vez, é dividida em episódica e semântica. Enquanto a primeira remete a fatos e acontecimento específico, a segunda refere-se a aspectos semânticos gerais **(Figura 6)** (SQUIRE; ZOLA, 1998; TULVING, 1972).

A memória não-declarativa, ou memória procedural (implícita) se refere ao *knowing how* e esta associada a habilidades motoras, como por exemplo andar de bicicleta, dirigir um carro, tocar um instrumento musical, os quais executamos sem atingir um nível de consciência detalhada dos fatos. Essa categoria de memória requer mais tempo para ser adquirida, mas é bastante resistente ao esquecimento, ou seja, é duradoura (KANDEL, 2000). Ou seja, a memória procedural é um subconjunto de memórias implícitas, por vezes referidas como memória inconsciente ou memória automática. A memória implícita usa experiências passadas para se lembrar de coisas sem pensar nelas. Difere da memória declarativa, ou memória explícita, que como mencionado acima, consiste em fatos e eventos que podem ser armazenados explicitamente e lembrados conscientemente ou "declarados".

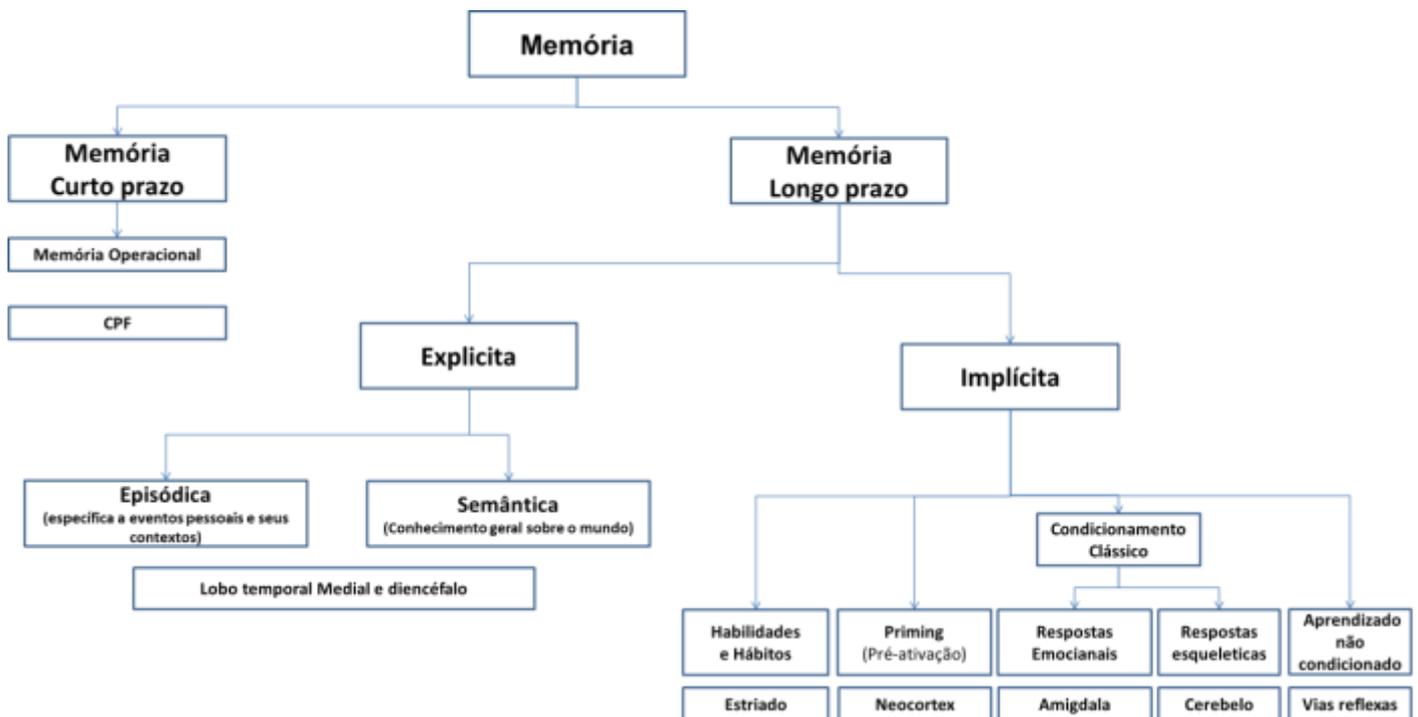


Figura 6: Fluxograma dos tipos de Memórias,

Segundo o critério de tempo de armazenamento, e a capacidade de verbalização ou não, indicando as estruturas nervosas associadas, de acordo com SQUIRE; KNOWLTON, (1995), com modificações. CPF= Córtex Pré-Frontal.

Sabe-se que a memória não está restrita à apenas uma estrutura cerebral, mas diferentes estruturas estão envolvidas na aquisição, armazenamento e evocação das informações aprendidas. Dependendo do estímulo, a memória pode durar apenas alguns segundos ou até mesmo dias, meses ou anos. Neste caso, é o que chamamos de memória de curta duração e memória de longa duração (COWAN, 2009).

Ao longo dos anos, o desenvolvimento da psicologia cognitiva tem sido fortemente influenciado por evidências neuropsicológicas. Um dos exemplos mais claros disso é dado pela influência de estudos baseados em pacientes com déficits amnésicos, no caso da separação da memória de longo prazo (LTM: *long-term memory*) e memória de curto prazo (STM: *short-term memory*). Em um estudo clássico, Milner (1966) descreveu o caso do paciente HM que, após lesões bilaterais no lobo medial-temporal, apresentou déficits dramáticos em novas aprendizagens a longo prazo, mantendo normal o desempenho em testes do tipo *digit span*. Isto foi considerado um forte suporte para a separação dos sistemas LTM e STM, uma conclusão que foi reforçada por estudos posteriores (Scoville e Milner, 1957; Squire, Knowlton, & Musen, 1993).

Com base na classificação entre memória de curto prazo e memória de longo prazo, podemos mencionar dois tipos de memórias avaliadas no presente trabalho, que trata-se da memória de trabalho ou operacional (MO) e a memória referencial (MR) ou de referência, passíveis de serem avaliadas em modelos experimentais, com roedores. Tanto a MO como a MR podem ser sub classificadas em outras formas como, memória auditiva, visual, gustativa, no caso do critério de classificação ser a via sensorial/perceptiva.

A **memória operacional**, termo que começou a ser usado na década de 1960, é um tipo de memória de curto prazo, também denominada memória primária, memória imediata, memória operante, que se refere, portanto, a um processo provisório de armazenamento e processamento de informações, ou seja, por pequenos espaços de tempo (BADDELEY, 2003; HOOKER, 1960). A memória operacional envolve uma ampla estrutura de processos interativos que, temporariamente, armazena e manipula a informação a fim de realizar atividades cognitivas complexas (BADDELEY, 2000).

Apesar de poder ser confundida com outros tipos de memória de curto prazo, a diferença está na finalidade dessas representações mentais, na sua manipulação e processamento. Se tratando de uma ação consciente, a MO distingue-se das demais pela capacidade limitada, ou manutenção temporária das informações disponíveis para o processamento, dando uma maior ênfase na manipulação executiva de informações, em vez de manutenção. Usada na tomada de decisões, orientação, e raciocínio, a MO pode ser diferenciada de outras formas de memória por sua maior sensibilidade à interferência atencional (DUDCHENKO, 2004a).

Existem neurônios específicos no córtex pré-frontal que podem, através de sua atividade, reter a informação além de alguns segundos (HAVEN, 1995). No caso da memória **espacial** operacional, a habilidade de "usar" dicas espaciais com relevância comportamental, em uma escala de segundos, é um constituinte fundamental da cognição. Sabe-se que, o córtex pré-frontal (PFC: *prefrontal cortex*) e o hipocampo contribuem conjuntamente com as bases neurais subjacentes à memória espacial operacional (SPELLMAN *et al.*, 2015).

A MO em animais, refere-se à retenção de informações que, dependendo do estímulo, podem mudar de status durante a conclusão do teste mesmo no caso das pistas

visuais e/ ou olfativas não estarem disponíveis para orientação das respostas, como no caso dos testes em labirintos, p.ex. o aquático de Morris (LAM) (MORRIS, 1981) ou de braço radial (OLTON, 1987; OLTON; SAMUELSON, 1976).

A distinção entre memória operacional e de referência se dá pela transitoriedade de eventos, e julgamento particular, neste caso sendo esquecido ou ignorado em ensaios subsequentes (DUDCHENKO, 2004a). No caso de testes de MO com roedores, p.ex. no LAM, a localização do reforço é alterada em cada sessão, de forma que o indivíduo tem que aprender a nova localização e “esquecer/extinguir” a anterior, para que possa ter sucesso na tarefa.

O reforço, no caso do labirinto aquático de Morris (LAM) é uma plataforma invisível submersa na água, que o animal deve encontrar, através da utilização de estratégias aloentrícas (referências externas ao indivíduo, como posição de objetos), elaborando, com as coordenadas ou dicas externas ao labirinto, um mapa cognitivo espacial no hipocampo. Diferentemente da MO que dura apenas frações de tempo, a memória de longo prazo pode durar anos e é denominada memória de referência espacial (COWAN, 2009; KANDEL, 2000).

Segundo GUISE; SHAPIRO, (2017), em uma tarefa espacial dependente do hipocampo, a disfunção do mCPF (porção medial do córtex pré-frontal) pode prejudicar processos de aprendizagem e recuperação de uma informação. A proposta é que a atividade do mCPF, durante a aprendizagem, modifica a codificação no hipocampo.

Os mecanismos de comunicação entre as duas regiões cerebrais, CPF e o hipocampo, durante o processo de aprendizado e memória espacial, não estão muito claros, mas estudos recentes têm trazido informações importantes sobre conceitos e

mecanismos envolvidos no processo de memória operacional, com participação dessas duas estruturas (XIA, MI *et al.*, 2019).

O estudo da memória espacial de referência torna-se muito importante na medida em que esse tipo de memória é prejudicado nos processos neurodegenerativos, que ocorrem em condições fisiológicas (envelhecimento) ou patológicas (doenças).

Bases Neurobiológicas

A memória espacial de referência foi bastante estudada por Edward Tolman que propôs, em 1948, a possível existência de um mapa cognitivo, uma representação global real, no cérebro, do ambiente externo que permitiria ao animal se guiar pelo espaço. Em 1971, O'Keefe e Dostrovsky realizaram experimentos que corroboraram a hipótese de Tolman ao identificarem em experimentos com ratos as “*place cells*”, células piramidais do hipocampo, que em conjunto se tornam ativas, dependendo da localização do animal. Posteriormente, May-Britt e Edvard Moser demonstraram a existência das “*grid cells*”, que são células presentes no córtex entorrinal de ratos, que mantêm um padrão de disparo em locais específicos, sustentando a teoria dos mapas cognitivos (IZQUIERDO, 1989; O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY; J. O'KEEFE, 1971; O'KEEFE, JOHN, 1976). Todos esses achados constituem evidências do papel do hipocampo e do córtex entorrinal na memória espacial.

Durante o processo de aquisição ou aprendizado, os indivíduos são expostos a novas experiências, sendo submetidos a informações detectadas pelos sistemas sensoriais. Durante esta etapa as informações mais significativas são selecionadas. Após apresentação das informações adquiridas passam para uma etapa seguinte do processo de formação da memória, onde em tempos variáveis, como minutos, horas ou até

mesmo dias após a aquisição, com reestímulo, começam a modificar no campo molecular (síntese proteicas, modificações sinápticas) e podem ser recuperadas.

A ação do LTP, modelo aceito a partir da década de 70 para explicar as modificações ocorridas na plasticidade sináptica sem um controle inibitório poderia trazer resultados catastróficos, isso porque sem um controle adequado poderiam atingir um nível de máxima eficácia, nesse caso dificultando a codificação de novas informações, além do que as sinapses se tornariam tão complexas que mesmo com um pequeno estímulo, muitas células seriam excitáveis, resultando em patologias como a epilepsia (FOY, 2000). Um processo que poderia equilibrar esses efeitos, e até mesmo explicar o decaimento da magnitude do LTP com o envelhecimento, afinando, diminuindo quando necessário, foi proposto como LTD (do inglês *LTD: Long-term depression*) (NORRIS; KOROL; FOSTER, 1996), processo oposto que entraria em equilíbrio com a estimulação proporcionada pelo LTP, conferindo a consolidação da memória quando necessário ou a sua extinção. Ambos podem ocorrer ao mesmo tempo na sinapse em respostas a diferentes padrões de ativação de receptores do tipo NMDA. Um modelo apresentado por BEAR; MALENKA, 1994 mostra que a concentração de cálcio pode atuar de maneira diferente na propagação do LTP e LTD. O aumento do cálcio intracelular pela entrada por receptores do tipo NMDA, acima de $5\mu\text{M}$ ativa proteínas cinases que fosforilam substrato da cascata culminando no LTP, e em oposição o processo de desfosforilação por concentrações menores que $5\mu\text{M}$ resultaria no predomínio do LTD. Sendo assim, o processo de fosforilação e desfosforilação possuem um papel importante no controle da plasticidade sináptica e conseqüentemente no aprendizado e consolidação da memória.

Outro mecanismo que modularia a razão LTP:LTD seria a ação de enzimas proteolíticas, como a caspase-3. Por meio da via clássica apoptótica, citada acima com

concomitante ativação das caspase-9 e 3, levaria a interiorização de receptores AMPA. A enzima proteolítica caspase-3 possui como um de seus substratos a subunidade Glu1R dos AMPAR, favorecendo sua perda de atividade e interrompendo o fluxo de íons pela membrana (LI, ZHENG *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2002). Os peptídeos BAD e BAX com papel apoptótico estariam envolvidos. Sabe-se que BAD pode ser ativado por fosfatases e a ligação deles na membrana mitocondrial para liberação do citocromo C e consequente ativação da via acontece por meio dos receptores do tipo NMDA. BAD-BAX geralmente estão envolvidos com a morte celular, além do que as mesmas fosfatases (PP2B/calcineurina, PP1 e PP2A) também estão presentes tanto na ativação de BAD, e assim na apoptose. Sendo assim, num processo adaptativo observado em fatias de hipocampo de roedores, uma diferença na quantidade de caspase-3 ativas mudam sua ação levando a indução de LTD ou morte celular por apoptose (DEWSON; KLUCK, 2009; JIAO; LI, 2011; LI, ZHENG *et al.*, 2010; LI, ZHENG; SHENG, 2012; MALENKA; BEAR, 2004). Enquanto os estímulos indutores de LTD são breves e leves, os para indução de apoptose são prolongados e fortes (JIAO; LI, 2011a). Esse balanço entre LTP e LTD pode de certa maneira explicar os efeitos observados em doenças neurodegenerativas e no processo de envelhecimento, quanto avaliamos aprendizado e consolidação da memória (WHALLEY, 2007).

Após as etapas de aquisição e consolidação, temos a evocação, momento de recuperação das informações e até mesmo de sua utilização. Em animais podemos observar quando muda o comportamento, modificando sua maneira de explorar determinados ambientes devido à presença de um estímulo aversivo ou até mesmo comportamentos não naturais de resposta à necessidade de comida. Durante esta fase as memórias pode se tornar instáveis, sendo estabilizadas ou apagadas de acordo com o

novo estímulo empregado, processos conhecidos como reconsolidação e extinção respectivamente.

O processo de aquisição e consolidação da memória pode ser melhorado pela repetição dos eventos, aumentando o número de tentativas por sessão ou até aumentando o número de dias de estímulo ao animal. Segundo TERRY, 2009; e VORHEES; WILLIAMS, 2006b, em testes realizados no LAM, o aumento do número de tentativas resulta no aprendizado em um período de tempo mais curto, enquanto a mesma resposta pode acontecer aumentando os números de dias em detrimento ao número de tentativas por sessões. Outro ponto a salientar trata do grau de dificuldade a que podem ser submetidos os animais nos testes comportamentais. Referimo-nos neste caso aos números de pistas espaciais. Dependendo do grau de danos teciduais algumas regiões podem ser mais acometidas que outras. Sendo assim o grau de dificuldade nos labirintos, por exemplo, LAM, pode trazer resultados diferentes. Como já citado, canais de cálcio podem afetar o aprendizado e a memória. Animais com deleção de canais de cálcio (CaV1.2) apresentaram maiores dificuldades no aprendizado de tarefa no LAM (TEMME *et al.*, 2016) mesmo aumentando o número de sessões. Este dado foi coletado em teste no labirinto aquático de Morris modificado, com número menor de referências espaciais, sendo assim mais difícil.

RESENDE, 2012 demonstrou que a tiamina desempenha papel importante em mecanismos moleculares de sistemas neurobiológicos talâmicos e hipocampais relacionados com processos de aprendizagem e memória espacial. Foi demonstrada uma relação entre os níveis das proteínas sinapsina I hipocampal e o desempenho no teste de alternância espontânea (aprendizagem e memória) além de efeitos da DT com a liberação de acetilcolina e o desempenho em tarefa de aprendizagem e memória espacial. Outros dados de proteoma demonstraram que enzimas dependentes

da tiamina não são exclusivamente afetadas como era de se esperar. Outras proteínas distintas no tálamo se mostraram desreguladas, como as envolvidas em respostas aos processos inflamatórios (NUNES; GÓMEZ-MENDOZA; *et al.*, 2018).

Modelos experimentais para estudo do processo de aprendizado e da memória espacial

A psicologia experimental tem utilizado inúmeros modelos de labirintos ou aparatos para estudar tanto o processo de aprendizado como a memória. Dentre estes podemos exemplificar o Labirinto em Cruz Elevado ou labirintos radiais, em ‘Y’ ou ‘T’, com avaliação de desempenho cognitivo através da tarefa de alternância espontânea simples, para avaliação de aprendizagem, memória e atenção que envolve alterações na memória espacial, estratégia, medo e atenção dos animais, esquiva passiva e ativa, entre outros (OLTON; SAMUELSON, 1976); Labirinto de Barnes - LB (BARNES, 1979) utilizado para medir capacidade de navegação espacial em resposta a estímulos aversivos do meio ambiente; e o Labirinto Aquático de Morris - LAM (MORRIS, 1981), utilizado em nosso estudo e detalhado abaixo.

O LAM, muito utilizado na psicologia experimental para avaliação de comportamento cognitivo, através de mecanismos de memória, aprendizado e percepções de navegação espacial em roedores, foi o teste escolhido em nossas análises cognitivas (D’HOOGHE; DE DEYN, 2001; MORRIS, 1981; VORHEES; WILLIAMS, 2006a). Dispositivo descrito e utilizado desde a década de 80, é composto de uma piscina circular contendo água a uma altura de mais ou menos 30 cm de profundidade com uma plataforma, dependendo do teste, sendo submersa aproximadamente 1 cm, não

visível pelos animais. O LAM é aparentemente simples, mas empregado para uma variedade de processos mnemônicos para avaliar aprendizado, memória operacional, memória espacial de referência e extinção.

Através dos testes realizados no LAM é possível avaliar funções cognitivas em roedores em curto período de tempo, sem a necessidade de pré-treinamentos. Ainda é possível eliminar pistas olfativas que podem alterar os resultados e com o auxílio de um circuito interno de vídeo avaliar parâmetros como velocidade, comportamentos não mnemônicos, estratégias motoras ou déficits motivacionais. Com a plataforma visível, acima da superfície d'água, é possível avaliar déficits visuais brutos ou quando abaixo da superfície avaliar questões envolvendo aprendizado, memória, reaprendizagem e extinção de comportamentos. A água, sendo um ambiente aversivo para o animal, representa o estímulo no teste, evitando procedimentos mais aversivos e invasivos (privação de alimentação, exposição a choque elétrico etc). Finalmente, o LAM é um teste fácil, barato, passível de alterações nos procedimentos e pistas expostas (D'HOOGHE; DE DEYN, 2001; TERRY, 2009; VORHEES; WILLIAMS, 2006a). Através de testes específicos no labirinto aquático de Morris é possível averiguar déficits em regiões específicas do SNC (hipocampo, estriado, cerebelo e algumas regiões do neocortex).

Os testes no labirinto aquático de Morris podem ser executados com algumas modificações. São possíveis avaliações de aprendizagem, tarefas mais básicas executadas no LAM. Neste tipo de procedimento o animal deve aprender através de pistas espaciais colocadas na sala de teste em relação à posição de uma plataforma que se encontra submersas. Como citado, o número de tentativas diárias e dias de treinamento podem variar e conseqüentemente alteram os resultados quando analisamos

aprendizagem e consolidação de memória espacial de referência (TERRY, 2009; VORHEES; WILLIAMS, 2006a).

Outro procedimento executado no LAM muito semelhante ao anterior é o teste de reversão espacial (aprendizado reverso). Neste a plataforma é recolocada em outro quadrante, reiniciando as tentativas de aprendizagem, conforme já mencionado. Este tipo de teste avalia se os animais podem ou não extinguir o aprendizado inicial da posição da plataforma e adquirir um novo posicionamento espacial do objeto. Normalmente os animais não abandonam completamente suas estratégias de aprendizado inicial, nadando para a posição da plataforma no primeiro teste e apenas depois retomando a busca da nova posição. Sugerem que esse tipo de procedimento envolve duas etapas, nas quais uma é a inibição da estratégia inicial e a outra seria a aquisição da nova estratégia (VORHEES; WILLIAMS, 2006a). Em ambos os procedimentos, ao final do aprendizado um teste é feito para avaliar a memória e extinção de comportamento do animal, podendo ser feita logo em seguida à última tentativa do dia ou após 24 horas (TERRY, 2009; VORHEES; WILLIAMS, 2006a).

Por fim, outro procedimento também passível de ser utilizado no LAM seria o teste para memória espacial operacional. Ao contrário dos demais procedimentos a plataforma é realocada a cada sessão. Neste, os animais são submetidos a sessões compostas de 2 ou mais tentativas. A primeira tentativa representa o aprendizado da nova localização da plataforma, seguida de uma nova tentativa, com intervalo curto entre cada uma. Caso o animal tenha retido a posição da plataforma neste momento encontrará a localização com facilidade e percorrerá um caminho mais curto até a mesma. Como a posição da plataforma é mudada a cada sessão por dia, não acontece o aprendizado e utilização da informação em sessões distintas (D'HOOGHE; DE DEYN, 2001; TERRY, 2009; VORHEES; WILLIAMS, 2006a).

Por meio do LAM, experimentos feitos após criação e tratamento diferenciados dos animais têm mostrado resultados interessantes. Ratos adultos jovens, criados isolados após desmame, ao contrário do que se imaginava, apresentam melhor desempenho nas tarefas em comparação com animais criados em grupo, mesmo em testes de reversão do aprendizado (WONGWITDECHA; MARSDEN, 1996).

Outros testes mostram que lesões em regiões do córtex pré-frontal, apesar de não alterarem o desempenho nas tarefas de memória de referência no LAM, podem alterar a aquisição da tarefa. Tais animais conseguem aprender a tarefa, mas durante o teste não conseguem extinguir. Acredita-se que lesões do tipo no CPF estão relacionadas com questões de tomadas de decisões importantes na extinção de comportamentos (FUNAHASHI, 2017; VILLAS-BOAS, 2014).

Também já foi mostrado deficiência no desempenho da memória operacional em tarefas cognitivas realizadas no LAM, em animais cuja densidade de células em regiões do hipocampo se mostrou também alterada. Foi observada uma diminuição do número de células no giro denteado, afetando algumas características pós-sinápticas que poderiam ser responsáveis pelo processamento espacial e assim refletirem no desempenho comportamental (BARNES, 1979; SAMSON; BARNES, 2013; VILAR; NILS, 2015). Dados que reforçam a questão do déficit cognitivo observado em testes realizados no labirinto aquático de Morris, relacionado à neurogênese, foram observados por TEIXEIRA, 2013 que constatou que após exercício físico dos animais foi observado um aumento na taxa de crescimento celular, acompanhado de melhora em tarefas de memória espacial.

Deficiência em tiamina associado ou não ao etanol

A Deficiência de Tiamina (DT) é produzida pela diminuição na absorção ou na ingestão de tiamina, e pode levar à morte neuronal em áreas vulneráveis do cérebro, gerando um espectro de doenças neurológicas (SECHI ,SERRA, 2007). Pode-se manifestar na desnutrição associada ao alcoolismo crônico e em uma série de espectros clínicos (SECHI ,SERRA, 2007; HARPER, 2009a). Até 80% dos alcoólatras crônicos sofrem de DT devido à ingesta inadequada de nutrientes, redução da absorção de tiamina no intestino devido aos efeitos do etanol neste processo, e deficiência na utilização da vitamina absorvida, devido aos efeitos inibitórios do etanol sobre cinases responsáveis pela produção das formas fosforiladas (Hoyumpa, 1980; Tallaksen, Bøhmer, & Bell, 1992). A DT envolve prejuízos no metabolismo oxidativo, podendo causar perda neuronal (GANGOLF *et al.*, 2010), colapso mitocondrial e apoptose celular (SINGLETON.; MARTIN, 2001). Em seres humanos, a DT pode resultar em doenças nas quais os indivíduos apresentam déficits cognitivos, ataxia e distúrbios oculomotores, como por exemplo, na Síndrome de Wernicke-Korsakoff (Navarro *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2005). Nesses pacientes, são observadas lesões cerebrais que afetam, predominantemente, o tálamo, corpos mamilares, região periaquedural, assoalho do quarto ventrículo, hipotálamo, vermis cerebelar, hipocampo, ponte, córtex pré-frontal (CPF) e cerebelo (SULLIVAN; PFEFFERBAUM, 2009; TORVIK, 1987).

Os pacientes com WKS apresentam déficits cognitivos e danos em diferentes regiões cerebrais. Dependendo da duração do episódio de DT, podem ocorrer lesões corticais e diencefálicas graves (DI MARCO *et al.*, 2018; LANGLAIS; SAVAGE, 1995; MCCORMICK *et al.*, 2011; SAVAGE, LISA M. *et al.*, 1997; SECHI; SERRA, 2007; ZUBARAN, CARLOS *et al.*, 1995). Essas lesões, que ocorrem em níveis funcionais e estruturais, podem ser responsáveis pelos déficits de aprendizado e

memória, que se manifestam de forma mais ou menos intensa no alcoolismo crônico. Quase 10% dos alcoólatras crônicos sofrem de disfunções cognitivas moderadas a graves, variando de amnésia a demência. A natureza da amnésia, retrógrada e/ou anterógrada, ainda é obscura. Estes pacientes também tendem a perseverar quando confrontados com mudanças nas exigências da tarefa (MCCORMICK *et al.*, 2011). Modelos animais têm sido usados para estudar tanto as disfunções comportamentais quanto neurais que ocorrem na WKS (SAVAGE, LISA M.; HALL; RESENDE, 2012). A contribuição relativa da neurotoxicidade do etanol e da DT para o desenvolvimento de alterações comportamentais e danos cerebrais ainda não foi esclarecida, principalmente em relação aos efeitos sobre componentes envolvidos na morte celular.

Sabe-se que a DT, associada ou não ao consumo de etanol, pode resultar em consequências importantes, principalmente para o SNC. Por exemplo, existem evidências de que a DT induz estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático (ER) no cérebro, o que resulta em neurodegeneração. O estresse oxidativo e o estresse do RE podem mutualmente se regularem, ativando o processo de autofagia (mecanismo descrito acima). A autofagia é ativada em resposta à neurotoxicidade induzida por insultos, tais como DT, funcionando como um mecanismo compensatório para aliviar o estresse oxidativo e o estresse do RE e oferecendo, assim, um tipo de proteção contra a neurodegeneração (LIU; KE; LUO, 2017). No cérebro, a DT causa uma cascata de eventos, incluindo um comprometimento do metabolismo oxidativo, neuroinflamação e consequente neurodegeneração.

Metabolismo da tiamina

A tiamina possui característica de solubilidade em água, e em humanos existe em quatro formas: tiamina não fosforilada, tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato (TDP ou TPP) e tiamina trifosfato (TTP) (BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, 2009; LONSDALE, 2006). A tiamina desempenha um papel essencial para a vida e saúde dos seres humanos, uma vez que os derivados da tiamina e as enzimas dependentes desta vitamina desempenham um papel fundamental no metabolismo celular (BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, 2009; CROSBY; STONE; LIENHARD, 1970; HOLZER *et al.*, 1962; KRAMPITZ; SUZUKI; GREULL, 1962; NAKADA; SUND, 1958).

A tiamina possui papel como coenzima em reações do metabolismo, como nas reações catalisadas pelos complexos enzimáticos piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase. Na sua forma fosforilada, tiamina difosfato (TPP ou TDP), atua como coenzima ligada aos complexos, com função de auxiliar o processo de descarboxilação dos substratos catalisados (KOIKE; KOIKE, 1976; YEAMAN, 1989). Ainda possui papel nas reações catalisadas pelas transcetolases, na via do ciclo das pentoses fosfato (BRESLOW, 1958; LINDQVIST; SCHNEIDER, 1993). Sendo assim, dependendo do grau da deficiência, essa pode levar a um aumento da concentração de lactato, resultando em queda do pH celular; diminuição do aporte energético da célula pela falta de acetil-CoA e agentes redutores, como as coenzimas nicotinamida adenina de nucleotídeo (NADH) e flavina adenina de nucleotídeo (FADH₂). (JANKOWSKA-KULAWY *et al.*, 2010; PANNUNZIO *et al.*, 2000; SECHI; SERRA, 2007). Portanto, modificações nos níveis de tiamina e suas formas fosforiladas são importantes na sobrevivência da célula, visto que reações que produzem energia a partir de substrato energético, como os carboidratos e lipídios, são comprometidas. No entanto, dados

neuropatológicos mostram que, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (roedores), a intensidade dos danos induzidos pela deficiência de tiamina no encéfalo depende da região (BUTTERWORTH, 2003; JHALA; HAZELL, 2011; KRIL, JILLIAN J.; HARPER, 2012; YAHIA *et al.*, 2015; ZHR *et al.*, 2014).

Tendo em vista o metabolismo desta vitamina, sabe-se que a tiamina atravessa a barreira hematoencefálica por meio de moléculas transportadoras bidirecionais (SLCs - *solute carriers*), presentes em mamíferos, sendo mais especificamente em roedores a Tiamina transportadora-1 (Slc19a2)(CAMPOS-BEDOLLA; WALTER; VESZELKA, 2014; DAHLIN *et al.*, 2009; LOCKMAN; MUMPER; ALLEN, 2003). Dentro da célula, p. ex. neurônio, a tiamina sofre ação da enzima tiamina pirofosfocinase, sendo acrescida do grupo pirofosfato, pelo gasto de um ATP, resultando na tiamina difosfato (TDP) ou tiamina pirofosfato que possui papel de coenzima no metabolismo energético, já citado acima. No entanto o metabolismo da tiamina envolve outras enzimas e outras formas fosforiladas (BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, 2009; BUTTERWORTH, 2003). A própria TDP pode sofrer nova fosforilação e transformar em tiamina trifosfato (TTP) por meio da enzima TDP fosfotransferase ou simplesmente conhecida como TDPcinase, por meio da reação $TDP + ATP \rightarrow TTP + ADP$ (BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, 2009). Num mecanismo muito semelhante à síntese do ATP, por meio do acoplamento com a cadeia respiratória realizado na membrana da mitocôndria, GANGOLF *et al.*, 2010 observaram o processo de fosforilação da forma TDP e consequente síntese da tiamina trifosfato. Outra maneira, mesmo que não tão clara, se dá pela enzima adenilato cinase 1 (EC 2.7.4.3) também conhecida como ADK ou miocinase que auxilia a transferência de fosfato entre nucleotídeos, de acordo com a reação $TDP + ADP \rightarrow TTP + AMP$, sintetizando o TTP (GIGLIOBIANCO *et al.*, 2008; MAKARCHIKOV *et al.*, 2002; MIYOSHI *et al.*, 1990).

Já a degradação ou desfosforilação da forma fosforilada TTP pode acontecer tanto pela enzima solúvel de aproximadamente 25 kDa, Tiamina trifosfatase - TTPase (EC 3.6.1.28), localizada no citosol, ou pela enzima fixa à membrana mitocondrial (CHANAS *et al.*, 2004; GIGLIOBIANCO *et al.*, 2013; HASHITANI; COOPER, 1972). A enzima, TTPase solúvel, primeiramente purificada em cérebro bovino, possui atividade ótima em pH alcalino (aproximadamente pH=9,0) e é modulada por cátions bivalentes, sendo mais ativada por íons Mg^{2+} e inibida por íons Ca^{2+} (BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, 2009; HASHITANI; COOPER, 1972; MAKARCHIKOV; CHERNIKEVICH, 1992). Por outro lado a enzima fixa à membrana possui algumas características diferentes em comparação com a isoforma solúvel, como atividade ótima em pH neutro, podendo ser ativada tanto por íons cálcio como magnésio, dentre outros, como manganês, possuindo efeito inibitório principalmente pelos íons nitrato (NO_3^-) (BETTENDORFF, LUCIEN; WINS; SCHOFFENIELS, 1988; MATSUDA *et al.*, 1991).

A relação entre a síntese e degradação da forma TTP resulta em uma concentração muito pequena dessa forma fosforilada na célula. Isto levanta algumas questões, na discussão do real papel da tiamina e de suas formas fosforiladas, como a possibilidade de funções neurofisiológicas, distintas da atividade como coenzima (COOPER; PINCUS, 1979; HOUZEN; KANNO, 1998). Em especial, observamos o efeito ativador, da forma TTP, sobre canais de cloreto em células de neuroblastoma (BETTENDORFF; KOLB; SCHOFFENIELS, 1993; BETTENDORFF, L. *et al.*, 1993; BETTENDORFF, L *et al.*, 1993; BETTENDORFF, LUCIEN, 1994).

Em outra parte da via, também podemos observar que a forma fosforilada, TDP, pode sofrer degradação pela tiamina difosfatase gerando a forma fosforilada TMP (Tiamina monofosfato). Esta pode atravessar a membrana do neurônio, sendo capturada

pelos astrócitos circunvizinhos a esta região. Dentro do astrócito é desfosforilada pela tiamina monofosfatase, retornando a forma original tiamina. Caso seja necessário a tiamina pode ser eliminada pelo astrócito, sendo capturada pelo neurônio (BUTTERWORTH, 2003) (**Figura 7**).

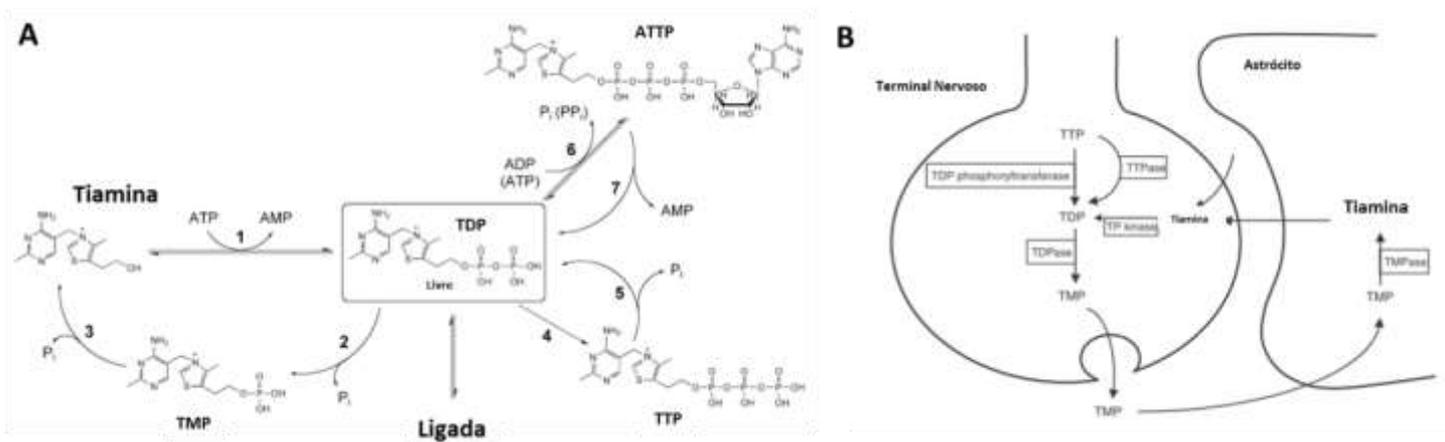


Figura 7: Esquema indicando as interconversões enzimáticas da tiamina e seus derivados em células de mamíferos, de acordo com os autores BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, (2009) e BUTTERWORTH, (2003)

(A) Principais vias metabólicas de interconversões da tiamina e suas formas fosforiladas. TMP (Tiamina monofosfato); TDP (Tiamina difosfato ou pirofosfato); TTP (Tiamina trifosfato); ATTP (Adenosina tiamina trifosfato). Os números correspondem as enzimas: 1 – Tiamina pirofosfocinase; 2 – Tiamina difosfatase; 3 – Tiamina monofosfatase; 4 – Tiamina trifosfato sintase; 5 – Tiamina trifosfatase associada a membrana ou isoforma solúvel; 6 – Tiamina difosfato-adenili- transferase; 7 – Adenosina tiamina trifosfato hidrolase. (B) Tráfico de tiamina e formas fosforiladas entre um terminal nervoso e um astrócito.

Modelos experimentais de deficiência de tiamina e consumo crônico de etanol

Sabemos que a utilidade de um determinado modelo é melhor compreendida no contexto da pergunta que está sendo feita. No presente estudo, propusemos avaliar os

efeitos da DT, associada ou não ao consumo de etanol, sobre componentes moleculares que possuem um papel direto no mecanismo de morte celular; e os efeitos da DT em aspectos específicos de processos cognitivos espaciais. A morte neuronal é a principal característica patológica da neurodegeneração, como nas doenças de Alzheimer (AD), Parkinson (DP), Huntington (DH) e Síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK). Os processos neurodegenerativos possuem etiologia diversa, mas apresentam elementos comuns, reconhecidos como importantes nas etapas finais (p.e., estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e agregação proteica desordenada) e convergentes na cascata que culmina com a morte neuronal, (LIU; KE; LUO, 2017).

O modelo de deficiência experimental de tiamina (DT) associado ou não ao consumo de etanol tem sido reconhecido como um instrumento importante para se estudar as bases moleculares da **morte neuronal** e suas consequências para o sistema nervoso central, como atividades de circuitos neuroquímicos e aspectos específicos de disfunções cognitivas, afim de uma possível forma de reversão e proteção. Assim é possível avaliar déficits nos processos de aprendizagem e memória espacial, visto que resultam em disfunções cognitivas associadas a perdas de conexões sinápticas gerados por processos de morte celular (RESENDE, 2012; BUENO *et al.*, 2015). Um fato interessante é que a deficiência sistêmica de tiamina induz morte neuronal de forma dependente da região cerebral (KE; GIBSON, 2004). Esta observação indica que a susceptibilidade de diferentes áreas cerebrais a esse tipo de insulto é diferente. As regiões do tálamo, corpos mamilares e cerebelo são mais acometidos pela morte neuronal (BAKER *et al.*, 1999; KE; GIBSON, 2004; MULHOLLAND, 2006; YAHIA *et al.*, 2015). Por outro lado, outras regiões como hipocampo e neocórtex são acometidas apenas no nível de disfunções bioquímicas, não associadas a lesões morfológicas (HAZELL, 2009; HIRSCH; PARROTT, 2012; JHALA; HAZELL, 2011).

O uso abusivo de álcool também pode causar danos profundos no cérebro em desenvolvimento e maduro, uma vez que existe uma vulnerabilidade dos neurônios aos efeitos do álcool (AKBAR *et al.*, 2018; GIRARD *et al.*, 2011; HARPER, 2009b; JANG *et al.*, 2002; KRIL, J J *et al.*, 2006; OSCAR-BERMAN; MARINKOVIC, 2014; PASCAL; CEDEX, 1997; WARD; WITTE, 2009). Já foi observada redução significativa de sinapses em ratos tratados com etanol e a recuperação após 20 semanas sem álcool. ANDERSEN, 2004 também mostrou redução de 21% na densidade de células de Purkinje e de células granulares em alcoólatras, em comparação aos indivíduos controle. Existem também dados de perda neuronal em regiões específicas (córtex cerebral, hipotálamo e cerebelo) em alcoólatras (HARPER; MATSUMOTO, 1997; JOHNSEN-SORIANO *et al.*, 2003; PENTNEY *et al.*, 2002). No modelo experimental, ratos que consumiram etanol apresentaram uma possível proteção através de vias de ativação do fator NFkB. É interessante observar que possíveis danos cerebrais causados pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) em animais sob exposição crônica ao etanol podem levar a distúrbios patológicos (BONTHIUS *et al.*, 2008).

Ao longo dos últimos anos, a equipe do Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular – (LANEC) da UFMG tem utilizado como modelo de neurodegeneração roedores deficientes em tiamina, sendo essa deficiência associada ou não ao consumo de etanol, para avaliar as relações entre processos neurobiológicos e aspectos cognitivos. Existem estudos, do nosso grupo (NUNES; GÓMEZ-MENDOZA; *et al.*, 2018; NUNES; VEDDER; *et al.*, 2018a; SENA, 2019) e de outros autores (BOBAL; SAVAGE, 2015; SAVAGE, L. M., 2003; SAVAGE, LISA M.; HALL; RESENDE, 2012; SAVAGE, LISA M; HALL; VETRENO, 2011), que identificam

várias alterações moleculares em diferentes regiões cerebrais dos sujeitos submetidos à DT.

Até o presente momento, as bases neurobiológicas e a sequência de eventos moleculares associadas aos déficits neurofisiológicos e comportamentais induzidos pela DT associados ao consumo de etanol continuam pouco compreendidos. Sabe-se que os efeitos da DT podem levar a disfunções que geram alterações nas concentrações intracelulares de cálcio, e essas alterações podem estar relacionadas à morte celular que constitui o processo de neurodegeneração induzido pela deficiência desta vitamina. (JHALA; HAZELL, 2011; OSIEZAGHA *et al.*, 2013; SOLÁ, S *et al.*, 2001; ZIPFEL *et al.*, 2000).

Nosso grupo também observou efeito da DT em canais aniônicos dependentes de voltagem (VDAC=*voltage-dependent anion channel*) encontrados na membrana da mitocôndria possivelmente envolvidos no transporte de citocromo C, componente de uma das vias de apoptose, através da membrana mitocondrial (ANDREYEV; FISKUM, 1999; BATHORI. *et al.*, 2006; BUENO, K.O. *et al.*, 2015; RAPIZZI *et al.*, 2002), ou ainda efeito sobre as propriedades eletrofisiológicas das correntes de K⁺ em neurônios granulares do cerebelo, que diminuíram a densidade de corrente medida nos animais tratados com depleção de tiamina (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Outros estudos, realizados pelo nosso grupo (PEREIRA *et al.*, 1998; PIRES *et al.*, 2005) e por outros autores (BOBAL; SAVAGE, 2015; PEPEU; GRAZIA GIOVANNINI, 2017), também mostraram a relação entre os efeitos da DT sobre parâmetros colinérgicos e aspectos comportamentais, de forma dependente da região cerebral. Pacientes portadores de doenças neurodegenerativas apresentam, nas fases iniciais do processo, déficits cognitivos espaciais e também perdas de funções

colinérgicas (HAMPEL *et al.*, 2011; LANGLAIS; ZHANG; SAVAGE, 1996; THIES; BLEILER, 2011). O entendimento dos mecanismos moleculares relacionados a esses fenômenos comportamentais e neurobiológicos pode contribuir de forma importante para a compreensão da evolução do processo neurodegenerativo, através da detecção de novos potenciais alvos moleculares envolvidos com a viabilidade neuronal dependente da tiamina e suas formas fosforiladas.

Esses dados levaram-nos a um questionamento: **considerando que um estado de deficiência de tiamina (DT), tanto em humanos como em roedores, de forma sistêmica atinge todas as regiões do SNC, que são aeróbicas, por que a susceptibilidade aos efeitos da deficiência é diferente entre as regiões?** Uma das hipóteses levantadas, baseada em dados obtidos pelo nosso grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e por outros autores (BETTENDORFF *et al.*, 1993) é que a tiamina e/ou seus derivados fosforilados tem efeitos específicos em células excitáveis (dos sistemas muscular e nervoso), como p.ex. modulação de canais iônicos (BETTENDORFF, L. *et al.*, 1993; BETTENDORFF, LUCIEN, 1994; BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, 2009; COOPER; PINCUS, 1979; HIRSCH; PARROTT, 2012; HOUZEN; KANNO, 1998). Sendo assim, levantamos a hipótese geral de que a tiamina e suas formas fosforiladas não se restringem apenas à função de coenzimas importantes no metabolismo energético (JHALA; HAZELL, 2011), mas também desempenham **papel em funções relacionadas à manutenção da viabilidade celular**, que são dependentes do tipo de região cerebral. Assim, os efeitos da deficiência dessa vitamina poderiam levar a alterações em componentes moleculares que modulam os níveis intracelulares de cálcio e/ou atividades de caspases, e esses efeitos seriam diferentes dependendo da região cerebral. E como consequência essas alterações poderiam gerar efeitos como os déficits cognitivos frequentemente observados no caso de deficiência crônica de tiamina.

Dados que podem sustentar essa diferença de viabilidade celular se relacionam ao processo de excitotoxicidade. Este é um processo patológico pelo qual o estímulo excessivo de neurotransmissores como o glutamato provoca danos ou morte celulares. Tal processo se dá pela ação em receptores para o neurotransmissor glutamato, tais como o receptor NMDA, AMPA e kainatos. Como citado anteriormente, a ativação destes receptores pode elevar os níveis de cálcio intracelular. Sabe-se que na DT os níveis de glutamato se mostram alterados, aumentado no meio extracelular pela deficiência na captação, sugerindo um maior estímulo tanto para os receptores AMPA como NMDA (HAZELL, 2009; HAZELL *et al.*, 2001). Além disso a DT afeta a expressão da subunidade GluR2, que juntamente com outras subunidades (GluR1, GluR3 e GluR4) fazem parte da estrutura tetrâmica dos receptores AMPA (DINGLELINE *et al.*, 1999). A subunidade GluR2 possui diferentemente das demais um sítio de edição (Q/R) que pela ação da enzima de edição do RNA (ADAR2 - *Adenosine deaminases acting on RNA*) substitui uma adenosina por uma inosina e consequentemente na transdução a substituição da glutamina pela arginina. Como resultado da ação desta enzima de edição há o impedimento da passagem de cálcio pelo receptor AMPA. Segundo dados observados por LEE *et al.*, 2010, a DT baixa a expressão desta enzima de edição, facilitando o influxo de íon cálcio pelo receptor AMPA.

Além disso, em modelos de deficiência experimental de tiamina (DT) em ratos, tem se observado em neurônios granulares cerebelares aumento dos níveis proteicos do componente CaV1.2, um VGCC (*Voltage-gated calcium channel*) do tipo L, e aumento de densidade de corrente (MOREIRA-LOBO *et al.*, 2016). Esse tipo de canal regula as concentrações do cálcio intracelular, como p. ex. através do influxo desse íon em

decorrência de uma alteração do potencial de membrana (BERGER; BARTSCH, 2014; CSERNE SZAPPANOS; VIOLA; HOOL, 2017).

O influxo deste íon (cálcio) nas células ativa certas enzimas, incluindo fosfolipases, endonucleases e proteases tais como calpaína. Estas enzimas passam a danificar estruturas celulares tais como componentes do citoesqueleto, membrana e DNA. Também ativam proteases que clivam a pró-caspase-9 em caspase-9, desencadeando a cascata apoptótica (MOMENI, 2011; WU *et al.*, 2006). Esses canais podem funcionar como uma fonte alternativa ao papel dos canais do tipo NMDA, que também aumentam o fluxo de cálcio através da membrana plasmática (BANO *et al.*, 2007; FUJIKAWA, 2015), já citados anteriormente.

Sabe-se o papel fundamental dos canais iônicos, em especial os responsáveis pela homeostase celular do íon cálcio, em diferentes processos celulares e, portanto, na viabilidade celular. Além disto, o influxo de cálcio para o meio intracelular poderia ativar e aumentar a expressão de fatores transcricionais, como p. ex. a proteína CREB (*cAMP response element-binding protein*). Esses fatores possuem papel pleiotrópico no sistema nervoso central (PINTO, M C *et al.*, 2015; TAO *et al.*, 1998). A expressão e a ativação de canais de cálcio voltagem-dependente do tipo L aumenta o influxo de cálcio para o citosol possibilitando a desfosforilação de um coativador e regulador de circuitos neuronais CRT1 (*CREB-regulated transcription coactivator*) pela ação da calcineurina, uma proteína fosfatase dependente de cálcio e calmodulina. CRT1 desfosforilada é translocada para o núcleo promovendo em conjunto com a CREB fosforilada a expressão de genes que transcrevem proteínas como o fator neurotrófico, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), (TAO *et al.*, 1998). Corroborando essa relação entre nível de cálcio e modulação da expressão de BDNF, destacamos os achados de YAN *et al.*, 2016 que mostraram que um aumento do íon cálcio no meio intracelular,

através de estimulação elétrica, também aumenta a expressão de BDNF. Esse efeito foi dependente da ativação da proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II (CaMKIIA), que possui papel na fosforilação de CREB (YAN *et al.*, 2016). Sabe-se que na deficiência de tiamina associada ou não ao consumo de etanol o BDNF está relacionado à proteção neuronal. Segundo VEDDER & SAVAGE, 2017, a aplicação exógena de BDNF pode reverter os efeitos da DT sobre funções cognitivas, como por exemplo os déficits nos processos de aprendizagem e memória espacial. SENA, 2019 mostrou em camundongos treinados em teste comportamental adaptado de BARNES, 1979 aumento dos níveis de BDNF em direção aos níveis dos animais controle, juntamente com melhora no desempenho durante o treino. Esses dados reforçam ainda mais as evidências de que o BDNF é importante para modular a plasticidade e adaptação neural dentro do circuito hipocampo-diencefalo (TSANOV *et al.*, 2011).

Todos esses dados sustentam nossa hipótese de que a DT poderia levar a alterações em componentes moleculares que modulam as concentrações intracelulares de cálcio, e conseqüentemente ao processo de morte neuronal, e esses efeitos seriam diferentes dependendo da região cerebral.

3. HIPÓTESES ESPECIFICAS

- 3.1. Os níveis de tiamina e suas formas fosforiladas são afetados de forma diferente (i) ao longo da evolução de um processo induzido pela deficiência de tiamina, ou seja, quando se compara as fases: durante e final de um episódio de DT e após período de recuperação e (ii) dependente da região do SNC (CPF, H e T).*
- 3.2. A deficiência de tiamina induz déficits cognitivos em aprendizado e memória espacial operacional e alterações em componentes envolvidos em processos de morte celular (atividade de caspases e níveis de cálcio);*
- 3.3. Animais deficientes em tiamina e submetidos a uma experiência cognitiva apresentam alterações na expressão de genes envolvidos no processo de morte neuronal;*
- 3.4. A deficiência de tiamina associada ou não ao consumo crônico de etanol altera a expressão de genes envolvidos no processo de morte neuronal.*

4. OBJETIVOS

Geral

Estudar os impactos da DT e/ou do consumo de etanol sobre parâmetros relacionados à morte neuronal, em estágios diferentes do processo, em três regiões do cérebro de ratos e os efeitos da DT sobre aspectos cognitivos espaciais.

Específicos

No tálamo, hipocampo e CPF de ratos adultos, submetidos à DT, avaliar:

- 4.1. O desempenho cognitivo em tarefas de navegação espacial, aprendizado e memória operacional e de referencia;
- 4.2. Níveis de Tiamina e seus intermediários fosforilados (Tiamina Monofosfato – TMP, Tiamina Difosfato – TDP ou TPP e Tiamina Trifosfato – TTP);
- 4.3. Níveis de cálcio livre;
- 4.4. Atividades de caspases canônicas (3/7, 8 e 9);
- 4.5. Viabilidade celular pela marcação de fluoróforo calceína-AM e iodeto de propídio (IP) e atividade de desidrogenases mitocondriais (MTT).

Além disto, avaliar os efeitos da DT, associada ou não ao consumo de etanol, sobre:

- 4.6. A expressão de genes codificadores de caspases (*CASP*s), receptores (*AMPA*), canal de cálcio (*CACNA1C*), intermediários de processos fisiológicos celulares (*AKT1*, *MAPK8*, *NFκβ*) e fator neurotrófico (*BDNF*).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram executados utilizando métodos comportamentais da psicologia experimental e neurobiológicos (histológico e bioquímico), conforme detalhados abaixo. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o número: 288/2016 e pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Universidade Estadual de Nova York (Universidade de Binghamton), em Binghamton, e conduzidos de acordo com o Guia dos Institutos Nacionais de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011). A cópia do certificado, CEUA/UFMG se encontra no Anexo do presente exemplar.

Aclimação dos animais e Etapas que antecederam o início dos experimentos

Durante o período de aclimação, os animais (ratos machos, das linhagens *Wistar* ou *Sprague Dawley*, dependendo do experimento) foram mantidos em gaiolas de plásticos (polipropileno ou acrílico), com 2 a 3 ratos cada, dispostas sobre prateleiras em uma estante de aço inoxidável, mantidas em ciclo de claro e escuro, 12:12 h, e temperatura média de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Durante esta etapa, de aproximadamente uma semana, os animais foram tratados com água e ração comercial *ad libitum*. Como critério de inclusão dos animais nos experimentos, utilizamos os parâmetros de peso médio igual a 250 g e/ou 8 semanas de vida, considerados animais jovens, segundo MENEZES; NEVES; FILHO, 2013.

Durante a execução dos experimentos, os ratos *Wistar* foram mantidos em gaiolas individuais e os ratos *Sprague Dawley* mantidos dois por gaiola, contendo blocos de mastigação e materiais de nidificação. O tamanho da amostra, informado abaixo, variou dependendo do tipo de experimento. Todos os animais foram monitorados com frequência, principalmente nos últimos dias do episódio de DT. Sendo que, devido a diferenças no protocolo dos experimentos, os animais foram examinados (manipulação) em intervalos de uma hora ou de quatro horas. O peso dos animais dos experimentos (II, III e IV) foi registrado diariamente durante o episódio DT e em intervalos de 2-3 dias nos demais períodos. Os dados foram expressos em média +/- SEM. A variação de peso dos animais dos experimentos I, V e VI não estão sendo apresentados.

Modelos e Desenho Experimentais

O presente estudo foi constituído de 6 experimentos independentes (denominados Exps. de I a VI). Nos experimentos I, II e III utilizamos ratos *Wistar*, enquanto nos experimentos IV, V e VI foram utilizados ratos da linhagem *Sprague Dawley*. Os experimentos foram organizados em dois protocolos: **A-** com uma variável independente = um episódio de DT e **B-** duas variáveis independentes = um episódio de DT associado com consumo crônico de etanol (**Tabela I**). Amostras biológicas do córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e tálamo foram coletada, de acordo com cada experimento, nos tempos: **T1** = ~ 10 dias de tratamento; **T2** = Último dia de tratamento; **T3** = 1 dia de recuperação, **T4** = 3 semanas de recuperação, **T5** = 4 semanas de recuperação e **T6** = 4 semanas de recuperação e LAM. Vale ressaltar que os tempos dos experimentos com consumo de etanol seguiram números de dias diferentes, mesmo

sendo adotado o critério acima citado. Neste caso foram marcados com um apostolo (‘) após a numeração do tempo. Detalhes de dias de tratamento vide delineamento experimentais.

Tabela I: Resumo geral dos protocolos experimentais dos tratamentos com DT associada ou não ao consumo de etanol

	Experimentos	Variáveis Independentes	Grupos Experimentais	Amostras Biológicas	* Tempos da coleta	Variáveis Dependentes	Figuras / Tabelas
Delineamento A	I	Deficiência de Tiamina	C (n=8) DT (n=8)	CPF, Hipocampo, Tálamo	T2	T, TMP, TDP e TTP [Ca ₂₊]	Tabela IV Figura 28
	II		C (n=12) CP (n=8) DT (n=12)		T6	T, TMP, TDP e TTP [Ca ₂₊] MTT IP Ativ. CASP3, CASP8, CASP9	Tabela IV Figura 28 Figura 30 Fig.31/32/33 Figura 29
	III		CP (n=18) DT (n=18)		T1 T2 T6	T, TMP, TDP e TTP [Ca ₂₊] MTT IP Ativ. CASP3, CASP8, CASP9	Tabela IV Figura 28 Figura 30 Fig. 31/32/33 Figura 29
	IV		CP (n=8) DT (n=12) CP-LAM (n=8) DT-LAM (n=12)		T5 T6	Genes: CASP3 CASP8 CASP9 AKT1 MAPK8 AMPA1 CACNA1C NFKB1 BDNF	Figura 34
Delineamento B	V	Deficiência de Tiamina associado ao consumo crônico de etanol	CP (n=10) ET (n=10) ET-DT (n=10) DT (n=10)	CPF, Hipocampo, Tálamo	T1'	CASP3 CASP8 CASP9 AKT1 MAPK8 AMPA1 CACNA1C NFKB1 BDNF	Figura 35 Figura 36 Figura 37 Figura 38
	VI		CP (n=24) ET (n=8) ET-T (n=8) ET-DT (n=8) DT-1h (n=8) DT-4h (n=8)		T2' T3' T4'		

Legenda: Delineamentos A: Exp I, II, III e IV=modelo experimental DT

Delineamentos B: Exp V e VI=modelo experimental DT associado ao consumo crônico de etanol

Grupos experimentais, divididos de acordo com o tipo de dieta:

- C = Controle → Dieta deficiente em tiamina associada com injeções de tiamina (i.p.) diárias (0,4 mg/kg)
- CP = Controle Pareado → Dieta deficiente em tiamina em quantidade pareada ao consumido pelo grupo DT no dia anterior, associada com injeções de tiamina.
- DT → Dieta deficiente em tiamina associada com injeções de pirritiamina (i.p.) diárias (0,25 mg/kg), reversão do episódio de DT correspondentes a 1h ou 4h após o aparecimento dos sinais neurológicos.
- ET = Dieta comercial padrão controle associada ao consumo crônico de etanol
- ET-DT = Dieta igual a dos animais DT, associada ao consumo crônico de etanol.
- ET-T = Dieta igual a dos animais do grupo ET com suplementação de Tiamina;

Protocolo DT

- T1 = 10º dias do episódio de DT
- T2 = Último dia do episódio de DT
- T5 = após 4 semanas de recuperação
- T6 = após 4 semanas de recuperação + LAM

Protocolo DT associado ao consumo crônico de etanol

- T1' = 10 dias de tratamento;
- T2' = Último dia de tratamento
- T3' = 1 dia de recuperação
- T4' = 3 semanas de recuperação

- Entre parênteses: tamanho da amostra. Os tempos indicados com linha (') se referem ao tempo da coleta da amostra nos experimentos do delineamento B.

Deficiência de tiamina induzida por piritiamina

Nos protocolos experimentais (Exps. I, II e III) com uma variável independente (DT), ratos *Wistar* machos, provenientes do biotério central da UFMG, foram divididos, aleatoriamente, de acordo com as condições de tratamento. Durante o episódio de DT, todos os animais receberam ração deficiente em tiamina, sendo que os animais dos grupos controles (C e CP) receberam injeções intraperitoneais (i.p) de tiamina (0,4 mg/kg – Sigma-Aldrich), enquanto os animais do grupo DT receberam injeções i.p. diárias de piritiamina (0,25 mg/kg – Sigma-Aldrich). Os animais dos experimentos I, II e III, realizados no Brasil, receberam ração sem tiamina preparada no Laboratório de Neurociência Molecular e Comportamental – LANEK-UFMG, contendo os nutrientes conforme apresentado no **ANEXO – 13.2, tabelas I, II e III**, enquanto os animais dos experimentos IV, V e VI, realizados nos Estados Unidos, foram tratados com ração comercial sem tiamina (Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, IN) **ANEXO – 13.3**. A diferença entre o grupo controle e controle pareado foi que o primeiro recebeu ração deficiente em tiamina *ad libitum*, enquanto o segundo recebeu quantidade pareada ao consumo dos animais do grupo DT (mesma quantidade consumida no dia anterior). A única diferença entre os animais controles (C, CP) e os animais DT é a presença ou não de tiamina.

As amostras biológicas foram coletadas em estágios clínicos diferentes: I – Intermediário e II – grave. Estágio I correspondendo ao 10^o dia do episódio de DT e estágio II correspondendo a aproximadamente 14 dias de DT, ou seja, último dia do episódio de deficiência. No estágio **grave** (14 dias de deficiência), o tratamento foi interrompido após 1h ou 4h após o aparecimento dos sinais neurológicos da deficiência (perda de reflexo de endireitamento e convulsão), seguindo protocolos descritos por

descritos por VEDDER *et al.* (2015). Os grupos DT de ratos no estágio grave foram denominados: DT-1h e DT-4h.

Amostras de três regiões cerebrais (CPF, hipocampo e tálamo) foram dissecadas dos hemisférios direito ou esquerdo, selecionados de forma aleatória. Algumas amostras foram submetidas imediatamente a teste com sondas fluorescentes, outras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a -71°C, até o momento das análises bioquímicas (Dosagens dos níveis de cálcio e tiamina e suas formas fosforiladas, atividade catalítica das caspases 3, 8 e 9 e testes de viabilidade celular: MTT e Iodeto de Propídio (IP)). As descrições dos métodos referentes a esses ensaios bioquímicos se encontram abaixo. No caso das dosagens de tiamina e seus derivados, as análises bioquímicas, detalhadas abaixo, foram realizadas no prazo de no máximo 20 dias e os ensaios das demais variáveis foram executados em até 6 meses.

Dependendo do desenho experimental (**Figura 8**), os animais dos grupos submetidos à DT (Experimentos I, II, III e IV), alguns animais foram decapitados nos tempos T1 e T2. Para os animais que continuaram sendo mantidos no experimento por um período de recuperação, em condições controle, antes de serem decapitados, o episódio de DT foi interrompido com injeções de tiamina, conforme descrito a seguir. Os animais receberam duas injeções i.p. de tiamina (100 mg/kg – Sigma-Aldrich), sendo a primeira aplicada após 4 horas do aparecimento de sinais neurológicos da deficiência (~ 14 dias) e a segunda 24 horas após a primeira injeção. Durante essas 24 horas, entre a 1^a e 2^a injeção, os animais permaneceram separados (2-3 ratos/gaiola) e tratados com ração comercial umedecida, para facilitar a mastigação. Após a segunda injeção, os animais foram mantidos em período de recuperação com ração comercial seca e água *ad libitum*, em gaiolas de polipropileno (22x30x40 cm³), com 2 a 3 ratos cada. Dependendo do protocolo experimental, após período de recuperação os animais

foram submetidos ou não à avaliação comportamental antes de serem mortos por decapitação.

No experimento IV, após período de recuperação os animais dos grupos CP e DT foram mantidos parte sem exposição ao LAM, enquanto os demais animais foram submetidos à avaliação comportamental no LAM.

Um dia após o último dia do teste comportamental todos os ratos foram mortos por decapitação. Como mencionado anteriormente, os tecidos foram dissecados e separados para análises histopatológicas e bioquímicas. As estruturas dissecadas dos animais dos grupos do experimento IV foram divididas em hemisférios direito e esquerdo, separadas em frascos (posteriormente usadas de forma aleatória) e congeladas em gelo seco e armazenadas em ultrafreezer a -71°C até o momento das análises de qPCR (descrito abaixo). O processamento das amostras e os ensaios foram realizados no prazo máximo de 30 dias.

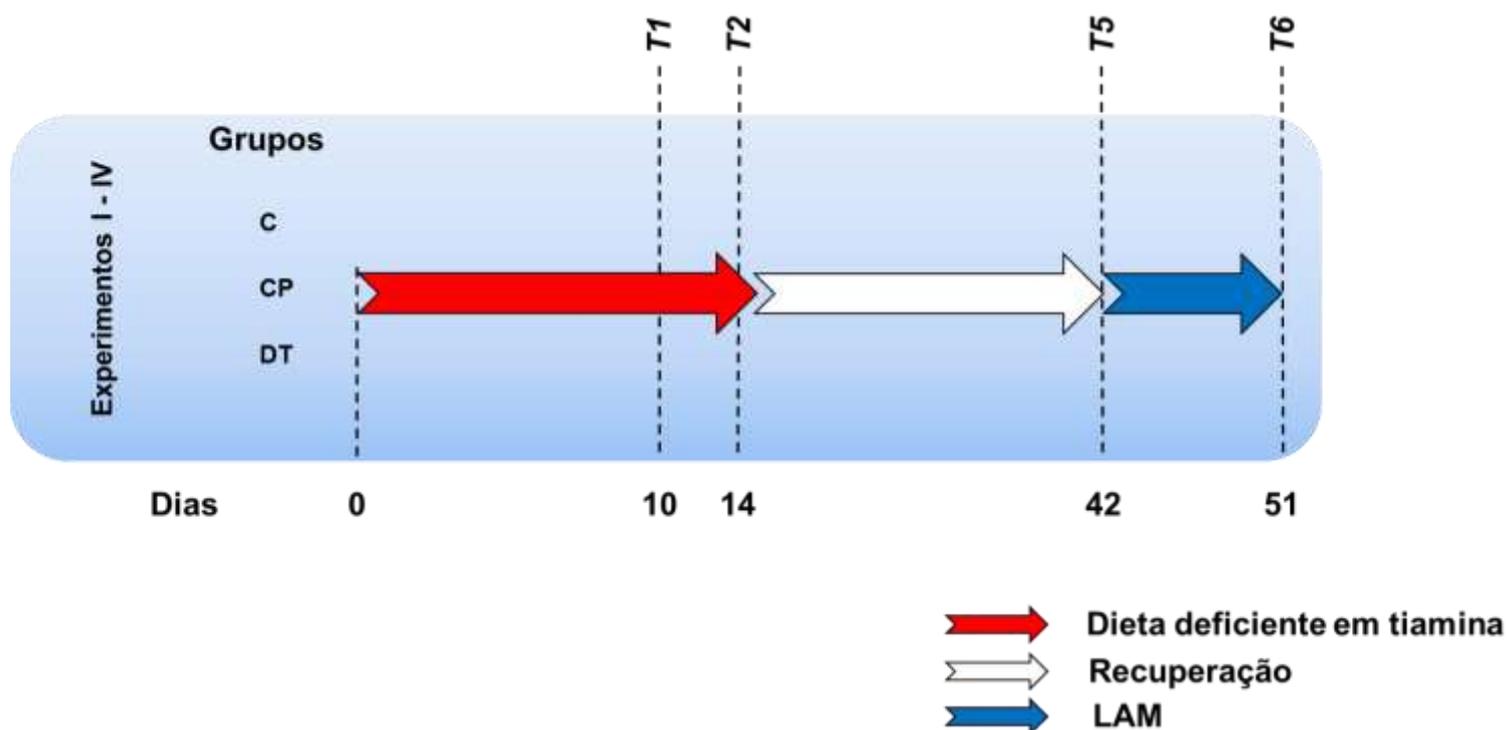


Figura 8: Desenho Experimental dos Experimentos (I–IV) com DT

Esboço geral das etapas comuns dos experimentos I - IV, indicando o cronograma dos tratamentos e os grupos experimentais. Os animais foram divididos em, C (Controle), CP (controle pareado) e DT. As amostras biológicas foram coletadas nos tempos T1, T2, T5 e T6.

Deficiência de tiamina induzida por pirritiamina, associada ao consumo crônico de etanol

Nos protocolos experimentais (Exps. V e VI) (**Figura 9**) com duas variáveis independentes (DT e/ou consumo crônico de etanol), ratos *Sprague Dawley* machos (Envigo, Frederick, MD) foram divididos, aleatoriamente, de acordo com as seguintes condições de tratamento: controle pareado (CP), consumo crônico de etanol (ET), consumo crônico de etanol associado à DT (ET-DT), consumo crônico de etanol com suplementação de tiamina (ET-T), ração deficiente em tiamina associada a injeções i.p. de pirritiamina (DT). Os animais dos grupos ET, ET-T e ET-DT receberam etanol como

única fonte de líquido, sendo que inicialmente a administração de etanol foi gradativa, aumentando-se progressivamente a concentração do etanol em água potável, de 5 em 5 dias, de 6% para 9%, 12% e, finalmente 20 %, o qual foi mantido por 30 dias (Experimento V) e 6 meses (Experimento VI), seguindo protocolo descrito por outros autores (ALOE; TIRASSA, 1992; CADETE-LEITE et al., 2003; CICCIA; LANGLAIS, 2000). Durante o tratamento com etanol, com exceção do período relativo à DT, os ratos tiveram livre acesso a ração comercial padrão (Purina - LabDiet, St. Louis, MO). Os ratos do grupo controle tiveram acesso livre a água e ração padrão durante período correspondente, enquanto os animais do grupo ET receberam etanol.

As amostras utilizadas para os experimentos V e VI foram proveniente de estudos anteriormente realizados no laboratório coordenado pela professora Savage e, portanto, o desenvolvimento do modelo de consumo crônico de etanol foi de responsabilidade de outros pesquisadores. As amostras das três regiões cerebrais (CPF, H e T) coletadas em diferentes tempos nos foram cedidas na condição congelada -80°C. Os processamentos das amostras foram por nós executados de acordo com o protocolo descrito abaixo.

Os ratos do grupo controle pareado (CP) tiveram acesso a uma quantidade equivalente de ração consumida pelos animais do grupo deficiente em tiamina (DT), associado a injeções diárias de tiamina (0,4 mg/kg – Sigma-Aldrich), durante todo o período correspondente ao episódio de DT. Os animais dos grupos ET-DT e o grupo DT receberam injeções intraperitoneais (i.p.) diárias de pirritiamina (0,25 mg/kg – Sigma-Aldrich), associadas ao tratamento com ração deficiente em tiamina.

As diferenças entre os Experimentos V e VI foram a duração dos períodos do tratamento com etanol (30 dias no Exp.V e 180 dias no Exp.VI), presença de período de recuperação (Exp. VI) ou ausência (Exp. V) e o estágio do tratamento com etanol no

qual o episódio de DT foi aplicado: no final do tratamento com etanol (Exp. V) ou no meio/durante o tratamento com etanol (Exp.VI).

No caso do experimento V, após aproximadamente 10 dias (T1') do episódio de DT, os animais dos grupos CP, ET, ET-DT e DT foram decapitados. Enquanto no experimento VI os animais do grupo DT foram divididos em 2 grupos (DT-1h e DT-4h) (VEDDER *et al.*, 2015) e, no desenho experimental do Exp.VI, foi incluído um período de recuperação conforme detalhado a seguir.

Experimento V: em relação ao tratamento crônico com etanol - ET combinado com um episódio de DT (ET-DT), os ratos receberam etanol a 20% (consumo crônico) por aproximadamente 1 (um) mês, seguido de exposição a DT (DT-I). No 10º dia do episódio de DT (DT), os ratos de todos os grupos foram mortos por decapitação e as amostras coletadas para ensaios bioquímicos (dos genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AKT1*, *MAPK8*, *AMPA1*, *CACNA1C*, *NFκβ1*, *BDNF*, através do método qPCR, conforme descrito abaixo).

Experimento VI: o tratamento crônico com etanol dos animais dos grupos ET, ET-T e ET-DT, foi mantido por 180 dias (~ 6 meses). Os animais do grupo ET-DT, após um mês de tratamento com etanol foram submetidos a um episódio de DT que durou 14 dias. Após o episódio de DT (DT-1h) o tratamento com etanol foi mantido até o 180º dia. Os animais do grupo ET-T receberam injeções de tiamina durante os 6 meses de tratamento com etanol, 3 vezes por semana.

Os ratos dos seis grupos experimentais foram decapitados em 3 (três) tempos distintos: T2', T3' e T4', referentes aos estágios mencionados na legenda da Tabela I e repeditos aqui (Lembrando que os tempos dos experimentos com consumo de etanol

seguiram números de dias diferentes, mesmo sendo adotado o mesmo critério. Assim marcados com um apostolo (‘) após a numeração do tempo).

- T2’= último dia de tratamento
- T3’= 1 dia de recuperação
- T4’= 3 semanas de recuperação.

O CPF, hipocampo e tálamo foram rapidamente dissecados a 4°C. Os tálamos foram divididos em duas metades iguais ao longo da linha média e armazenados a -80°C em frascos separados (frasco próprio utilizado nos ensaios de qPCR). O hipocampo e o CPF também foram armazenados a -80°C e analisados por qPCR, para os genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AKT1*, *MAPK8*, *AMPA1*, *CACNA1C*, *NFκβ1*, *BDNF*, conforme descrito em detalhe abaixo.

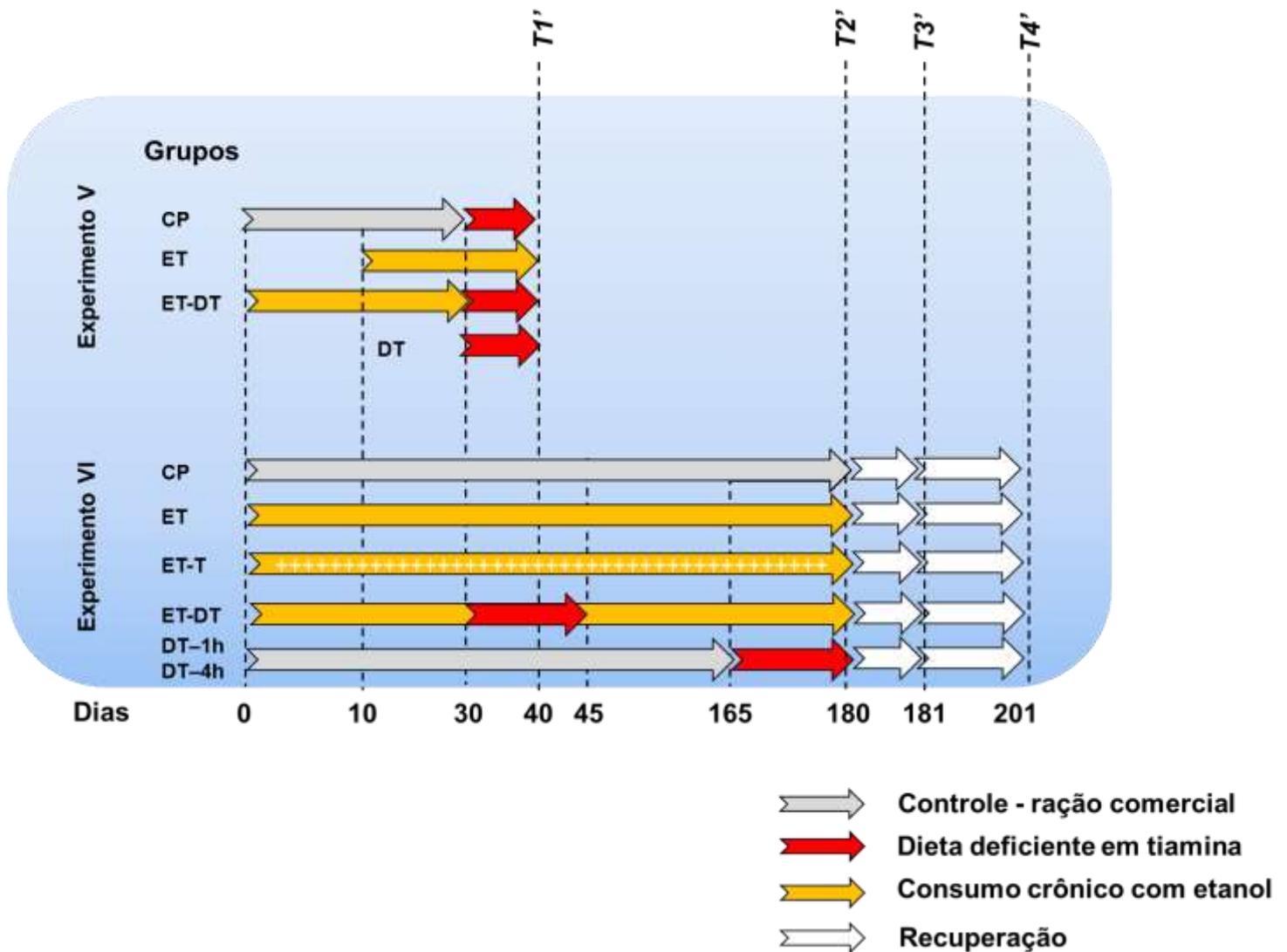


Figura 9: Desenho experimental dos experimentos (V e VI) com DT associada com consumo crônico de etanol

Esboço geral das etapas comuns dos experimentos V e VI, indicando o cronograma dos tratamentos e os grupos experimentais. Os animais foram divididos em, CP (controle pareado), ET (crônico etanol), ET-DT (crônico etanol e deficiência em tiamina), ET-T (crônico etanol com suplementação diária de tiamina) representado pelo símbolo (+), e DT (DT-1h e DT-4h). As amostras biológicas foram coletadas nos tempos T1' (Exp.V) e T2', T2' e T2' (Exp. VI).

Estudo comportamental:

O desempenho cognitivo dos animais foi avaliado por meio da tarefa de navegação espacial no Labirinto Aquático de Morris (LAM), descrita por MORRIS, (1981). A **Figura 10** mostra uma foto do LAM utilizado no presente estudo. Avaliamos

memória espacial operacional e de referência, e aprendizado espacial e extinção de um comportamento, seguindo os protocolos descritos por TERRY, 2009; VORHEES; WILLIAMS, 2006, com pequenas modificações, conforme detalhado abaixo.

Aparato

O labirinto utilizado consiste de uma piscina circular de 1,80m diâmetro (Brasil) e 2,20m diâmetro (EUA) e profundidade de aproximadamente 30cm, contendo uma plataforma de acrílico transparente submersa à 1 cm abaixo da água. À água foi adicionado tinta atóxica preta para deixar a plataforma (reforço) invisível e também facilitar a detecção do animal pelo *software* ANY MAZE, versão 5.13 (Stoelting Co. USA). A plataforma não podia ser vista pelo animal, e para localizá-la o animal teria que utilizar de coordenadas estabelecidas a partir de dicas extras labirinto, colocadas nas paredes e ao redor da piscina. Portanto, para encontrar a plataforma o animal teria que aprender a solucionar a tarefa elaborando um mapa cognitivo espacial. Em cada tentativa o animal foi colocado na piscina a partir de pontos diferentes (método detalhado abaixo) e deixado na piscina por 60 segundos. Se o animal encontrasse a plataforma em menos de 60 segundos, o mesmo era retirado da piscina, depois de permanecer por 15 segundo sobre a plataforma. Caso o animal não encontrasse a plataforma, o mesmo foi guiado pelo pesquisador até chegar à ela, onde permanecia pelo mesmo tempo (15 segundos). O desempenho de cada animal foi gravado por uma câmera colocada no teto da sala, com um campo de imagem centralizada no labirinto (piscina). As imagens captadas pela câmera foram direcionadas para um computador localizado de fora da sala e analisadas no *software* ANY MAZE, versão 5.13 (Stoelting Co. USA).



Figura 10: Foto da sala de experimentação (LANEC) mostrando uma visão superior do Labirinto Aquático de Morris.

Na água foi adicionada tinta preta, não tóxica, para encobrir a plataforma e também facilitar a detecção do rato por uma câmera colocada no teto da sala, de onde as imagens capturadas foram direcionadas para o *software* ANY MAZE. Vários objetos são utilizados como dicas espaciais extra-labirinto, durante o treino e os testes de memória. O círculo em branco indica um dos locais que a plataforma foi submersa, não sendo visível para os animais.

Memória Operacional

Memória operacional, em roedores, pode ser definida como a manutenção da informação ao longo de um curto intervalo de tempo, limitada por uma tarefa imposta aos animais (BRATCH *et al.*, 2016; DUDCHENKO, 2004a).

Aprendizado e Memória de referência

Como definido no item Introdução do presente trabalho, aprendizado e memória espacial de referência são considerados a obtenção de informações (dicas) do ambiente, com o intuito de localizar algum objeto de interesse (reforço), que sempre se encontra no mesmo local ao longo das tentativas de todas as sessões do treino. No caso do uso de roedores como modelo experimental, o treino no labirinto aquático de Morris (LAM) possibilita a formação de um mapa cognitivo espacial do ambiente, no qual o animal, através de coordenadas espaciais consegue localizar o reforço (plataforma) partindo de qualquer lugar naquele ambiente. A consolidação e armazenamento desse tipo de informação, que se mantem por longos períodos, são definidos como memória espacial de referência (KESSELS *et al.*, 2001).

Aprendizado e Memória Operacional: Treino e Teste no LAM

Um dia após o período de recuperação, que durou aproximadamente 30 dias, os ratos foram submetidos a 3 (três) dias (=sessões) (Exp. II e Exp.III) ou 4 (quatro) dias (=sessões) (Exp. IV) consecutivos de 3 tentativas, sendo uma de treino e duas de testes (1 vez por dia, durante 3-4 dias), para avaliar o desempenho dos animais na tarefa de memória operacional. A cada dia (=sessão) a localização da plataforma na piscina foi alterada, juntamente com o local no qual o animal era solto na piscina para dar início as tentativas daquele dia. As coordenadas imaginárias *N*, *S*, *W* ou *E*, utilizadas para orientar na localização da plataforma e liberação do animal no início de cada teste, estão indicadas na **Figura 11**. Cada sessão/dia, foi constituído de 3 tentativas, mantendo-se a plataforma no mesmo local e alterando o local nos dias subsequentes. O início de cada tentativa correspondeu ao momento que o animal foi solto com a face voltada para a

parede da piscina, em uma das três posições (*W*, *S*, *E*) indicadas pela seta preta na Figura 11. A denominação “coordenada” significa o local no labirinto (piscina) em que o animal era colocado no início de cada tentativa. Como dito, cada sessão foi constituída de três tentativas (T): 1^aT: Identificação do local onde se encontrava a plataforma-treino; 2^a T: Teste 01 e Teste 02. Utilizando um protocolo padronizado, o primeiro animal foi liberado na água na coordenada oposta à localização da plataforma.

Em todas as tentativas a plataforma estava oculta (aproximadamente 1 cm abaixo do nível da água), e o rato poderia nadar no máximo 60 segundos, explorando o ambiente afim de encontrar a plataforma. Quando bem-sucedido, o rato permanecia um período de 15 segundos na plataforma. Se não fosse bem-sucedido dentro do período permitido (=60 s), o rato recebia uma pontuação de 60 segundos e era guiado pelo pesquisador até a plataforma, e neste caso era permitido a permanência sobre a plataforma por um período de 15 segundos, sendo então retirado. Após 15s uma nova tentativa era realizada.

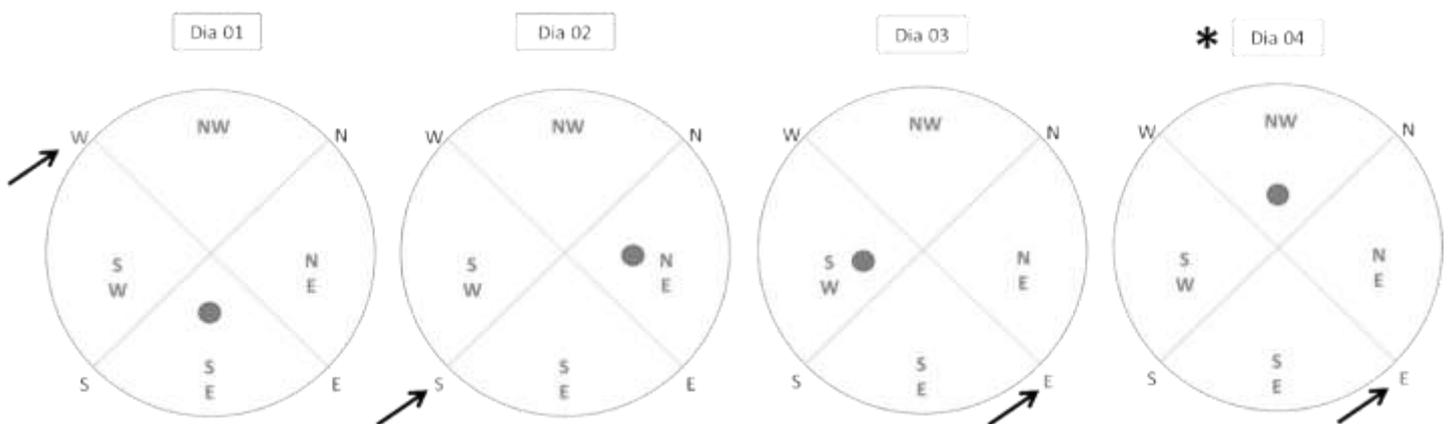


Figura 11: Diagrama do LAM, indicando os quadrantes, a posição da plataforma em cada dia/sessão, durante a realização do Treino e Teste de memória operacional. Círculo cinza escuro: posição da plataforma nos 4 dias. *SE*= Sudeste; *NE*= Nordeste; *SW*= Sudoeste; *NW*= Noroeste, representando os quadrantes. A seta preta indica o local de onde o animal foi liberado no LAM, no início das tentativas de cada dia/sessão. (*W*= Oeste; *S*= Sul; *E*= Leste). * A sessão do dia 4 foi realizada apenas com animais do Exp. IV.

As variáveis medidas e as unidades de expressão do desempenho dos animais no treino e teste da memória operacional estão listadas a seguir.

- a) Latência: tempo em segundos (s) gasto pelo animal para encontrar a plataforma em cada uma das tentativas. Os dados são apresentados como a média (s) +/- SEM de cada tentativas;
- b) Eficiência do caminho seguido pelo animal: Razão entre da linha reta da primeira posição de início do teste e a última, pela distância total percorrida pelo animal durante o teste. Valores expressos na escala de $0 < X < 1$;

Aprendizado e memória de referência: Treino e Teste

Treino

Um dia após o teste da memória operacional (curso prazo), os animais foram submetidos à tarefa de Aprendizado e Memória de Referência (longo prazo). Para a tarefa de aprendizado e memória espacial de referência utilizamos os mesmos critérios (p. ex. de tempo de exposição ao nado e períodos que o animal foi permitido permanecer sobre a plataforma). O treino foi executado por cinco dias consecutivos, sendo uma sessão por dia e quatro tentativas por sessão, onde a plataforma foi mantida no mesmo local (Posição *NW*) denominado quadrante alvo (aprendizado e memória de referência). Cada animal foi submetido às quatro tentativas em sequencias diferentes para cada dia (**protocolo na Tabela II**). Todos os animais realizaram tentativas relacionadas a cada local de liberação do animal, conforme indicado na **Figura 12**. O tempo entre cada tentativa, por animal, foi superior a 12 minutos.

Tabela II: Local (quadrantes) de liberação dos animais em cada tentativa para as cinco dias/sessões do treino (aprendizado) e teste comprobatório (memória de referência) espacial.

Dia	Aprendizado			
	Tentativas			
	1	2	3	4
1	S	N	W	E
2	E	W	S	N
3	N	S	E	W
4	W	E	N	S
5	S	N	W	E
6 (Teste)	S			

*S=Sul; N=Norte; W=Oeste; E=Leste

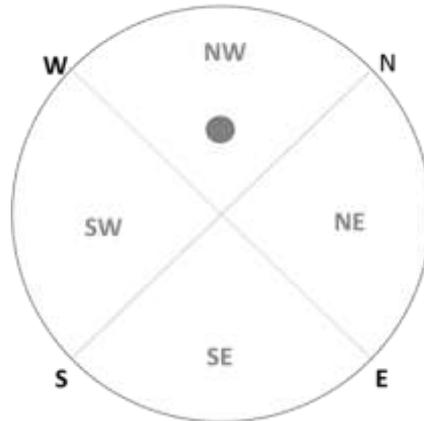


Figura 12: Diagrama do LAM indicando os quadrantes e posição da plataforma, durante o treino e teste de memória espacial de referência.

Círculo cinza: indica a posição da plataforma no quadrante noroeste (*NW*), denominado quadrante alvo. A plataforma foi mantida no quadrante *NW* (alvo) durante todas as tentativas, em todas as 5 sessões do treino. *SE*= Sudeste; *NE*= Nordeste; *SW*= Sudoeste; *NW*= Noroeste.

Teste

Após os 5 dias de treino, no 6º dia, foi aplicado um teste comprobatório de memória de referência. Retirou-se a plataforma do LAM e o teste foi iniciado colocando o animal na posição S (Sul). O teste teve duração de 120 segundos, para os animais do Exp II e Exp. III. Para os animais do Exp. IV o tempo do teste comprobatório foi de 180 segundos. Os dados foram expressos na média +/- SEM das latências (s) dos animais de cada grupo. A latência se refere ao tempo que o animal permaneceu em cada um dos quadrantes durante o tempo do teste comprobatório. Os dados do teste comprobatório são expressos em (i) latência (s) ou (ii) número de vezes que o animal cruza o local onde estava a plataforma durante o treino.

As variáveis medidas e as unidades de expressão dos resultados do desempenho dos animais no treino e teste de memória de referência estão listadas a seguir.

- a) Latência: tempo em segundos gasto pelo animal para encontrar a plataforma que se mantém no mesmo local (quadrante em todas as tentativas)
- a) Duração da visita em cada quadrante: Quantidade total de tempo que o animal passou nadando em um determinado quadrante. Os dados foram expressos como a média +/- SEM do tempo em segundo (s);
- b) Duração da visita à região da plataforma: Quantidade total de vezes que o animal passou pela região antes ocupada pela plataforma (local onde se encontrava a plataforma durante as sessões de aprendizagem). Nos Exp. II e Exp. III, os dados foram expressos em segundos (s) relativo a duas medidas: primeiro minuto (60s iniciais) e segundo minuto (os 60s

restantes), num total de 120 segundos de teste comprobatório. No Exp. IV o teste comprobatório foi de 180 segundos.

Estudos Histológicos e dosagens neuroquímicas

Os animais dos grupos experimentais referente aos Exps. I, II e III foram decapitados e tiveram seus cérebros imediatamente removidos e amostras coletadas (conforme detalhado abaixo, para dosagem de cada variável dependente) para as análises de cálcio citosólico e extracelular e níveis de tiamina e seus derivados (Exps. I, II e III), atividades catalítica de caspases (Exps. II e III) e estudos histológicos (Exps. II e III). As estruturas dissecadas (CPF, hipocampo e tálamo) foram separadas de acordo com a origem do hemisfério do qual foram obtidas, direito ou esquerdo. As amostras foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer - 71°C, até o momento da análise. Para os estudos histológicos as fatias de tecido foram obtidas do hemisfério direito e esquerdo, como descrito a seguir.

Estudos Histológicos (Exps. II e III): Para os ensaios histológicos as estruturas dissecadas (CPF, hipocampo e tálamo) foram separadas em hemisfério direito e esquerdo. Os hemisférios direito foram banhados com solução salina tamponada (PBS), e laminados em 400 µm utilizando fatiador McIlwain. Adotou-se planos de delimitação de acordo com as coordenadas descritas por PAXINOS; WATSON, 1986, para obtenção dos cortes anatômicos. A estrutura do CPF, direito e esquerdo, foi obtida pelo corte de 2 mm da posição ventral anatômica, após descarte do bulbo olfatório. A estrutura do CPF de cada hemisfério foi posicionada em lâmina histológica e fatiada em corte mediano/sagital. Para o tálamo, após separação dos hemisférios, esses foram

dissecados e fatiados em cortes frontais. O hipocampo, após dissecação, foi posicionado em lâmina e fatiado em corte mediano / sagital (**Figura 13**).

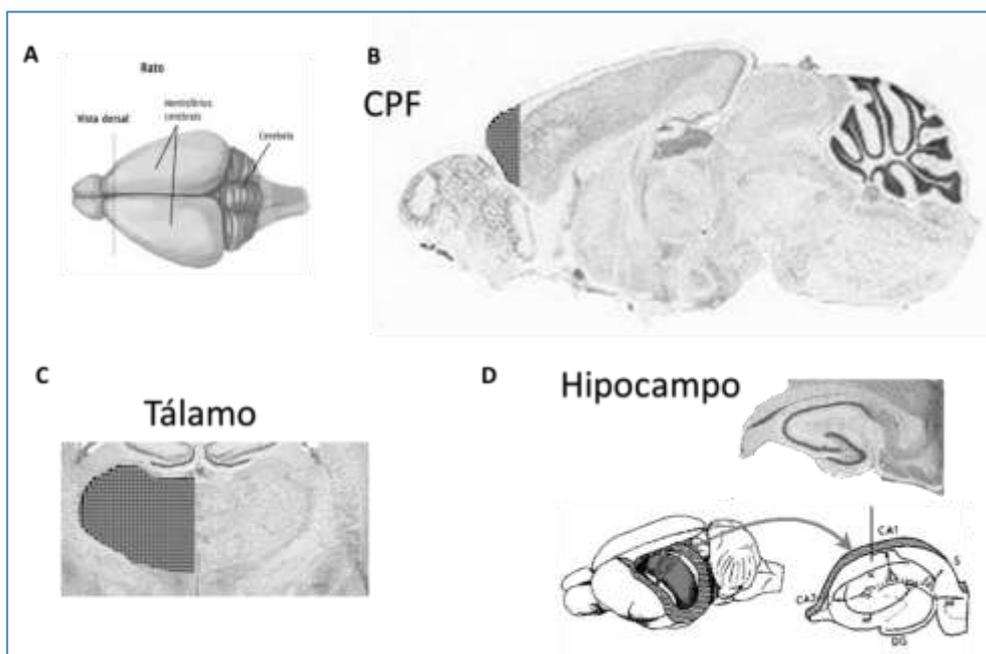


Figura 13: Figuras mostrando os planos de cortes para obtenção das três estruturas cerebrais.

Em (A) desenho do encéfalo de rato, em uma visão dorsal, indicando os hemisférios cerebrais. (B) Visão sagital de um hemisfério, indicando o córtex pré-frontal (CPF) destacado em cinza quadriculado. (C) Plano frontal do Tálamo, destacado em cinza quadriculado em um dos hemisférios. (D) Esquema de um encéfalo mostrando o hipocampo e as posições anatômicas das sub-regiões (indicadas pela seta), em uma visão dorso-ventral.

Determinações das concentrações de tiamina e seus derivados fosforilados

As dosagens de tiamina (B1), TMP, TDP e TTP foram realizadas usando-se o método descrito por NUNES *et al.*, (2017), com algumas modificações especificadas abaixo. As amostras de cada uma das três regiões do cérebro foram processadas

reunindo-se os tecidos obtidos dos hemisférios de dois animais. Portanto, cada ponto utilizado para cálculo da média corresponde ao dado obtido de um *pool* de amostras de dois animais. As amostras de tecidos foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 10%, na proporção de 15 vezes o peso do tecido, agitadas por 1 minuto, mantidas em gelo pelo período de 15 minutos e novamente agitadas por 1 minuto. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 10.000 x rcf (*Relative Centrifugal Force* = g) (Centrífuga Sorval RC 5B – rotor Sorval SS-34) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore Durapore). O sobrenadante filtrado foi lavado duas vezes (2x) em éter etílico saturado com água (5:1 v/v), 5x volume do sobrenadante e liofilizado *overnight*. As amostras liofilizadas foram ressuspendidas em ácido clorídrico (HCl) 0,1 M e dosadas por cromatografia de alta performance, conforme detalhado abaixo.

Equipamento: foi utilizado um Cromatógrafo de alta performance (*HPLC*), Shimadzu (LC - 10AD, Tóquio, Japão), com um detector de fluorescência (FLD - Shimadzu Spectro fluorometric detector RF - 551, Tokyo, Japão), um *loop* de 20 µL (Rheodyne 7725 - I, CA, EUA) e um LC - 10 BOMBA AD acoplada a um integrador (Shimadzu C-R7Ae plus) para analisar os dados cromatográficos.

Condições cromatográficas: Diferente de NUNES *et al.*, 2017, a fase móvel foi constituída por uma solução tampão equimolar 0,14 M de NaH₂PO₄.H₂O e Na₂HPO₄.7H₂O e metanol (74:26, v/v), pH 7,0, mais 0,1% de trietilamina. A fase móvel foi desgaseificada e filtrada em membrana 0,45 µm (Millipore Durapore) sob vácuo antes da utilização. Utilizamos os parâmetros de temperatura 25 ± 2°C com fluxo de 1 mL/min. O detector de fluorescência foi configurado com comprimento de onda de excitação de 367 nm e comprimento de onda de emissão de 435 nm, alta sensibilidade.

A área do pico foi utilizada para determinar a concentração de cada composto, utilizando-se curvas de calibração na faixa de ng/mL.

Para elaboração das curvas padrões utilizamos soluções estoque de TTP, TDP, TMP e B1 preparadas com HCl 0,1 M, mantidas a -20°C. Utilizamos as concentrações 10, 50, 100, 150, 250, 500 ng/mL de TTP; 50, 100, 325, 550, 775, 1000 ng/mL para TDP; 10, 25, 50, 100, 175, 250 ng/mL para TMP e 10, 50, 80, 100, 150, 200 ng/mL para B1.

O processo de derivatização tanto das amostras como das soluções padrões foi realizado usando-se 25 µL da amostra ou solução padrão, 5 µL de ferrocianeto de potássio III 12 mM (Sigma-Aldrich, CA, USA) e 2 µL de ácido fosfórico 5M. A solução foi agitada e incubada por 1 minuto ao abrigo da luz antes da aplicação. Os dados foram expressos em ng/mg de tecido, e como percentagem de cada composto em relação a soma de todos (T, TMP, TDP e TTP) considerada como 100%.

Determinações das atividades de caspases canônicas

Utilizamos o método luminescente de acordo com o protocolo de OLENDZKI *et al.*, (2013), com as modificações apresentadas abaixo, para processamento das amostras. O protocolo de homogeneização foi o mesmo utilizado para o teste de viabilidade celular usando-se 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol brometo (MTT), conforme descrito abaixo. Após quantificação de proteínas, ajustou-se todas as amostras para a concentração de 10 µg/mL com a mesma solução de ressuspensão (tampão HEPES 25 mM pH 7,6, contendo Sacarose (w/v) 10% e ditioneitol-DTT 10 mM). Para a determinação das atividades catalíticas das caspases-3/7, 8 e 9 foram adquiridos *kits* de

luminescência Promega Corporation® (*Caspase-Glo*® 3/7 assay systems; *Caspase-Glo*® 8 assay systems, *Caspase-Glo*® 9 assay systems).

O teste se baseia no princípio de clivagem enzimática dos peptídeos específicos: Caspase-3/7 (Z-DEVD), Caspase-8 (Z-LETD), Caspase-9 (Z-LEHD), cujas reações liberam substrato luminescente para a enzima luciferase. A reação catalítica final gera um sinal típico de luminescência (“*glow-type*”) (**Figura 14**) proporcional à quantidade da respectiva caspase ativa.

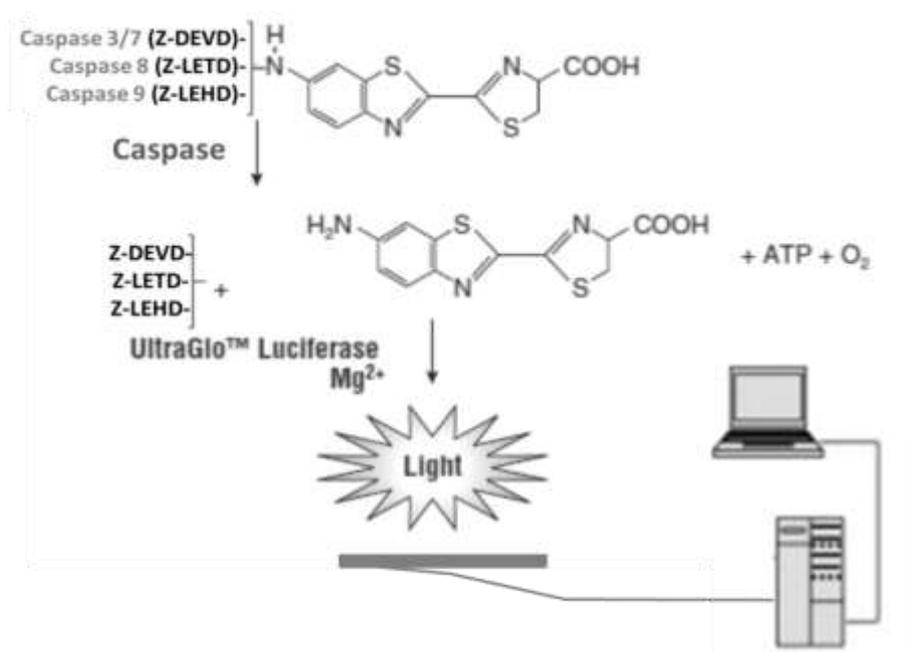


Figura 14: Esboço da reação catalítica das enzimas caspases.

Após catalise enzimática, o substrato luminescente liberado reage com a enzima luciferase gerando sinal luminescente detectado no luminômetro. Figura modificada retirada do protocolo do kit de *Caspase-Glo*® Promega Corporation®. Em negrito (Z-DEVD, Z-LETD, Z-LEHD) substratos específicos para cada caspase.

A incubação iniciou-se pela adição de 15 µL de amostra na concentração de 10 µg/mL e 15 µL de um dos três substratos específicos para a respectiva caspase. A mistura foi mantida a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 1 hora. Cada

ensaio foi feito em triplicata, em microplaca de 384 poços. Adotamos como branco uma solução tampão HEPES 25 mM pH 7,6, contendo Sacarose (w/v) 10%, DTT 10 mM na mesma condição e proporção do teste. Decorrido o período de incubação a luminescência foi medida em leitor de placa Synergy™ 2 (BioTek® Instruments, Inc.), configurado com sensibilidade 200.

Dados foram expressos em unidade de Luminescência⁴: *Relative Light Unit* (RLU, Branco subtraído). De acordo com *kit de Caspase-Glo® Promega Corporation®* a luminescência é relacionada com a quantidade de caspase ativa presente na reação (luminescência = 1 unidade de caspase necessária para clivar um 1 pmol de substrato por minuto a 30°C).

Dosagem dos níveis de cálcio livre

a) Ajuste das condições ótimas para dosagem de cálcio em amostras de tecido cerebral, utilizando microplaca e kit comercial

O processamento das amostras (Exps. I, II e III) envolveu a utilização do agente desnaturante TCA a 10 % e, sabe-se que o uso deste reagente químico libera e solubiliza os íons cálcio associados às proteínas, possibilitando sua quantificação na solução aquosa. A proposta foi usar as amostras (Exp. I, II e III) processadas segundo NUNES *et al.*, (2017), liofilizadas *overnight* e ressuspensas em HCl 100 mM, para dosar B1 e seus derivados, para também dosar cálcio. Portanto, o primeiro passo para estabelecer as condições ótimas para dosagem de cálcio nas amostras do CPF, tálamo e hipocampo,

⁴ Luminescência: emissão de luz por uma substância quando submetida a um estímulo, por exemplo reações químicas.(RUBINSZTEIN, 2006)

mantidas em HCl 100mM, foi verificar a interferência do HCl na determinação deste íon utilizando-se o *kit* comercial Cálcio Arsenazo III – Bioclin[®].

Curva de Calibração: Utilizamos microplacas de 96 poços, fundo chato, com diâmetro interno 6,7 mm, altura total 12 mm e altura real 10,705 mm, espessura do fundo 1,295 mm, para a realização dos testes e parâmetros de cálculo, portanto o caminho óptico foi de 5,7293 mm com volume total de 202 µL por poço. As microplacas foram incubadas a 37°C por 2 minutos. As densidades óticas foram medidas a 630 nm no leitor de placas Elx800, (BioTek, VT, USA). O cálculo do coeficiente de absorção (ϵ) do complexo arsenazo III / cálcio foi de aproximadamente 105 (Lei de Beer-Lambert), que foi compatível com o encontrado por MICHAYLOVA; ILKOVA, 1971; MICHAYLOVA; KOULEVA, 1974. Para obtenção da Curva de Calibração utilizamos como padrão de cálcio o carbonato de cálcio 10 mg/dL (Cálcio Arsenazo III – Bioclin[®]), nas concentrações de 0; 0,312; 0,625; 1,250; 2,500; 5,000;10,000 mg.

Concentração ótima de HCl para dosagem do cálcio

A reação foi iniciada com 2 µL de soro controle liofilizado, contendo cálcio 6 mg/dL (controle Biocontrol N – Bioclin[®] - lote 0057) e azida sódica 0,9% a qual foram acrescentados 200 µL de Arsenazo III. As etapas seguintes foram as mesmas descritas acima para obtenção da Curva de Calibração. Os dados foram também expressos em mg de cálcio/dL.

Utilizamos alíquotas de Biocontrol N – Bioclin[®] (lote 0057) contendo HCl nas diluições seriadas a partir de 0,1M (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,00313; 0,00156; 0,00078), as quais foram comparadas com alíquotas não diluídas em ácido.

Observamos que não existe efeito significativo do HCl sobre a concentração de cálcio em amostras diluídas em HCl 6,25 mM, conforme pode ser observado na **Figura 15**. Assim, a concentração de 6,25 mM foi estabelecida como condição ótima para o processamento das amostras.

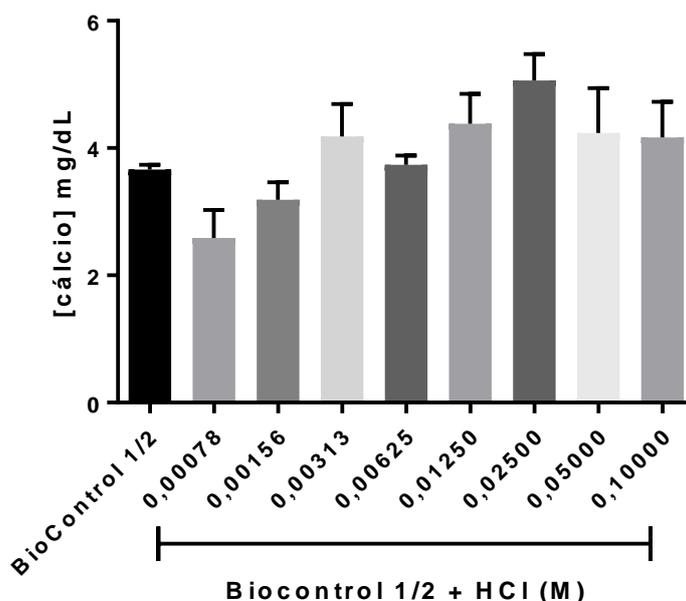


Figura 15: Concentrações (Média +/- SEM) de cálcio

Cálcio em alíquotas contendo diferentes concentrações de HCl (n=3, dosadas em quadruplicata). BioControl ½ = referência controle, concentração de cálcio = 3 mg/dL +/- 0,6. A concentração de 6,25 mM de HCl não interfere (p<0.05) na detecção dos níveis de cálcio.

b) Determinações dos níveis de cálcio nas amostras biológicas

As amostras obtidas dos animais dos Exps. I, II e III, ressuspendidas em HCl 100 Mm, foram então diluídas para concentração de 6,25 mM e utilizadas para determinação dos níveis de cálcio. Conforme mencionado acima, a dosagem foi feita utilizando-se o *kit* Cálcio Arsenazo III – Bioclin[®], adaptado e validado para microplaca de 96 poços. Os resultados foram expressos em µg de cálcio/ mg de tecido (CPF, tálamo ou hipocampo).

Dosagem de proteína total

Processamento das amostras: As amostras das três regiões cerebrais foram homogeneizadas de acordo com o protocolo de OLENDZKI *et al.*, 2013, com algumas modificações. Amostras do CPF, tálamo ou hipocampo foram utilizadas na proporção de 5 mg de tecido por 140 μ L de solução de KCl 1,5% (w/v). Em seguida, as suspensões foram centrifugadas (Centrífuga Sorval RC 5B – rotor Sorval SS-34) à 800 x *rcf* durante 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi separado, alíquotado em microtubo e congelado em nitrogênio para liofilização *overnight*. As amostras liofilizadas foram armazenadas à – 71°C até o momento das dosagens bioquímicas, as quais foram realizadas dentro de no máximo 6 meses.

No dia do ensaio, as amostras liofilizadas foram ressuspensas em 1 mL de tampão HEPES 25 mM, pH 7,6, contendo Sacarose (w/v) 10%, DTT 10 mM. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, CA, USA) como padrão para elaboração da Curva de Calibração.

Dosagem de proteínas totais: As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976). A curva de calibração para as análises quantitativas foi realizada utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, CA, USA) como padrão. A quantidade de proteína total em cada amostra foi normalizada e os dados expressos como quantidade de proteína por mg de tecido (CPF, tálamo ou hipocampo).

Teste de Viabilidade Celular – MTT

A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais (**Figura 16**). Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (BERRIDGE* *et al.*, 2005; PERES *et al.*, 2008).

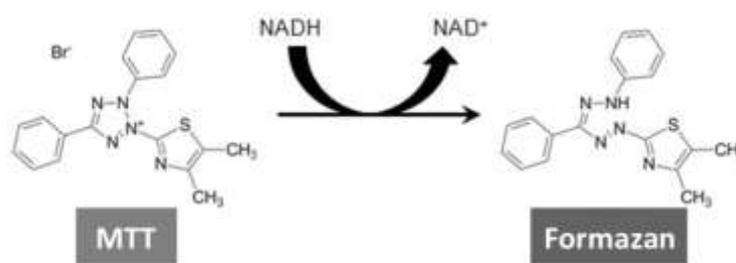


Figura 16: Esboço da reação de redução do MTT em formazan (desidrogenases mitocondriais).

Após catalise enzimática é liberado sal de coloração arroxeadada (formazan) e insolúvel em água. Para leitura de densidade óptica foi adicionado DMSO para solubilização do sal. Figura modificada de RISS *et al.*, (2013).

Utilizamos o método colorimétrico de acordo com o protocolo de OLENDZKI *et al.*, (2013), com algumas modificações, conforme descrito abaixo. Para os ensaios, uma solução estoque de 7,5 mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol brometo (MTT) foi preparada e mantida no *freezer* à -20° C.

Viabilidade celular: A incubação foi realizada com 50 μL de amostra ressuspensa em tampão HEPES, 10 μL de MTT 7,5mg/mL. O volume foi ajustado para 100 μL com água e as amostras incubadas por 15 minutos a 37°C e à meia luz. Foi preparado um branco para cada amostra de CPF, tálamo ou hipocampo contendo 10 μL de TCA 10%. No momento da leitura no espectrofotômetro foi realizada uma normalização do branco utilizando uma amostra contendo apenas TCA 10%. A incubação foi interrompida com a adição de 100 μL de dimetilsulfoxido (DMSO: Dimethyl sulfoxide) com consequente solubilização do formazan, agitando-se a placa por mais 15 minutos, protegida da luz. Alíquotas de 200 μL tiveram suas densidades óticas medida a 595 nm no leitor de placas Elx800, (BioTek, VT, USA).

Os dados apresentados foram normalizados e expressos em Abs/mg de proteína. Cada ensaio foi realizado em quadruplicada.

Teste de Viabilidade Celular – Calceína e Iodeto propídio

Os testes de viabilidade celular foram realizados utilizando sondas fluorescentes (Calceína-AM e iodeto propídio) (Life Technologies, CA, USA). Conforme mencionado anteriormente, as amostras de tecido separadas para os ensaios de viabilidade celular utilizando os fluoróforos foram fatiadas, separadas e colocadas em microplaca de 24 poços. As fatias foram mantidas por aproximadamente 15 minutos em 500 μL de solução aCSF, contendo: tampão HEPES 19,7 mM pH 7,4, Cloreto de sódio 130 mM, Cloreto de potássio 5 mM, Fosfato de potássio monobásico 1,2 mM, Cloreto de cálcio 1,25 mM, Sulfato de magnésio 1 mM e glicose 5,5 mM. Posteriormente, para avaliar a morte celular, as fatias foram incubadas no escuro por 30 min em solução aCSF, contendo: 1 μM de Calceína-AM e 7,48 μM Iodeto de Propídio.

As fatias foram então lavadas em solução aCSF e PBS, na proporção 1:1, à temperatura ambiente durante 15 min. As fatias foram transferidas para *Cell Imaging Dishes*, com fundo de lamínula para obtenção das imagens.

As imagens foram obtidas sob um microscópio de fluorescência Olympus IX70 usando uma objetiva UPlanFI 4x, 0,13 N.A, filtro condensador PhL, uma câmera QICLIK, e o software Image-Pro Plus versão 7.0.1.658 para aquisição de imagens (Media Cybernetic, Inc.). Os filtros de emissão (EM) e excitação (EX) usados para coletar a fluorescência de Calcein-AM foram EM 490/20 e EX 525/36, enquanto os filtros EM 555/25 e EX 605/52 foram usados para coletar a fluorescência do iodeto de propídio.

As análises quantitativas foram realizadas calculando a intensidade de pixel dos sinais fluorescentes Calcein-AM e Iodeto de Propídio, utilizando o *software* ImageJ versão 1.51j8 (NIH). Os dados foram normalizados e expressos como uma porcentagem (%) da intensidade do pixel. As análises quantitativas foram realizadas pelo cálculo de intensidade de pixels do fluoróforo Iodeto de Propídio.

Análise de qPCR (Exps. IV, V e VI)

Extração de RNA

Os tecidos do CPF, hipocampo e tálamo foram armazenados em microtubos de 2,0 mL com fundo cônico, com tampa de pressão, em ultrafreezer -80°C até o momento da utilização. Os materiais utilizados em todos os procedimentos, que entrariam em contato com a amostra, foram enxaguados com água RNase *free*. No dia da extração de RNA, as amostras foram retiradas do freezer e os tubos colocados em capela de exaustão onde foram realizados os procedimentos. Foram adicionados 500 µl de

reagente de TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY) e esferas de aço inoxidável de 5 mm em Qiagen TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA). Utilizando adaptador *TissueLyser*, as amostras foram distribuídas e os adaptadores balanceados para homogeneização. Utilizou-se frequência de 20 Hz e tempo de 2 minutos, invertendo a posição do adaptador na metade do tempo (depois de 1min). Após esta etapa os tubos foram levados para centrifugação à temperatura ambiente, em velocidade máxima 180 a 1800 oscilações por minuto, por 30 segundos. Todo o trizol foi transferido para microtubos de 1,5 mL e estocado em *ultrafreezer* à -80°C.

Após o processamento, todas as amostras foram armazenadas no *ultrafreezer* até início da próxima etapa, extração do RNA.

A etapa de extração de RNA foi executada com lotes de 20 amostras por vez. As amostras foram retiradas do *ultrafreezer*, colocadas em capela de exaustão, aguardando descongelamento a temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 100 µL de clorofórmio e os tubos foram agitados por 15 segundos, com posterior incubação por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugamos todas as amostras a 13.523 x rcf por 15 min a 4°C. Com cuidado, removemos o sobrenadante em duas etapas (125 µL cada) para evitar contaminação com outras fases geradas pela centrifugação. A seguir, 250 µL de etanol 70% foi adicionado e misturado com o auxílio da pipeta e imediatamente transferido para uma coluna *RNAeasy*. A coluna foi então centrifugada a 9.391 x rcf por 15s à temperatura ambiente. O RNA ficou retido na coluna e descartamos o eluato coletado. Em seguida, adicionamos 700 µL tampão RWI fornecido pelo *kit* RNeasy (Qiagen) e centrifugado a 9.391 x rcf por 15s à temperatura ambiente, descartando o eluato. Posteriormente, adicionamos 500 µL tampão RPE fornecido pelo *kit* RNeasy (Qiagen) e centrifugado a 9.391 x rcf por 15s à temperatura ambiente, descartando o eluato. Esta etapa foi repetida, com centrifugação a 9.391 x rcf

por 2 min à temperatura ambiente. A coluna foi transferida para um tubo coletor (fornecido junto no *kit*) e novamente centrifugada a 9.391 x rcf por 1min à temperatura ambiente. Nesta etapa transferimos a coluna para microtubo de 1,5 mL e acrescentamos 30 µL de água RNase *Free* à 65°C. Novamente, procedemos à centrifugação a 9.391 x rcf por 1 min à temperatura ambiente, armazenando o eluato em gelo, para posterior quantificação. A determinação da concentração foi realizada no aparelho NanoDrop 2000. Todas as amostras foram estocadas em *ultrafreezer* à -80°C.

Transcrição de cDNA

As amostras de RNA foram descongeladas lentamente, em gelo, diluindo 10 vezes (1:10) com água RNase *free* e, em seguida, ajustando para 1µg. Acrescentou-se ao volume de 12 µL de RNA total, mais 2 µL de enzima gDNase (*Kit* de Transcrição Reversa - Qiagen), os tubos foram agitados levemente e incubados por 2 minutos à 42°C em aparelho Eppendorf Mastercycler PCR, conforme descrito por DOREMUS-FITZWATER *et al.*, (2015).

Após preparar a mistura de *Transcriptase* reversa, *primer* e tampão, 6 µL desta mistura foram acrescentados às amostras de RNA, agitando levemente e centrifugando rapidamente. Todas as amostras foram incubadas por 15 minutos à 42°C e depois 3 minutos à 95°C em Eppendorf Mastercycler PCR. Em seguida, as amostras foram diluídas na proporção 1:10 de cDNA em água RNase *free*, mantendo as amostras em *ultrafreezer* à -80°C, até o momento da realização dos ensaios qPCR, descritos a seguir.

Execução qPCR

Utilizamos marcador fluorescente TAQ (SYBR Green Supermix) e microplaca de 384 poços e executamos o qPCR de todos os genes de cada amostra por placa. A reação iniciou-se com a adição de 28,5 µL do preparado de reação (TAQ mix, primers e água RNase free) a 1,5 µL da amostra de cDNA, previamente diluída (1:10). A mistura foi transferida, em duplicada, para microplaca de 384 poços. Os PCRs foram realizados utilizando um sistema de detecção de PCR em tempo real CFX 384 (# 185-5485; BIO-RAD Life Science Research, Hercules, CA) durante 40 ciclos. Em cada ciclo, as amostras foram desnaturadas por 30 segundos à 95°C, reaquecidas à 60°C por 30 segundos, e por mais 30 segundos à 72°C. Todos os resultados foram normalizados usando a proteína ribossômica mitocondrial L13 (*MRPL13* ou *RLS*) como um gene de normalização. O gene alvo, os números de acesso e as sequências iniciadoras estão listados na Tabela III.

Os genes de interesse (*CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AKT1*, *MAPK8*, *AMPA1*, *NFκβ1*, *BDNF*, *CACNA1C*) foram analisados nas amostras coletadas. A expressão do gene *MRPL13* (*house keeper*), se tratando de um normalizador de outros genes não poderia sofrer influência em nenhuma etapa do tratamento, ou seja não poderia ser observada diferença significativa entre as condições experimentais ou a fase da doença. Portanto, os genes alvo foram ajustados em relação ao gene normalizador usando a transformação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O teste de Grubbs ($\alpha = 0,05$) foi usado para detectar pontos *outliers* os quais foram removidos das análises. **Os dados foram expressos como porcentagem (%)**. Primeiramente com o valor medido de Cq do gene de interesse faz-se a subtração com o valor de Cq do gene normalizador obtendo o que chamamos de ΔCq . Calcula-se a média dos valores de ΔCq de todos os animais controle, que será usado como um novo normalizador de todas as condições

experimentais (Grupos). Então obtém a diferença entre os valores de ΔCq de cada animal pela média dos valores de ΔCq dos animais controles, obtendo $\Delta\Delta Cq$. Estes valores obtidos ($\Delta\Delta Cq$) são então transformados, de funções logarítmicas para funções lineares, através da função exponencial: 2 elevado ao valor $\Delta\Delta Cq$ que então é multiplicado por 100 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela III: Primers e sequencias do qPCR utilizados nos experimentos.

Primer	Número Acesso	Oligo	Sequência
Protéina Mitochondrial ribosomal protein L13 (MRPL13 or RLS)	NM_173340.2	Forward primer	5'-ATGAACACCAACCCGTCTCG-3'
		Reverse primer	5'-CCACCATCCGCTTTTCTTGTGTC-3'
Caspase 3 (<i>Casp3</i>)	NM_012922.2	Forward primer	5'-GGAGCTTGGAAACGGAAAGAA-3'
		Reverse primer	5'-ACACAAGCCCAATTCAGGGT-3'
Caspase 8 (<i>Casp8</i>)	NM_022277.1	Forward primer	5'-CGAACGATCAAGCACAGAGAG-3'
		Reverse primer	5'-CCCCGAGGTTTGTCTTCAT-3'
Caspase 9 (<i>Casp9</i>)	NM_031632.1	Forward primer	5'-CTACTCCA CCTTCCCAAGGTTT-3'
		Reverse primer	5'-CTCAGAAACAGCAATGGCGAC-3'
Serina/threonina kinase 1 (<i>Akt1</i>)	NM_033230.2	Forward primer	5'-GGGCCACGGATACCATGAAC-3'
		Reverse primer	5'-GCTGACATTGTGCCACTGAGA-3'
Receptores ionotrópicos de glutamato alfa (AMPA)	NM_031608.1	Forward primer	5'-GAATCAGAACGCCTCAACGC-3'
		Reverse primer	5'-ATGAAGCCCAAGATTGGCGAG-3'
Proteino-quinases ativadas por mitógenos 8 (<i>Mapk8</i>)	NM_053829.2	Forward primer	5'-TCAATGGCTCTCAGCATCCG-3'
		Reverse primer	5'-TGTCTGTATCCGAGGCCAGA-3'
RELA proto-oncogene, NF-kB subunit (Rela)	NM_001276711.1	Forward primer	5'-GGACA ACTATGAGGTCTCTGGG-3'
		Reverse primer	5'-GCCTCTGTGTAGCCCATCTG-3'
Canal da cálcio voltagem-dependente, subunidade alfa 1C	NM_012517.2	Forward primer	5'-TCGGTGT TTTGAGCGGAGAG-3'
		Reverse primer	5'-GGCATGCTCATGTTTCCGGG-3'
BDNFall (Brain-derived neurotrophic factor, all variants)	NM_001270631.1	Forward primer	5'-CCAGGTGAGAAAGATGATGACC-3'
		Reverse primer	5'-CAGCCTTCATGCAACCGAAG-3'

Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 6.00 (*GraphPad Software*, La Jolla California USA). Análises de dados do modelo animal (peso corporal e consumo de ração) e para alguns dados do estudo comportamental (memória operacional, aprendizado e memória de referência) utilizamos ANOVA *two way*, com medidas repetidas (MR), fatorial 2 x r, sendo r as medidas repetidas que

variou conforme o tipo de experimento. Todas as ANOVAs foram seguidas de testes *post hoc* usando-se comparações múltiplas por meio dos testes de Tukey e/ou Sidak. Utilizamos o teste estatístico ANOVA - *two way*, fatorial 2 x 2 (tratamento x tempo) para análise de proteína total, níveis de cálcio, viabilidade celular (MTT e marcação com IP e Calceína-AM), caspases e expressão gênica (Experimento V).

Os dados de expressão gênica (Experimento VI) foram analisados por ANOVA *one way*, teste *post hoc* de Fisher usado para comparação entre grupos controle pareado (CP) e grupos testes (DT ou ET). Portanto, para cada uma das variáveis *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AKT1*, *MAPK8*, *AMPA1*, *NFκβ*, *BDNF*, *CACNA1C*, os resultados de cada grupo controle (CP- T2', CP- T3', CP- T4') foram avaliados em relação à suas diferenças estatísticas, comparando os valores entre os diferentes tempos de coleta das amostras. Caso não fosse detectada diferença significativa entre esses valores, os mesmos foram agrupados em um único grupo denominado controle pareado final (*ultimate control*).

Análises foram realizadas entre os dados do grupo pareado final e os dados obtidos nos grupos testes (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h), para cada um dos tempos separadamente (T2', T3' e T4'), para cada uma das variáveis dependentes. Foram também comparados os dados obtidos para cada variável dependente nos três tempos diferentes (T2', T3' e T4'), para cada um dos grupos testes separadamente (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h).

Os dados de expressão gênica foram submetidos ao teste de Grubbs (BURNS *et al.*, 2005; GRUBBS, 1969; HUI; FENG, 2013) para detecção e remoção de *outliers*. O valor de C_q também foi analisado em relação à média, para valores extremos. O C_q ou valor de quantificação do ciclo é o número do ciclo de qPCR, no qual a curva de reação

da amostra cruza a linha do limite. Este valor informa quantos ciclos foram necessários para detectar um sinal real das amostras.

Os valores de qPCR e viabilidade celular foram expressos em porcentagem da média \pm SEM; níveis de cálcio em μg de cálcio / mg tecido \pm erro padrão, adotando $\alpha=0,05$. Ou seja, efeitos ou diferenças com valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Os valores de atividade das caspases foram expressos em logaritmo natural de Luminescência (*Relative Light Uni* - RLU, Branco subtraído).

Os dados estão expressos em média \pm SEM (*Standard Error of Mean*).

6. RESULTADOS

Modelo Experimental

O desenvolvimento do modelo experimental de DT utilizado no presente trabalho, nos Exps. I, II, III (ratos *Wistar*) e Exp. IV (ratos *Sprague Dawley*) foi monitorado em relação à variação do peso corporal (variável medida) e manifestação dos sinais clínicos. Os pesos dos animais foram registrados diariamente durante o episódio de DT e em intervalos de 2-3 dias nos demais períodos de tratamento.

Os dados de variação de peso, coletados dos ratos *Wistar*, referentes aos experimentos II e III estão apresentados na **Figura 19**. Os animais do Exp. I não foram incluídos, porque os mesmos foram mortos no 10º dia do episódio de DT. Podemos observar um ganho de peso, nos dias iniciais do tratamento, nos animais de todos os grupos, seguido de uma redução do peso dos animais do grupo DT a partir do 7º dia. Utilizando teste estatístico ANOVA, com medidas repetidas (MR), dois fatores (tratamentos x dias/tempo) observamos efeitos significativos do tempo ($F_{(27,1350)}=786,70$ $P<0,000$) e da DT ($F_{(2,50)}=10,03$ $P=0,000$) e interação significativa entre tratamento/DT e dia/tempo ($F_{(54,1350)}=11,13$ $P<0,000$). Testes *post hoc* (Tukey) mostraram que a partir do 7º dia do episódio de DT observamos uma diferença significativa entre o grupo DT (268,1 +/- 6,3) e os grupos controle pareado (289,3 +/- 5,0; $p=0,0420$) e controle (291,6 +/- 8,8; $p=0,0355$); o que representa uma redução média de aproximadamente 22 g, em relação aos controles. Entre os 7º e 9º dias de tratamento os animais do grupo DT mantiveram o peso (270,6 +/- 5,7), ou seja, não ganharam peso, enquanto os controles ganharam (C=300,6 +/- 8,0, $p=0,004$; CP=293,0 +/- 4,3, $p=0,030$). Após o 12º dia de tratamento os animais do grupo controle e controle pareado (CP) começam a apresentar

diferença em relação a variação de peso ($p=0,0135$). No entanto, mesmo não ganhando peso como os animais do grupo C, a diferença estatística na média da variação de peso entre os animais dos grupos CP e DT aumenta.

Consumo de ração: o fato dos animais do grupo CP não terem ganho peso, como os animais do grupo C, pode ser explicado pelo fato dos animais deste grupo (CP) receberem ração em quantidade pareada ao consumido pelos animais do grupo DT, conforme pode ser observado na **Figura 17**. ANOVA MR para os grupos CP e DT em relação ao **consumo de ração** mostra que não houve efeito significativo da DT no consumo de ração ($F_{(1,50)}=2,808$ $P=0,100$), confirmando que os animais dos grupos CP e DT ingeriram a mesma quantidade de ração ao longo do episódio de DT. Observa-se um efeito do tempo/dias ($F_{(15,750)}=61,58$ $P<0,0001$), indicando que o consumo variou ao longo do tempo para os dois grupos. Observa-se interação significativa entre DT e tempo ($F_{(15,750)}=4,61$ $P<0,0001$).

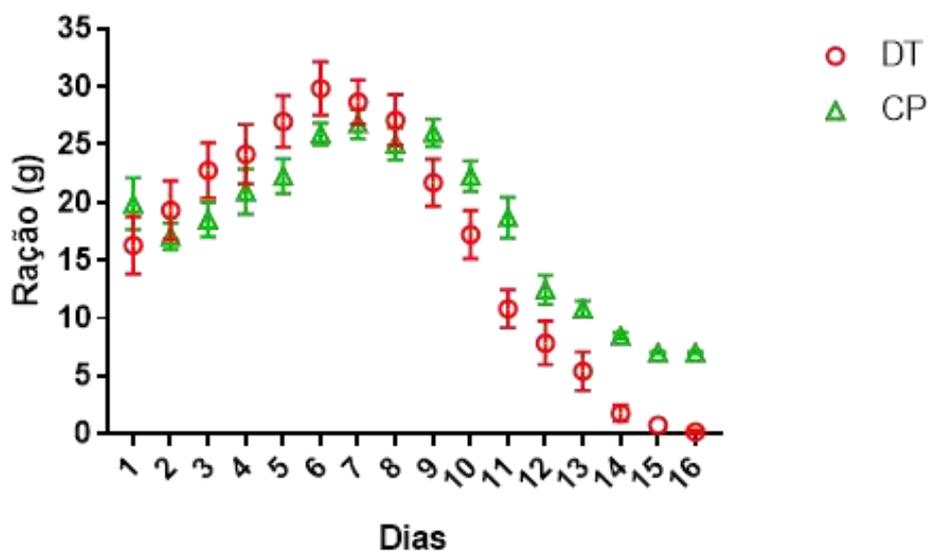


Figura 17: Consumo de ração (Média+/- SEM), expresso em gramas, durante o episódio de DT.

Consumo de ração para os animais dos grupos CP e DT. Não existe efeito significativo do episódio de DT no *consumo de ração* ($F_{(1,50)}=2,808$ $P=0,100$).

Por volta do 14^o dia do episódio de DT, observamos intensificação do efeito da DT sobre a variação de peso, com diferenças significativas entre as médias dos pesos dos animais de todos os grupos: DT (237,5+/- 6,2) vs. C (321,9+/-8,0), $p<0,0001$; DT (237,5+/- 6,2) vs. CP (279,4+/- 4,9), $p<0,0001$; e C (321,9+/-8,0) vs. CP (279,4+/- 4,9), $p<0,0001$.

Os sinais neurológicos de DT foram observados apenas nos animais do grupo DT e não nos animais do grupo CP. Os animais CP mantiveram seu peso corporal sem variação significativa entre os dias 12-14. Este fato, somado à observação de não haver diferença significativa entre o consumo de ração entre os grupos CP e DT, indica que os sinais neurológicos observados nos animais do grupo DT são devido à falta de tiamina e não ao menor consumo de nutrientes (dieta). Os dados obtidos nos dois experimentos (II e III), mostraram que os animais do grupo DT apresentaram os sinais neurológicos, como convulsão e perda do reflexo de endireitamento por volta do dia 13 (mediana dos dados), conforme pode ser observado na Curva de Sobrevivência (manifestação de sinal neurológico), apresentada na **Figura 18**.

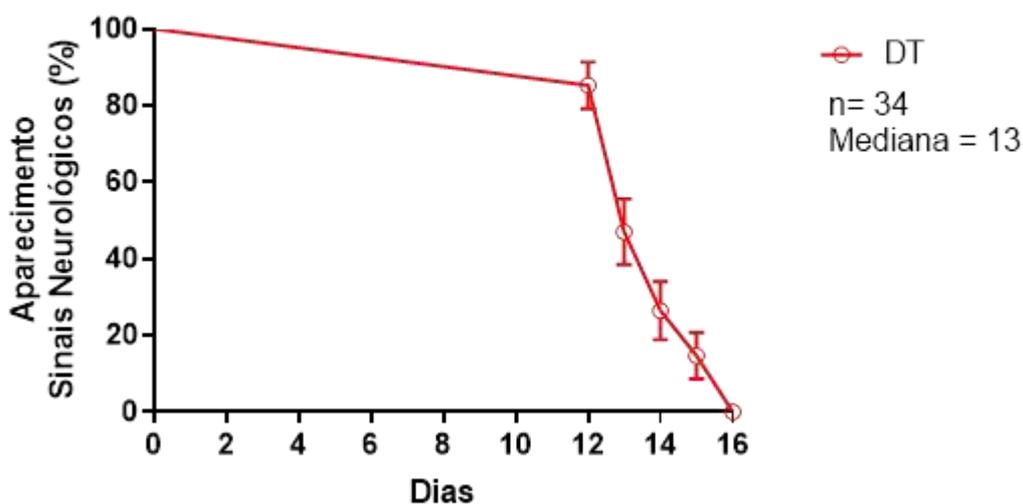


Figura 18: Curva de Sobrevivência

Expressa em manifestação de sinais neurológicos durante o episódio de DT, momento em que ocorreu a interrupção da deficiência. 100% representa o número de animais (n=34) do grupo DT dos Exps. II e III. Por volta do dia 13 mais de 60% dos animais já tinham apresentado os sinais de perda de reflexo de endireitamento e convulsão. Os dados estão expressos em Média +/- SEM.

Continuando a análise dos dados referentes a variação de peso, **Figura 19**, o grupo CP a partir do 20º dia não apresenta diferença em relação ao controle. Apesar dos animais do grupo DT continuarem apresentando diferença significativa na variação de peso, em relação aos animais dos grupos Controle e CP, $p < 0,000$. O peso dos animais do grupo DT se mostrou estável após o 41º dia de tratamento (22º dia do período de recuperação). Estes animais (DT), após o 45º dia de tratamento, não apresentam diferença de peso em relação ao grupo CP ($p=0,123$).

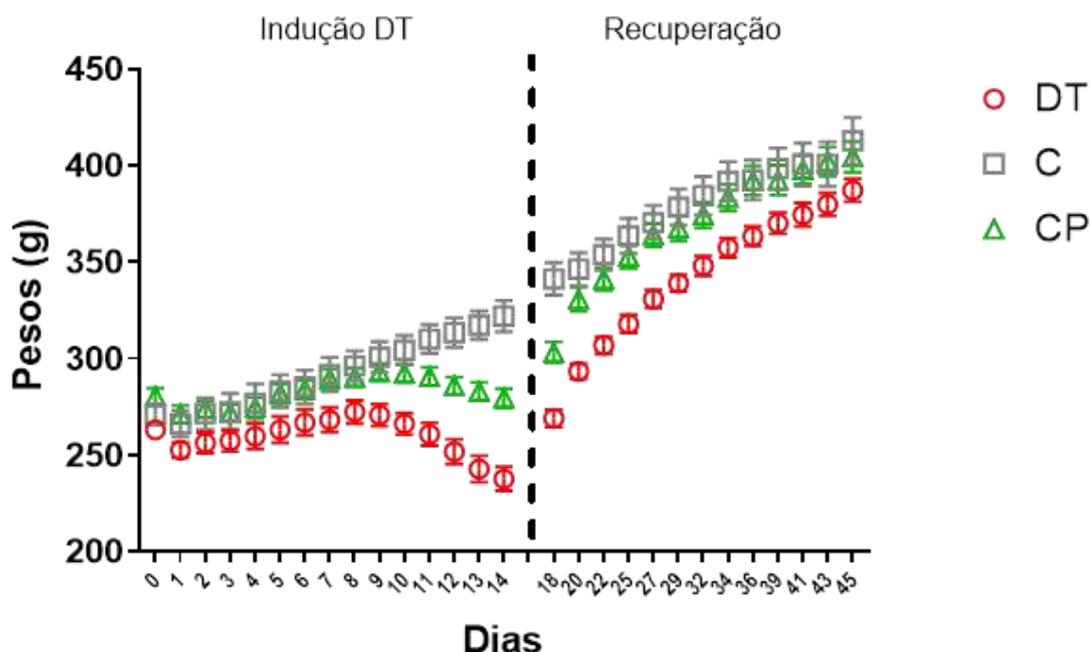


Figura 19: Variação do peso corporal (Média +/- SEM), em gramas (g), dos animais dos três grupos experimentais: DT

Tratamento com ração deficiente em tiamina *ad libitum*, associada a injeções de pirritiamina 0,25 mg/Kg) por aproximadamente 14 dias (episódio de DT), C, ração comercial padrão *ad libitum* e CP, quantidade de ração pareada ao grupo DT, sendo esta deficiente em tiamina + injeções de tiamina. A deficiência foi revertida a partir do 14º dia (manifestação dos sinais neurológicos), com a administração de injeções de tiamina (100mg/Kg) e ração comercial padrão durante 30 dias (=período de recuperação). Abcissa= dias de tratamento.

Os dados de variação de peso, coletados dos ratos *Sprague Dawley*, referentes ao Exp. IV, estão apresentados na **Figura 21**. Conforme descrito na seção Material e Métodos, o modelo de DT utilizado no Exp. IV foi o mesmo dos experimentos realizados com a linhagem *Wistar*. Os grupos experimentais são: CP e CP-LAM (iguais em termos de tratamento, e a diferença é apenas a Experiência Cognitiva no LAM) e DT e DT-LAM (iguais em termos de tratamento e a diferença é apenas a Experiência

Cognitiva no LAM). Os animais dos grupos rotulados como LAM foram submetidos ao teste comportamental no final do experimento, mas nesta fase de desenvolvimento do modelo, não existe diferença de tratamento entre eles.

Os resultados obtidos em relação ao perfil da curva de variação de peso foram bastante similares àqueles obtidos para os ratos *Wistar*, e apresentados acima. Podemos observar um ganho de peso nos dias iniciais do episódio de DT, seguido de uma redução do peso dos animais do grupo DT. Através do teste estatístico ANOVA MR, dois fatores (tratamento x dias/tempo) observamos efeitos significativos da DT ($F_{(3,36)}=4,462$ $P=0,0092$) e do tempo ($F_{(25,900)}=409,7$ $P<0,0001$) e interação significativa dos tratamentos e tempo ($F_{(75,900)}=15,17$ $P<0,0001$). A redução do peso dos animais deficientes começou a ocorrer por volta do 13º dia, onde observamos uma diferença significativa entre o grupo DT (293,83 +/- 7,5) e os animais do grupo CP (337,75 +/- 12,38), com uma redução média de peso de aproximadamente 41g (13%), $p=0,008$. Como o desenho experimental do Exp. IV incluiu a realização de teste comportamental, com parte dos animais CP e parte dos animais deficientes (DT), o total de grupos experimentais foi de 4 grupos: CP, CP-LAM, DT e DT-LAM. Como esperado, as comparações entre os grupos CP-LAM x DT-LAM também indicaram diferença significativa no 13º de deficiência: CP-LAM (324,50 +/- 6,7) vs. DT-LAM (282,82 +/- 4,0), $p=0,013$. A diferença entre animais CP e DT se intensifica no 15º dia, com 20% de redução: CP (338,50 +/- 11,7) vs. DT (276,00 +/- 6,7), $p=0<0,0001$ e CP-LAM (332,37 +/- 5,0) vs. DT-LAM (267,33 +/- 3,9), $p=<0,0001$.

Os sinais neurológicos da DT foram observados apenas nos animais dos grupos DTs e não nos animais dos grupos CPs. Observamos que os animais DT apresentaram sinais neurológicos, como convulsão e perda do reflexo de endireitamento, por volta do 14º dia (mediana dos dados), conforme pode ser observado na Curva de Sobrevivência

apresentada na **Figura 20**. Ou seja, um dia após o observado no modelo desenvolvido com a linhagem *Wistar*.

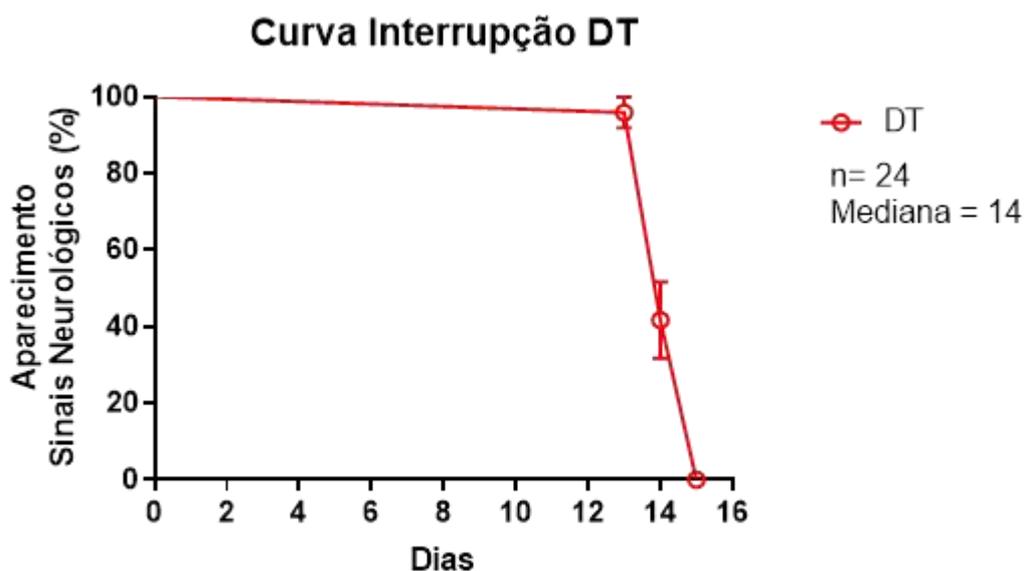


Figura 20: Curva de Sobrevivência

Expressa em manifestação de sinais neurológicos durante o episódio de DT, momento em que ocorreu a interrupção da deficiência. 100% representa o número de animais (n=24) do grupo DT do Exp. IV. Por volta do dia 14 mais de 60% dos animais já tinham apresentado os sinais neurológicos de perda do reflexo de endireitamento e convulsão. Os dados estão expressos em Média +/- SEM.

A partir do 24º dia, observamos que a média dos pesos dos animais dos grupos DTs se aproximou da média dos animais dos grupos CPs, não havendo mais diferença significativa entre eles (CP [366,12 +/- 13,5), vs. DT (343,33 +/- 7,2), p=0,08 e CP-LAM (359,25 +/- 5,8) vs. DT-LAM (336,16 +/- 3,7), p=0,08].

A partir do 31º dia de tratamento, os animais dos dois grupos (CP e DT), que iriam ser ou não submetidos ao teste comportamental (LAM), apresentaram estabilidade na variação do peso, uma média de peso = 380 g. Testes *post hoc* de Tukey mostram: $p=0,50$, CP (396,75 +/- 9,5) vs. DT (383,33 +/- 5,5) e $p=0,13$, [CP-LAM (379,25 +/- 6,8) vs. DT-LAM (358,33 +/- 4,2)] (**Figura 21**).

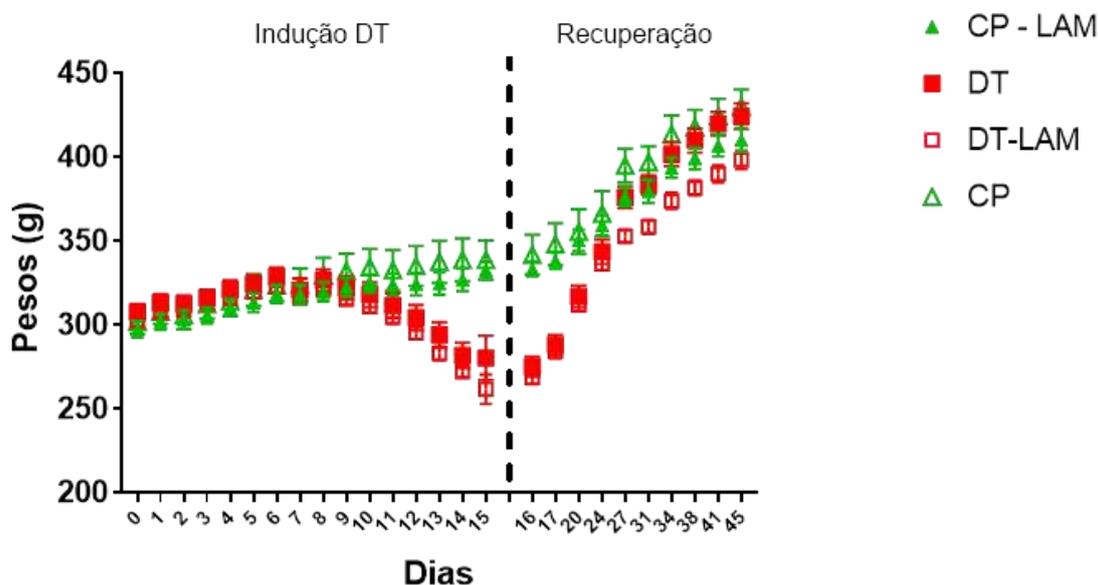


Figura 21: Variação do peso corporal (Média +/- SEM), em gramas (g), dos animais dos quatro grupos experimentais. CP e CP-LAM (diferença em relação à experiência cognitiva) e DT e DT-LAM (diferença em relação à experiência cognitiva). DT

Tratamento com ração deficiente em tiamina *ad libitum*, associada a injeções de pirritiamina 0,25 mg/Kg) por aproximadamente 14 dias (episódio de DT), CP, quantidade de ração pareada ao grupo DT, sendo esta deficiente em tiamina + injeções de tiamina. A deficiência foi revertida a partir do 15º dia (manifestação dos sinais neurológicos), com a administração de injeções de tiamina (100mg/Kg) e ração comercial padrão durante 30 dias (=período de recuperação). Abcissa= dias de tratamento.

Estudos Comportamentais: aspectos cognitivos espaciais

Nesta etapa do estudo avaliamos, através de testes comportamentais no LAM, o desempenho dos ratos *Wistar* (Exp. II e III) e *Sprague Dawley* (Exp. IV). Os testes cognitivos foram realizados após os animais serem submetidos a um episódio de DT, seguido de um período de recuperação de 30 dias.

Dados Comportamentais dos Experimentos II e III: ratos Wistar

Memória Espacial Operacional:

A **Figura 22, Painel A**, mostra os dados do desempenho dos animais no teste para Memória Operacional. Na avaliação do desempenho dos animais *Wistar*, ANOVA MR, (tratamento/DT x tentativas/tempo) mostrou efeito significativo da DT [$F_{(1,33)}=12,71$ $P=0,001$] para o desempenho no 1º dia: treino com três tentativas. Observamos que o desempenho dos animais deficientes (grupo DT), expresso como latência (s) para encontrar a plataforma. Houve também efeito significativo das tentativas ($F_{(2,66)}=12,04$ $P<0,0001$) e interação significativa da DT e tempo ($F_{(2,66)}=4,889$ $P=0,0105$). Enquanto os animais do grupo DT não apresentaram melhora no desempenho ao longo das tentativas (57s +/- 2,0 nas 1ª e 2ª e 51s +/- 3,1, na 3ª), os animais do grupo CP melhoraram o desempenho ao longo das tentativas: de 56s +/- 2,2 na 1ª; 44,8 +/- 5,2 na 2ª tentativa ($p=0,06$) e 28,82 +/- 5,7 na 3ª tentativa ($p=0,0001$), realizadas no 1º dia. Esses dados indicaram uma dificuldade dos animais deficientes na localização da plataforma (aquisição e teste).

As análises estatísticas, do 2º e 3º dias de testes, mostraram melhora nos tempos ao longo das tentativas: da 1ª para a 3ª em cada dia. Com efeitos significativos do tratamento/DT no 2º dia ($F_{(1,33)}=14,97$ $P=0,0005$) e no 3º dia ($F_{(1,33)}=23,11$ $P<0,0001$). Ocorreu um ganho médio de 81% no desempenho dos animais do grupo controle (CP) ao longo das tentativas. 1ª tentativa= 47s +/- 4,9, chegando a 9s +/- 1,4 na 3ª, enquanto os animais do grupo DT conseguiram apenas 35% de melhora entre a 1ª (55s +/- 2,5), 2ª (44s +/- 4,3) e 3ª tentativa (35s +/- 4,8), no segundo dia. Teste *Post hoc* Sidak, mostrou diferença entre os grupos no segundo dia, de quase 2x na 2ª tentativa ($p=0,0072$) e 4x na 3ª tentativa ($p<0,0001$). No terceiro dia do teste, os dados mostraram maior diferença entre os grupos CP e DT, com diferenças acima de 3x para a 2ª tentativa (CP: 12s +/- 2,18, DT: 39,1 +/- 4,7, $p<0,0001$) e acima de 4x para a 3ª tentativa (CP: 9,5s +/- 1,7, DT: 41,9 +/- 4,9, $p<0,0001$). Os dados do desempenho dos animais nos três dias do teste da memória operacional estão apresentados na **Figura 22**.

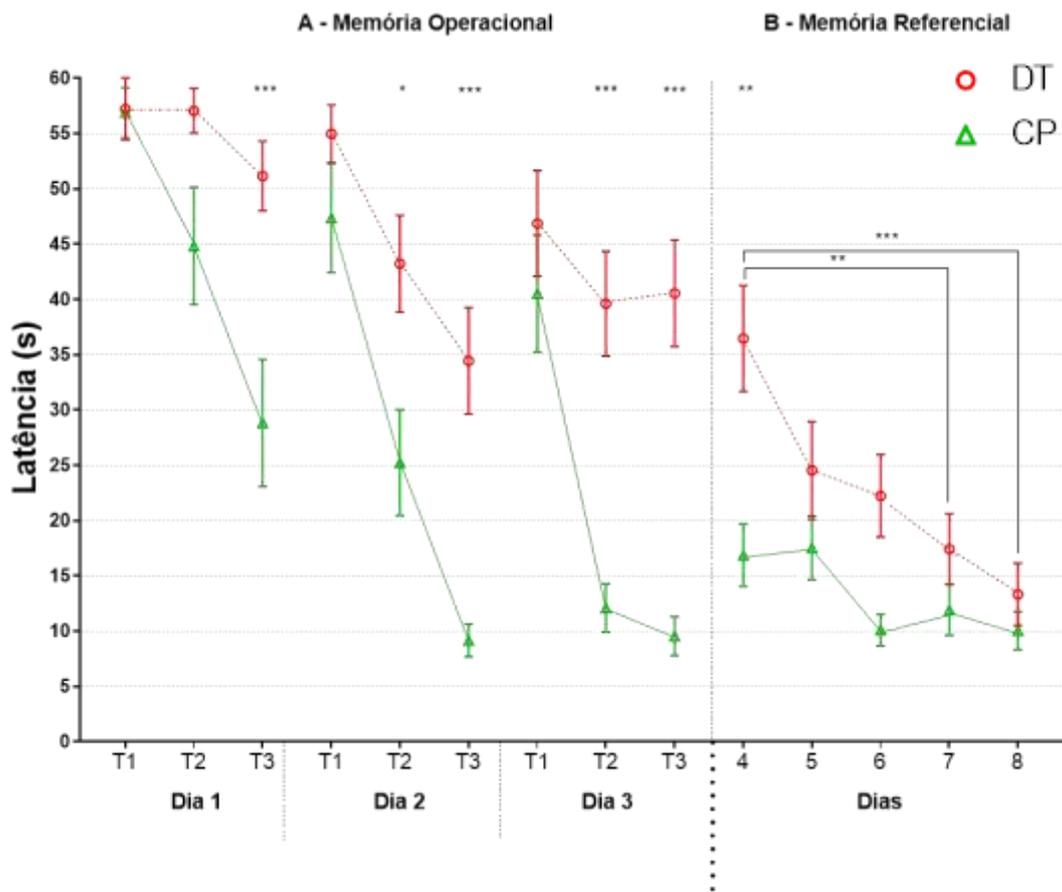


Figura 22: Curvas de Aprendizagem e Memória Espacial Operacional e de Referencia, expressos como latência para encontrar a plataforma.

Aprendizado e Memória operacional: 3 primeiros dias, com 3 tentativas (T1, T2 e T3) por sessão. A 1ª tentativa refere ao aprendizado da nova posição da plataforma em cada sessão, seguida de 2 tentativas, testes de memória operacional. ANOVA MR, mostrou efeito significativo da DT, das tentativas e interação.

Testes *post hoc* (Sidak), comparando CP vs DT, com os dados do 1º Dia= *** $p=0,0001$ (T3); 2º Dia= * $p=0,0040$ (T2) e *** $p<0,0001$ (T3); 3º Dia= *** $p<0,0001$ (T2 e T3).

Aprendizado e Memória de Referência: 4º dia até o 8º dia. O desempenho é expresso como a média de 4 tentativas por sessão. ANOVA MR, ANOVA MR, mostrou efeito significativo da DT, das sessões e interação.

Testes *post hoc* (Sidak) mostraram: Intergrupo 4º dia ** $p=0,0003$ ** Intragrupo: (grupo DT) 4º Dia vs. 5º Dia $p=0,0003$; 4º Dia vs. 6º Dia $p=0,0002$; 4º Dia vs. 7º Dia $p<0,0001$ e *** 4º Dia vs. 8º Dia $p<0,0001$. Intragrupo (grupo CP): não existe diferença entre as sessões ($p>0,05$). As linhas horizontais indicam SEM.

Eficiência na aquisição da tarefa: Memória Operacional

Ainda em relação à memória operacional, analisamos os efeitos da DT sobre o desempenho dos animais expresso em distância percorrida em cada tentativa e a sua relação com o melhor caminho a percorrer (distância ideal). Esta medida representa um índice da eficiência em relação ao caminho percorrido pelo animal para ir da primeira posição (Início) até a última posição (alvo=reforço=plataforma). Quanto mais próximo de 1 (um) melhor o desempenho ou eficiência do animal (eficiência ideal), indicando que o animal se moveu em linha reta. O desempenho dos animais dos dois grupos (CP e DT, expressos como “Eficiência” estão apresentados na **Figura 23**.

Como relatado acima, para os dados expressos em latência (s), observamos uma melhora (menor latência) significativa no desempenho dos animais ao longo das tentativas de um dia/sessão, que também pode ser expresso como a inclinação da reta, quanto maior a inclinação melhor o desempenho.

Para o desempenho expresso em “Eficiência”, as análises estatísticas mostraram, para o 1º dia, efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,18)}=8,830$ $P=0,0082$), tendência para o efeito do tempo/tentativas ($F_{(2,36)}=2,727$ $P=0,079$) e efeito de interação entre Tratamento/DT x tentativas/Tempo ($F_{(2,36)}=4,168$ $P=0,0235$). Comparações múltiplas (teste Sidak) mostram diferença entre os grupos na 3ª tentativa ($p=0,0013$) com inclinação da reta para o grupo CP de $a=0,1661$, e próximo de 0 ($a=-0,020$) para os animais do grupo DT. No segundo dia, observamos efeitos semelhantes aos encontrados no 1º dia, com efeitos significativos dos tratamento/DT ($F_{(1,33)}=11,46$ $P=0,0018$), e das tentativas/tempo ($F_{(2,66)}=15,96$ $P<0,0001$) e interação entre Tratamento x Tentativas/Tempo ($F_{(2,66)}=3,538$ $P=0,0347$). Neste caso, comparando com o 1º dia, uma alteração na inclinação da curva ($a= -0,019 \pm 0,006$) para os animais do grupo DT e para

o grupo CP ($a = 0,166 \pm 0,026$). Houve uma maior diferença entre os grupos na 3ª tentativa, $p = 0,0002$, com valor 2x maior para os animais do grupo CP em comparação ao grupo DT. Semelhante aos resultados das sessões anteriores (1º e 2º dias), no 3º dia também foi observado efeitos significativos do Tratamento/DT ($F_{(1,33)} = 29,18$ $P < 0,0001$) e das Tentativas/Tempo ($F_{(2,66)} = 6,438$ $P = 0,0028$). Ocorreu interação significativa entre Tratamento/DT e Tentativas/Tempo ($F_{(2,66)} = 6,069$ $P = 0,0038$). O teste Sidak mostra diferenças significativas a partir da 2ª tentativa, com valores 3x maiores para o grupo CP comparado com o DT, $p = 0,0004$ e, acima de 3,5x na 3ª tentativa, quando CP é comparado com DT, $p < 0,0001$. No 3º dia, a inclinação para o grupo CP foi $a = 0,192 \pm 0,05$ e para o grupo DT $a = 0,0033 \pm 0,0007$. **(Figura 23)**.

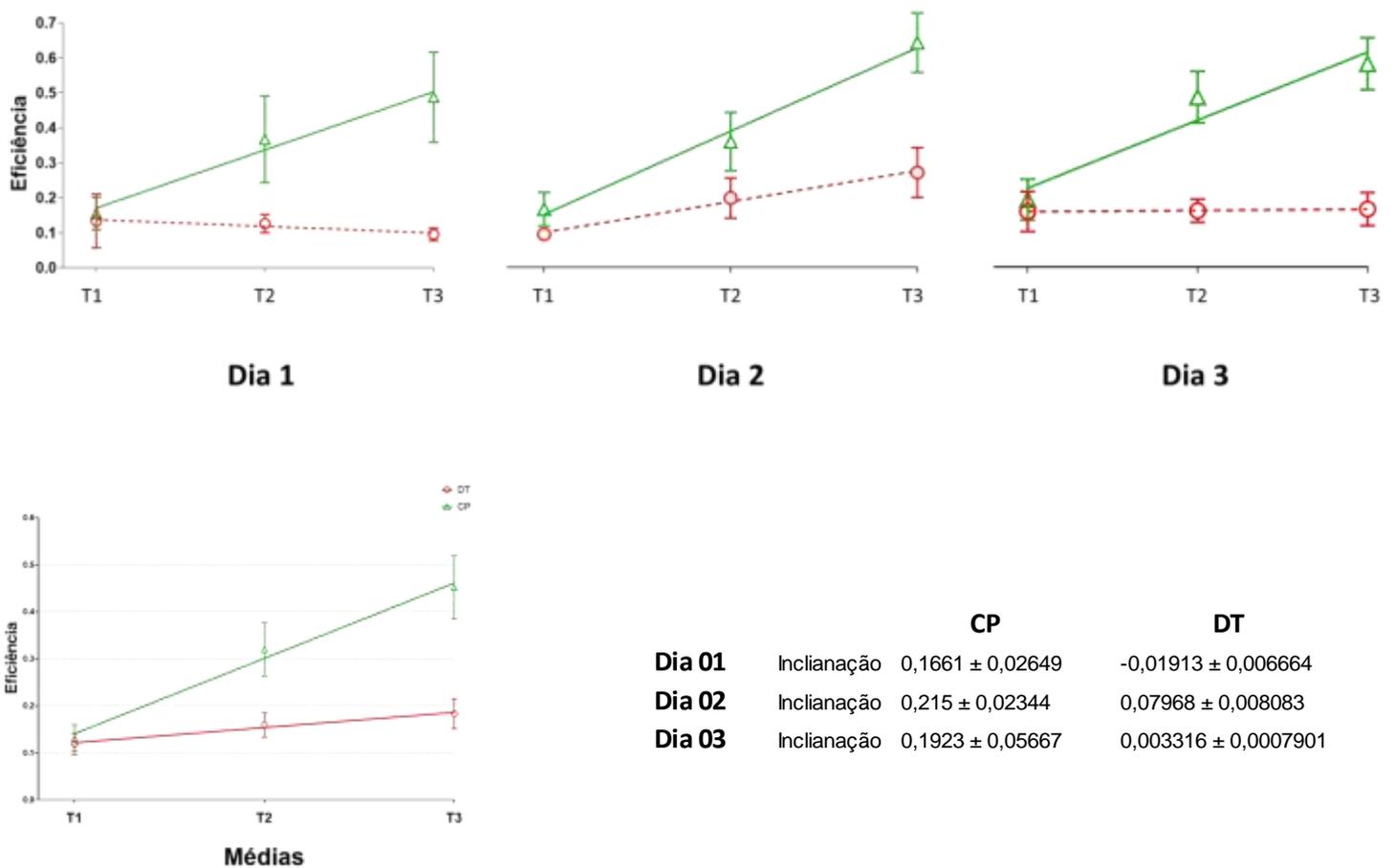


Figura 23: Curvas do Desempenho dos animais no Teste de Memória Operacional, expressos como “Eficiência”, Média +/- SEM, para cada grupo CP e DT, nas três tentativas de cada dia/sessão.

Eficiência= razão entre a distância em linha reta da primeira posição (início) e a última posição (alvo=plataforma) pela distância total percorrida pelo animal, para cada tentativa. E= distância ideal/ distância total percorrida, quanto mais próximo de 1, melhor o desempenho. Linha pontilhada vermelha = Grupo DT e linha verde = animais do grupo CP.

Aprendizado e Memória de Referência e Extinção

Treino em tarefa de memória de referência: um dia após o teste da memória operacional (curso prazo), resultados acima, os animais foram submetidos à tarefa de Aprendizado e Memória de Referência (longo prazo), realizado em sessões

consecutivas, uma por dia. Como descrito em Material e Métodos, cada sessão foi constituída de 4 tentativas, mantendo a plataforma sempre no mesmo local (quadrante alvo) durante as 5 sessões.

A **figura 22** apresenta também as Curvas de Aprendizado e memória espacial de referencia dos animais dos dois grupos experimentais, DT e Controle Pareado na tarefa do LAM. O desempenho dos animais está expresso em latência (s). ANOVA 2 fatores MR (Tratamento e Dias/tempo) mostra efeitos significativos da deficiência de tiamina ($F(1,34)=7,569$ $P=0,010$) e também para o fator tempo (Dias) ($F(4,136)=12,09$ $P<0,000$) no processo de aprendizagem espacial. Houve interação significativa entre os fatores Tratamento/DT e Dias/Tempo ($F(4,136)=3,498$ $P=0,009$). O teste *post hoc* Sidak mostrou diferença intergrupos no 4º e no 6º dia, de quase 2,5 vezes a mais para o grupo DT (4º Dia: 36,46 +/- 4,7 e 6º Dia: 22,23 +/- 3,7) em comparação com grupo CP (4º Dia: 17s +/- 2,8 e 6º Dia: 10s +/- 1,4, $p=0,0003$ e $p=0,031$), respectivamente. A análise intragrupo (grupo DT) entre 4º Dia vs. 5º Dia $p=0,0003$; 4º Dia vs. 6º Dia $p=0,0002$; 4º Dia vs. 7º Dia $p<0,0001$ e 4º Dia vs. 8º Dia $p<0,0001$. Intragrupo (grupo CP): não houve diferença estatística entre as sessões ($p>0,05$). (**Figura 22**).

Como mencionado acima, no primeiro dia do treino da tarefa de “Memória de Referência”, observa-se uma diferença significativa $p=0,0003$ entre o desempenho dos animais do grupo CP e os animais do grupo DT, indicando que os animais do grupo CP apresentam um desempenho significativamente melhor comparado aos animais do grupo DT desde o primeiro dia do treino. Essa diferença pode ser explicada pelo fato dos animais terem sido previamente expostos ao LAM, durante os três dias do teste da Memória Operacional. Ou seja, tiveram uma oportunidade prévia de aprender a regra da tarefa. A diferença observada na 1ª sessão, indica que os animais do grupo CP “lembraram” da regra e, portanto, iniciaram a tarefa com bom desempenho. No entanto,

os animais deficientes, não “lembraram” as regras da experiência anterior e iniciaram o treino como se estivessem sido colocados pela primeira vez no LAM. Isto pode explicar o fato da curva de aprendizado dos animais controles (CP), diferentemente dos animais deficientes (DT), não indicar mudanças significativas no desempenho, ao longo do tempo. Ou seja, quando se compara os dados obtidos entre as sessões. Esses resultados serão melhor discutidos na seção Discussão.

Teste comprobatório e Extinção: Um dia após o último dia do treino, ou seja, no sexto dia, os animais foram submetidos ao teste comprobatório para avaliar a Memória de Referência e a Extinção do comportamento aprendido. Conforme descrito na seção Material e Métodos, os animais foram deixados durante 2 minutos no LAM sem a presença da plataforma. No primeiro minuto do tempo (60s dos 120 s totais), o desempenho dos animais foi registrado para avaliar a memória, através das medidas de quanto tempo o animal permanecia nadando no quadrante alvo (*NW*) e quantas vezes cruzava o local onde se encontrava a plataforma durante o treino.

No segundo minuto do teste as medidas do desempenho foram utilizadas para avaliar a extinção do comportamento, considerando que o animal na ausência do reforço (plataforma), deveria extinguir o comportamento aprendido e procurar a plataforma em outro local. Os dados do teste comprobatório são expressos em (i) latência (s) ou (ii) número de vezes que o animal cruza o local onde estava a plataforma durante o treino.

Dados do Teste Comprobatório expressos em Latência (S)

A **figura 24 painéis A e B** apresenta os dados da memória de referência e à extinção do comportamento, respectivamente. Para os dados da **Memória de Referência**, ANOVA com 2 fatores (tratamento e quadrante) não mostrou efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,128)}=4,376^{-5}$ $P=0,9947$), mas ocorreu efeito significativo do quadrante (preferência pelo quadrante, $F_{(3,128)}=34,42$ $P<0,0001$) durante o primeiro minuto do teste (Memória de Referência). O teste de comparações múltiplas (Teste de Turkey) indicou que os animais do grupo DT apresentaram diferenças significativas na preferência pelos quadrantes, nas seguintes comparações: NW vs SE, $p<0,0001$; NW vs NE, $p<0,0001$; SE vs SW $p=0,0005$; NE vs SW $p<0,0001$. Não houve diferença significativa entre: NW vs SW, $p=0,43$. Para o grupo CP: NW vs SE $p<0,0001$; NW vs NE $p<0,0001$ e NW vs SW $p=0,0026$. Não houve diferença significativa para as seguintes comparações: SE vs SW, $p=0,16$ e NE vs SW $p=0,051$. (**Figura 24 – Painel A**). As comparações entre grupos (CP e DT) foram NW $p=0,86$; SE $p>0,99$; NE $p=0,96$; SW $p=0,43$ (Teste de Sidak).

Dados referentes à **Extinção**, segundo minuto do teste comprobatório, ANOVA (tratamento x quadrante) não mostrou efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,128)}=8,565^{-5}$ $P=0,9926$), mas mostrou efeito significativo na preferência por quadrante ($F_{(3,128)}=25,85$ $P<0,0001$). Nos testes de comparações múltiplas (Teste Tukey), verificamos que os animais do grupo DT apresentaram diferenças significativas na preferência pelos quadrantes, nas seguintes comparações: NW vs SE $p<0,0001$; NW vs NE $p<0,0001$; SE vs SW $p=0,0006$ e NE vs SW $p=0,0009$. Os animais do grupo CP apresentaram diferenças significativas entre os quadrantes, nas seguintes comparações: NW vs SE $p=0,0028$; NW vs NE $p<0,0001$, e NE vs SW $p=0,0005$. Não houve diferença significativa para SE vs SW, $p=0,052$ (**Figura 24 – Painel B**). As comparações entre

grupos (CP e DT) foram *NW* $p=0,97$; *SE* $p=0,74$; *NE* $p=0,95$; *SW* $p>0,99$ (Teste de Sidak).

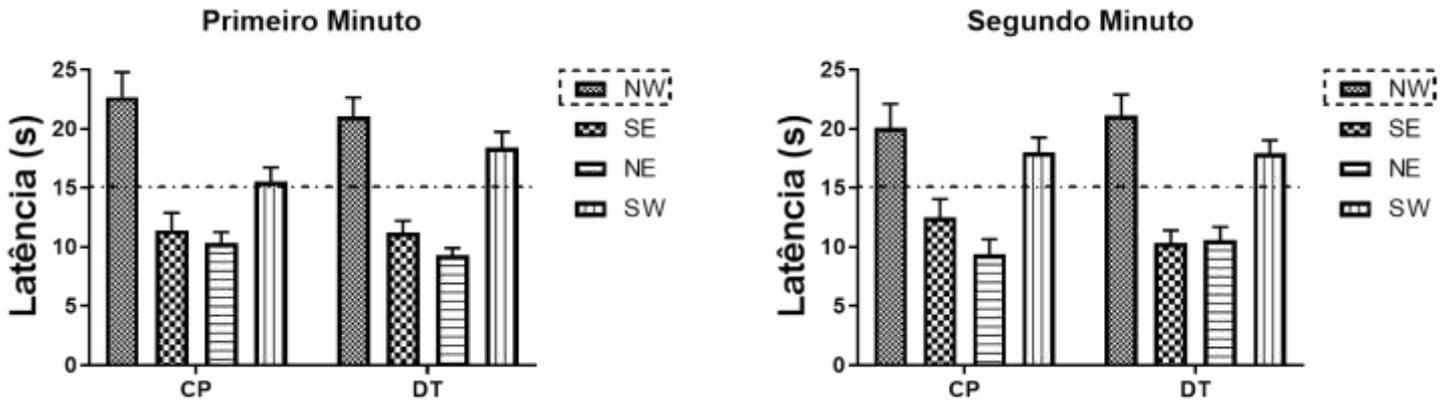


Figura 24: Dados do Teste Comprobatório, expressos em latência (Média +/- SEM): Memória de Referência (Painel A, 1º min) e Extinção (Painel B, 2º min).

Preferência pelo quadrante alvo (NW) para ambos os grupos (DT n=19; CP n=15). = tempo de permanência nos quadrantes. NW tracejado corresponde ao quadrante alvo, no qual a plataforma se encontrava durante o treino. SE: Quadrante oposto, SW: quadrante adjacente esquerdo NE: quadrante adjacente direito.

Memória de Referência (Painel A):

CP: *NW* vs *SE* $p<0,0001$; *NW* vs *NE* $p<0,0001$ e *NW* vs *SW* $p=0,0026$. Não houve diferença significativa entre: *SE* vs *SW*, $p=0,169$; *NE* vs *SW* $p=0,050$.

DT: *NW* vs *SE*, $p<0,0001$; *NW* vs *NE*, $p<0,0001$; *SE* vs *SW* $p=0,0005$; *NE* vs *SW* $p<0,0001$. Não houve diferença significativa entre *NW* vs *SW*, $p=0,430$.

Extinção (Painel B):

CP: *NW* vs *SE* $p=0,0028$; *NW* vs *NE* $p<0,0001$, e *NE* vs *SW* $p=0,0005$. Não houve diferença significativa para *SE* vs *SW*, $p=0,052$ e nem para *NW* vs *SW* $p=0,769$.

DT: *NW* vs *SE* $p<0,0001$; *NW* vs *NE* $p<0,0001$; *SE* vs *SW* $p=0,0006$ e *NE* vs *SW* $p=0,0009$. Não houve diferença significativa entre *NW* vs *SW* $p=0,329$

Dados do Teste Comprobatório expressos em número de vezes que o animal cruza o local onde se encontrava a plataforma durante o treino

ANOVA 2 fatores (Tratamento x tempo), dos dados expressos como número de vezes que os animais cruzam o local onde se encontrava a plataforma durante o treino (plataforma alvo=NW), mostrou que não houve efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,32)}=0,2449$ $P=0,6241$), mas houve efeito significativo do tempo ($F_{(1,32)}=6,469$ $P=0,0160$). Esses dados estão apresentados na **Figura 25**. *Post hoc* (Teste de Fisher) mostrou redução significativa do número de cruzamentos no 2º minuto, para os animais do grupo CP, 38% menor em relação ao 1º minuto, $p=0,05$. A comparação entre o 1º e 2º minuto para os animais do grupo deficiente não mostrou diferença significativa, CP, $p=0,05$ e DT, $p=0,12$, indicando um possível déficit na capacidade de extinção dos animais do grupo DT.

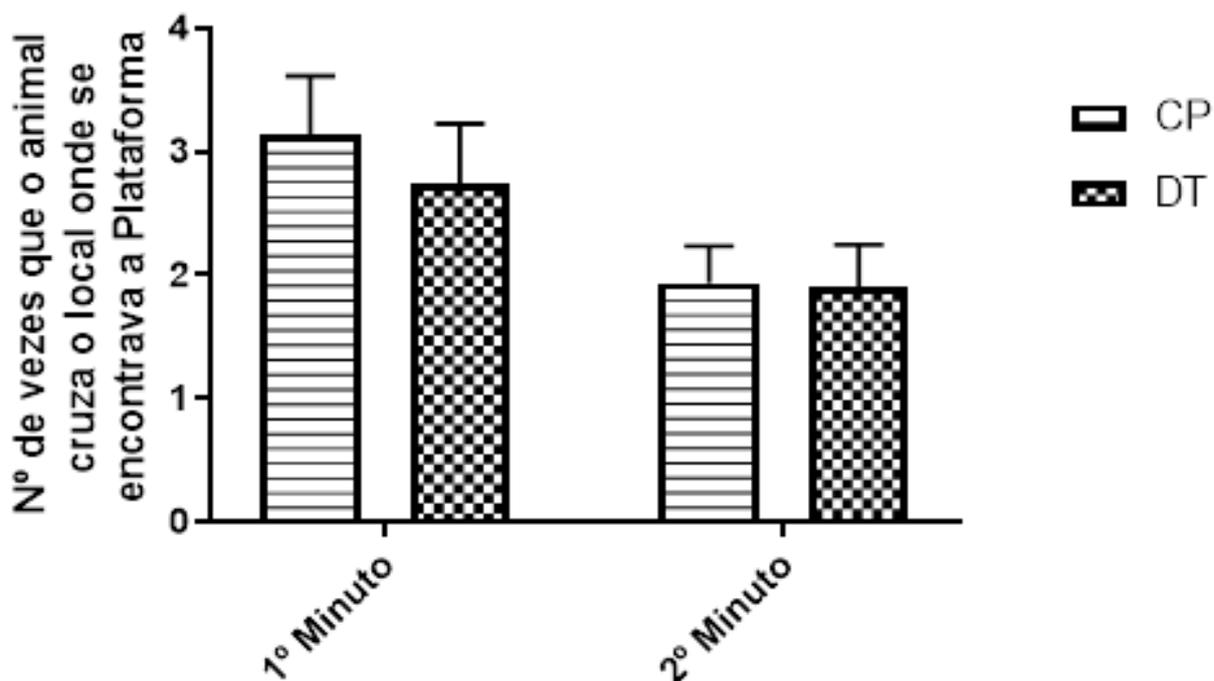


Figura 25: Dados do Teste Comprobatório, expressos como a quantidade de vezes que o animal cruza o local onde se encontrava a plataforma (posição da plataforma durante o treino), Média +/- SEM.

Não houve efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,32)}=0,25$, $p=0,624$), mas houve efeito significativo do tempo ($F_{(1,32)}=6,47$, $p=0,016$). Resultados do teste *post hoc* (Fisher) para comparações entre o 1º min x 2º min: CP, $p=0,05$ e DT, $p=0,12$. As linhas horizontais sobre as barras indicam SEM.

Dados Comportamentais do Experimento IV: ratos *Sprague Dawley*

Memória Espacial Operacional

O perfil geral da curva do desempenho dos animais *Sprague Dawley* (**Figura 26**) é semelhante ao encontrado para os ratos *Wistar* (**Figura 22**). Os ratos *Sprague Dawley* aprenderam a tarefa espacial e os animais deficientes apresentaram um certo atraso no aprendizado e nos testes de memória operacional. Contudo, na avaliação do desempenho dos animais *Sprague Dawley*, ANOVA MR (tratamento/DT x tentativas/tempo) não mostrou efeito significativo da DT [$F_{(1,17)}=0,01787$ $P=0,8952$],

tentativas $F_{(2,34)}=0,9515$ $P=0,3962$; e nem efeito de interação $F_{(2,34)}=0,7407$ $P=0,4843$, para o desempenho no 1º dia.

No 2º dia não observamos efeito de tratamento/DT $F_{(1,17)}=0,3511$ $P=0,5613$, mas observamos efeito de tentativas $F_{(2,34)}=4,010$ $P=0,0273$ e interação dos fatores (tratamento x tentativas) $F_{(2,34)}=3,418$ $P=0,0444$. Teste *post hoc* mostrou que, enquanto os animais do grupo CP apresentaram melhora no desempenho ao longo das tentativas 53,33s +/- 4,45 na 1ª e 53,50s +/- 6,5 na 2ª (T1 vs T2, $p=0,99$) e 31,17s +/- 3,1, na 3ª (T1 vs T3, $p=0,022$ e T2 vs T3, $p=0,021$), os animais do grupo DP não melhoraram o desempenho: de 56,0s +/- 3,9 na 1ª; 44,11 +/- 6,8 na 2ª tentativa (T1 vs T2, $p=0,194$) e 48,9 +/- 5,3 na 3ª tentativa (T1 vs T3, $p=0,547$ e T2 vs T3, $p=0,756$).

No 3º dia/sessão, novamente não observamos efeito de tratamento $F_{(1,17)}=0,1418$ $P=0,7112$, tentativa $F_{(2,34)}=0,3378$ $P=0,7157$ e nem interação das variáveis $F_{(2,34)}=2,135$ $P=0,1338$.

Na análise dos dados do 4º dia, não observamos efeito de tratamento $F_{(1,17)}=2,035$ $P=0,1718$; mas observamos efeito em relação as tentativas $F_{(2,34)}=9,809$ $P=0,0004$ e ausência de interação (tratamento DT x tentativas) $F_{(2,34)}=0,3750$ $P=0,6901$. Teste *post hoc* Tukey's mostrou diferença entre a 1ª vs 2ª, com redução 56% ($p=0,011$) e diferença entre a 1ª vs 3ª, com redução 50% ($p=0,024$) (1ª tentativa = 43s), para os animais do grupo CP. Os animais do grupo DT apresentaram diferença apenas entre a 1ª vs 3ª, com redução 37% ($p=0,0310$) e tendência a uma diferença entre 1ª vs 2ª, com redução 32% ($p=0,070$) (1ª tentativa = 47s) (**Figura 26**).

Aprendizado e Memória Espacial de Referência e Extinção

Treino em tarefa de memória de referência: Em relação à memória de referência, como já destacado anteriormente, foram realizadas 5 sessões consecutivas (uma por dia) com plataforma fixa, denominado como período de aprendizado. Observamos uma tendência para o efeito de tratamento, $F_{(1,17)}=3,947$ $P=0,0633$, efeito significativo para a variável dia/tempo, $F_{(4,68)}=6,288$ $P=0,0002$ e ausência de efeito de interação, $F_{(4,68)}=0,72$ $P=0,581$. Teste *post hoc* (Sidak) mostrou que para os animais do grupo CP, não existem diferenças entre os dias (5, 6, 7, 8 e 9, $p>0,05$). Como para os animais *Wistar*, esse achado pode ser explicado devido a experiência previa dos animais em relação à tarefa (encontrar uma plataforma submersa). No entanto, o grupo DT mostrou diferença entre os dias 5 vs cada um dos três últimos dias de aprendizado (7º, 8º e 9º dias), com redução de 55% na latência. Desempenho entre o dia 5 vs dia 7, $p=0,0077$; dia 5 vs dia 8, $p=0,0035$; dia 5 vs dia 9, $p=0,0067$. Detalhes na Discussão. **(Figura 26).**

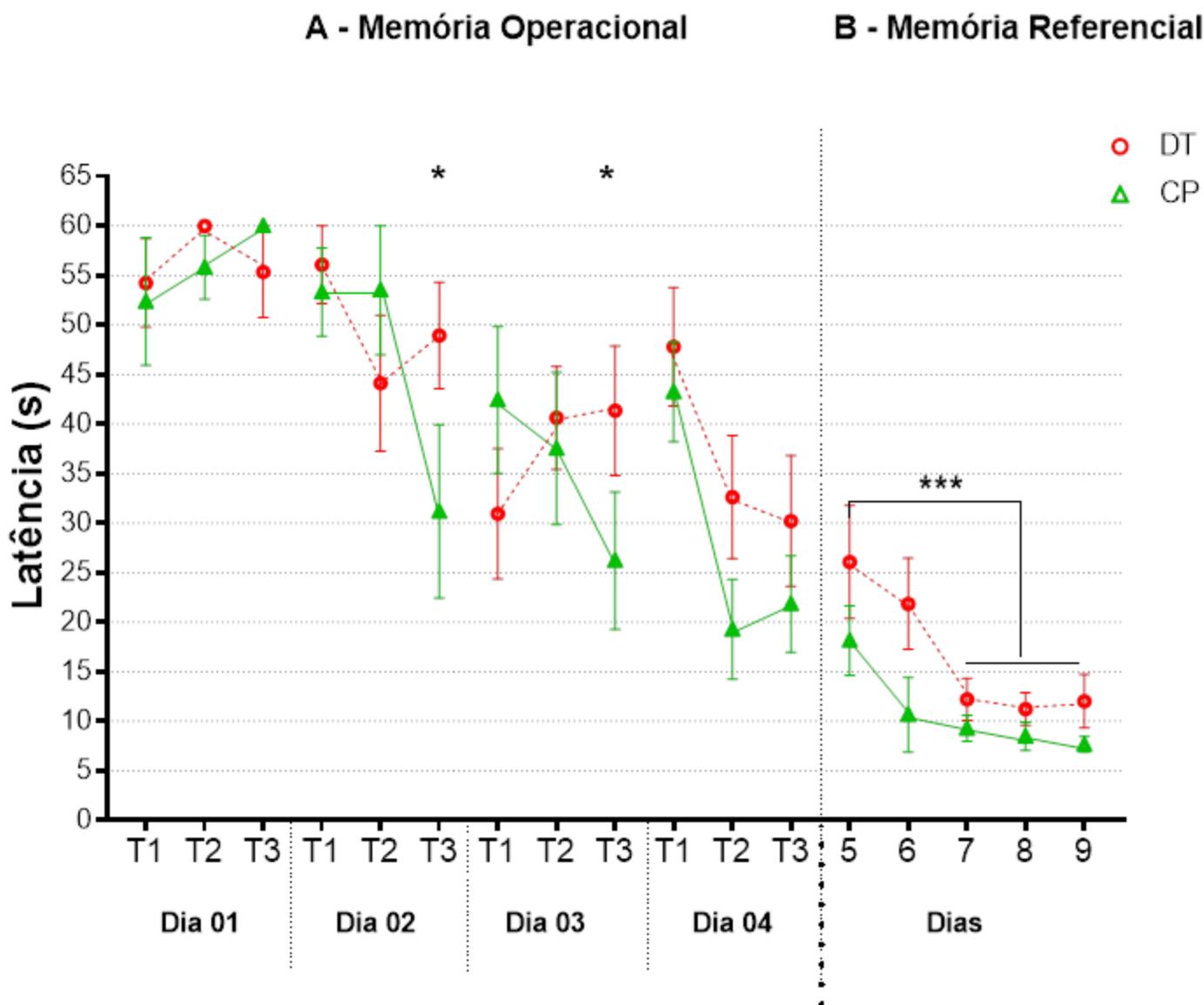


Figura 26: Curvas de Aprendizagem e Memória Espacial Operacional e de Referência, expressos como latência para encontrar a plataforma.

Aprendizado e Memória operacional: foram realizados nos 4 primeiros dias, com 3 tentativas (T1, T2 e T3) por sessão. A 1ª tentativa refere ao aprendizado da nova posição da plataforma por sessão, seguida de 2 tentativas como testes de memória operacional. ANOVA MR, não mostrou efeito significativo da DT, nem das tentativas e nem interação para os 1º e 3º dias. Testes *post hoc* (Sidak) com os dados do 2º Dia: * $p=0,022$ (T3); 4º Dia: * $p=0,031$ (T3).

Aprendizado e Memória de Referência: Do 5º dia até o 9º dia. O desempenho é expresso como a média de 4 tentativas por sessão. ANOVA MR, não mostrou efeito significativo da DT, apenas uma tendência ($p=0,06$). Houve efeito das sessões e ausência de interação. Testes *post hoc* (Sidak) mostraram: Intragrupo: (grupo DT) 5º Dia vs. 7º Dia $p=0,008$; 5º Dia vs. 8º Dia $p=0,04$; 5º Dia vs. 9º Dia $p=0,007$. As linhas horizontais indicam SEM.

Dados do Teste Comprobatório expressos em número de vezes que o animal cruza o local onde se encontrava a plataforma durante o treino

ANOVA 2 fatores (Tratamento x tempo), dos dados expressos como número de vezes que os animais cruzam o local onde se encontrava a plataforma durante o treino (plataforma alvo=NW), observamos efeito apenas em relação do tempo, $F_{(2,34)}=9,366$, $P=0,0006$ e; ausência de efeito de tratamento, $F_{(1,17)}=0,5945$, $P=0,4513$ e; interação, $F_{(2,34)}=0,08$, $P=0,925$. O teste *Post hoc* (Fisher) mostrou redução no desempenho tanto no 2º como 3º minutos, para ambos os grupos em relação ao 1º minuto de cada grupo respectivamente. Em média 4 e 3,5 vezes menores, respectivamente. Animais do grupo CP apresentaram maior redução (50%) no 3º minuto ($p=0,0084$) e 44% no segundo minuto ($p=0,0196$). O grupo DT, tanto no 2º min quanto no 3º min, apresentou uma redução de 47%, comparado com o primeiro minuto ($p=0,0111$). (**Figura 27**).

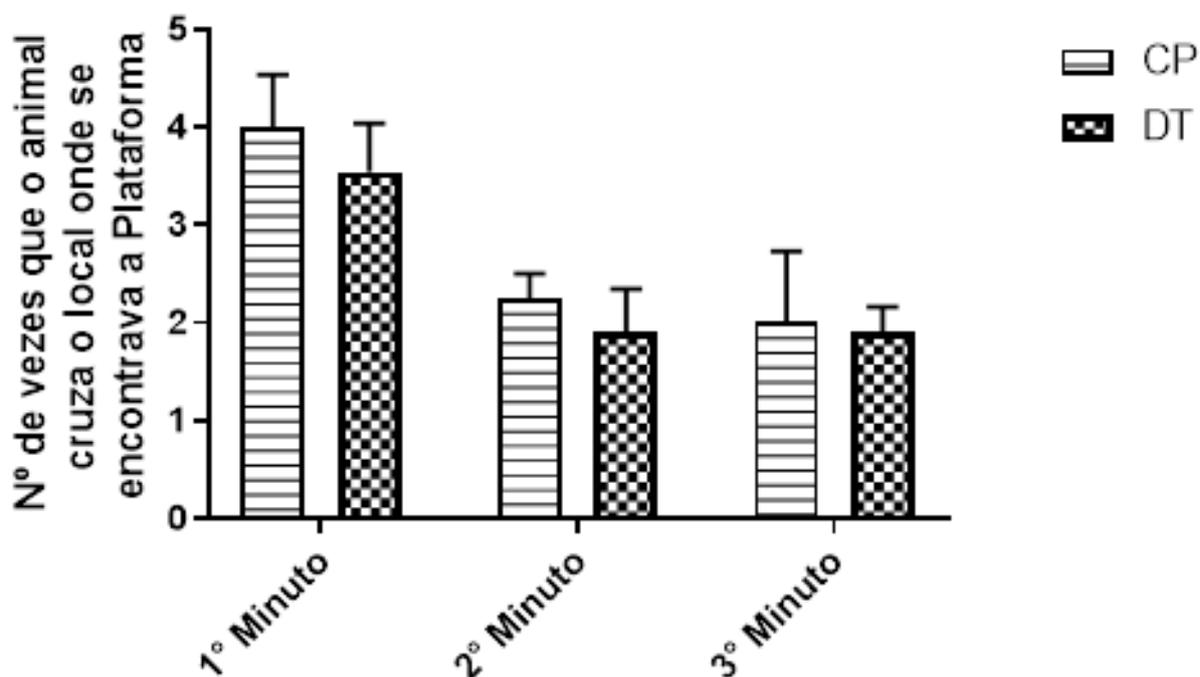


Figura 27: Dados do Teste Comprobatório, expressos como a quantidade de vezes que o animal cruza o local onde se encontrava a plataforma (posição da plataforma durante o treino), Média +/- SEM.

Não houve efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,17)}=0,59$, $p=0,451$), mas houve efeito significativo do tempo ($F_{(1,34)}=9,37$, $p=0,001$). Resultados do teste *post hoc* (Fisher) para comparações entre o 1º min x 2º min: CP, $p=0,019$ e DT, $p=0,01$. As linhas horizontais sobre as barras indicam SEM.

Estudos Histológicos e Neuroquímicos

Concentrações de tiamina e isoformas fosforiladas:

Uma das questões levantadas em nosso estudo foi se o nível de tiamina e suas formas fosforiladas nas três regiões cerebrais, CPF, tálamo e hipocampo, teriam algum papel na diferença de suscetibilidade observada por outros autores e pelo nosso grupo,

aos efeitos da deficiência de tiamina. A seleção das três regiões foi baseada em alguns critérios, como papel central no tipo de tarefas comportamentais às quais os animais foram submetidos (cognição espacial em termos gerais=**hipocampo (H)**); memória operacional =**CPF e hipocampo** e; extinção do comportamento=**CPF e hipocampo**) e na diferença de susceptibilidade, aos efeitos da deficiência, entre essas regiões: **Tálamo (T)**, sendo mais susceptível-lesões morfológicas e **CPF e H**, sendo comparativamente ao **T**, menos susceptível. Tendo como base este questionamento, buscamos averiguar possíveis diferenças nos níveis dessas moléculas nas condições controle (grupo controle pareado) e na deficiência de tiamina em diferentes estágios.

1. *Amostras do CPF, H e T coletadas no tempo T1=10^o dia do episódio de DT*

Todos os dados estão apresentados na Tabela IV.

ANOVA (2x4: tratamento/DT x componentes: T, TMP, TDP, TTP)

CPF: ANOVA (2x4) mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina ($F_{(1,24)}=57,12$ $P<0,0001$) nos níveis de T, TMP, TDP e TTP no **CPF**, no estágio intermediário do episódio de DT (10^o dias de deficiência=T1). Testes *post hoc* (Sidak) mostraram, com exceção do TTP ($p>0,05$), alterações significativas nos níveis de TMP $p<0,0001$ e TDP ($p=0,0002$), indicando diminuição de 76% de cada uma delas, no grupo PTD-I. As concentrações de tiamina não foram possíveis de serem detectadas, devido à alta concentração, com saturação do detector do HPLC.

Hipocampo: ANOVA (2x4) também mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina ($F_{(1,24)}=9,975$ $P=0,0042$), dos componentes ($F_{(3,24)}=11,66$ $P<0,0001$) e interação entre tratamento/DT x componentes ($F_{(3,24)}=4,101$ $P=0,0175$) no estágio

intermediário do episódio de DT (10^o dias de deficiência=T1). Observa-se uma redução de 75% entre as formas fosforiladas (TMP+TDP) no grupo PTD-I comparado ao grupo CP. Testes *post hoc* (Sidak), comparando o nível de cada componente entre os dois grupos, PTD-I e CP, mostra uma diferença significativa (p=0,0005) apenas nas concentrações da tiamina, 25% comparado ao controle. Para os demais componentes não houve diferença significativa entre os dois grupos, em vista da alta variabilidade dos valores.

Tálamo: ANOVA (2x4) não mostrou efeito do tratamento/DT ($F_{(1,24)}=0,008303$ $P=0,9282$), nem dos componentes [$F_{(3,24)}=2,674$ $P=0,0700$] e nem interação $F_{(3,24)}=1,289$ $P=0,3010$, no estágio intermediário do episódio de DT (10^o dias de deficiência=T1).

2. *Amostras do CPF, H e T coletadas no tempo T2=14^o dia do episódio de DT = Todos os dados estão apresentados na Tabela IV.*

ANOVA (2x4: tratamento/DT x componentes: T, TMP, TDP, TTP

CPF: ANOVA (2x4) não mostrou efeito do tratamento/DT $F_{(1,24)}=0,05679$ $P=0,8137$ houve efeito significativo dos componentes $F_{(3,24)}=6,012$ $P=0,0033$ e não houve efeito de interação $F_{(3,24)}=0,5982$ $P=0,622$.

Hipocampo: ANOVA (2x4) mostrou efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,24)}=42,52$ $P<0,0001$), do componente $F_{(3,24)}=14,33$ $P<0,0001$ e interação do tratamento/DT e componentes $F_{(3,24)}=6,149$ $P=0,0030$.

Comparando as formas fosforiladas (TMP+TDP) entre os grupos CP e DT, observa-se uma redução de 84% nos animais deficientes comparado aos animais controles. Testes *post hoc* (Sidak) mostraram diferenças significativas nos níveis de TMP ($p=0,0001$) e TDP ($p<0,0001$) quando se compara os grupos CP e DT. Por outro lado, não se verifica diferença significativa para a T ($p=0,058$) e TTP ($p>0,999$).

Tálamo: ANOVA (2x4) mostrou efeitos significativos do tratamento/DT $F_{(1,24)}=13,71$ $P=0,0011$, do componente $F_{(3,24)}=6,521$ $P=0,0022$ e interação do tratamento/DT e componentes $F_{(3,24)}=3,227$ $P=0,0403$.

Comparando as formas fosforiladas (TMP+TDP) entre os grupos CP e DT, observa-se uma redução similar ao hipocampo, ou seja, de 84% nos animais deficientes comparado aos animais controles. Testes *post hoc* (Sidak) mostraram diferença significativa nos níveis de T ($p=0,001$), quando se compara os grupos CP e PTDII-4h. Por outro lado, não se verifica diferença significativa para a TMP ($p=0,67$) e TDP ($p=0,26$) e TTP ($p>0,999$).

3. *Amostras do CPF, H e T coletadas no tempo T6=52º dia após tratamentos (episódio de DT, recuperação e LAM): grupo DT, após 4h do aparecimento dos sinais neurológicos e após 30 dias de recuperação e LAM. Todos os dados estão apresentados na Tabela IV.*

ANOVA (2x4: tratamento/DT x componentes: T, TMP, TDP, TTP

CPF: ANOVA (2x4) não mostrou efeito do tratamento/DT $F_{(1,24)}=0,08762$ $P=0,7698$, houve efeito significativo dos componentes $F_{(3,24)}=97,79$ $P<0,0001$ e não houve efeito de interação $F_{(3,24)}=0,5843$ $P=0,6311$, no estágio grave, recuperação e após LAM .

Hipocampo: ANOVA (2x4) não mostrou efeito do tratamento/DT $F_{(1,24)}=0,002539$ $P=0,9602$, houve efeito significativo dos componentes $F_{(3,24)}=73,22$ $P<0,0001$ e não houve efeito de interação $F_{(3,24)}=0,04255$ $P=0,9880$. no estágio grave, recuperação e após LAM

Tálamo: ANOVA (2x4) não mostrou efeito do tratamento/DT $F_{(1,24)}=0,3602$ $P=0,5540$, houve efeito significativo dos componentes $F_{(3,24)}=393,1$ $P<0$, e não houve efeito de interação $F_{(3,24)}=0,1402$ $P=0,9349$. no estágio grave, recuperação e após LAM

Tabela IV: Tiamina e derivados (CPF, H e T)

	Cortéx Pré Frontal					
	11º Dia		14 - 15 Dia		54º Dia	
	Durante episódio TD		Último dia episódio TD		4 semanas de recuperação	
CP						
<i>TTP</i>	57,88 ± 16,23	(0,10)	62,84 ± 7,24	(0,04)	77,00 ± 10,11	(0,16)
<i>TDP</i>	23.735,37 ± 3071,31	(41,97)	40.444,25 ± 4394,63	(28,09)	23.252,63 ± 978,97	(50,09)
<i>TMP</i>	23.229,86 ± 3338,41	(41,08)	21.746,97 ± 3976,09	(15,10)	17.849,98 ± 455,83	(38,45)
<i>B1</i>	9.525,78 ± 3702,45	(16,85)	81.714,93 ± 23317,10	(56,76)	5.242,85 ± 1058,73	(11,29)
DT						
<i>TTP</i>	370,78 ± 178,94	(3,30)	2,81 ± 2,81	(0,00)	82,81 ± 4,94	(0,17)
<i>TDP</i>	8.821,12 ± 1250,43	(78,53) a	10.553,85 ± 1062,04	(8,32)	25.400,91 ± 3728,75	(53,14)
<i>TMP</i>	2.041,00 ± 264,55	(18,17) b	1.371,27 ± 312,08	(1,08)	19.041,50 ± 2258,50	(39,84)
<i>B1</i>	Detector saurado	-	114.856,23 ± 67971,81	(154,15) (90,59)	3.271,69 ± 519,00	(6,84)

		Hipocampo					
		11º Dia		14 - 15 Dia		54º Dia	
		Durante episódio TD		Último dia episódio TD		4 semanas de recuperação	
CP							
<i>TTP</i>	28,16 ± 6,99	(0,05)	40,31 ± 5,22	(0,14)	51,88 ± 19,38	(0,30)	
<i>TDP</i>	9.478,04 ± 937,30	(15,92)	12.251,27 ± 763,63	(41,84)	8.558,83 ± 1039,47	(50,16)	
<i>TMP</i>	7.053,07 ± 692,19	(11,84)	9.110,52 ± 1219,39	(31,11)	7.252,67 ± 722,44	(42,51)	
<i>B1</i>	42.990,56 ± 13267,21	(72,19)	7.880,03 ± 2906,97	(26,91)	1.198,36 ± 181,89	(7,02)	
DT							
<i>TTP</i>	0 ± 0	(0,00)	0 ± 0	(0,00)	29,55 ± 3,49	(0,17)	
<i>TDP</i>	3.153,79 ± 416,16	(20,98) <i>g</i>	3.084,98 ± 203,48	(44,31) <i>d, i</i>	8.606,52 ± 1110,09	(50,14)	
<i>TMP</i>	975,50 ± 77,27	(6,49) <i>h</i>	482,76 ± 80,27	(6,93) <i>e, j</i>	7.543,96 ± 1105,89	(43,95)	
<i>B1</i>	10.901,47 ± 4597,86	(72,53) <i>c, l</i>	3.394,87 ± 1071,74	(48,76) <i>m</i>	983,81 ± 124,83	(5,73)	

		Tálamo					
		11º Dia		14 - 15 Dia		54º Dia	
		Durante episódio TD		Último dia episódio TD		4 semanas de recuperação	
CP	<i>TTP</i>	0 ± 0	(0,00)	598,47 ± 517,87	(0,54)	64,65 ± 5,36	(0,13)
	<i>TDP</i>	25.450,55 ± 3238,72	(39,31)	30.293,89 ± 1339,91	(27,42)	25.309,62 ± 637,53	(51,44)
	<i>TMP</i>	16.929,68 ± 2652,43	(26,15)	15.683,48 ± 750,57	(14,19)	18.895,69 ± 852,64	(38,40)
	<i>B1</i>	22.358,77 ± 18391,48	(34,54)	63.916,03 ± 24708,24	(57,85)	4.936,45 ± 938,37	(10,03)
DT	<i>TTP</i>	0 ± 0	(0,00)	4,63 ± 4,63	(0,03)	73,74 ± 9,93	(0,15)
	<i>TDP</i>	9.668,79 ± 825,49	(14,12)	6.915,51 ± 293,38	(37,99)	25.327,44 ± 1585,25	(53,01)
	<i>TMP</i>	2.156,51 ± 251,82	(3,15)	915,57 ± 62,78	(5,03)	18.319,41 ± 1061,04	(38,35)
	<i>B1</i>	56.668,4 ± 36623,70	(82,74)	10.364,98 ± 2814,29	(56,95)	4.053,89 ± 200,00	(8,48)

- nmols/g de tecido (média ± SEM)
- Entre parênteses foram expressos as porcentagens de tiamina e seus derivados.

CP vs. DT

a	p=0,0002	c	p=0,0005	e	p=0,0600
b	p<0,0001	d	p=0,0001	f	p=0,0010

DT (11º dia vs. 54º dia / 14º -15º dia vs. 54º dia)

g	p=0,0338	i	p=0,0082	l	p=0,0023
H	p=0,0311	j	p=0,0042	m	p<0,0001

Níveis de cálcio livre

Como mencionado na Introdução do presente trabalho, o conhecimento dos efeitos da DT sobre os níveis desse íon nos diferentes tecidos (CPF, H e T) pode contribuir para o entendimento dos mecanismos relacionados aos efeitos distintos da deficiência nesses tecidos. Essa ideia foi sustentada por conhecimentos prévios sobre o envolvimento do cálcio em uma das vias de morte celular.

Os dados das concentrações de cálcio livre em amostras do CPF, H e T, obtidas dos animais dos grupos CP, e DT nos tempos T1 e T2 e T6. Portanto, a avaliação foi realizada em três momentos diferentes da DT: **no tempo T1 (10^o dia do episódio de DT), T2 (ultimo dia do episódio de DT) e T6 (após período de recuperação/LAM)**. Os dados foram analisados pelo método ANOVA-*two way*, fatorial 2 x 3, onde os fatores foram: Dieta (CP e DT) e “Período” (T1, T2 e T6). ⁵*Vide Nota I.*

CPF:

Foi observado efeitos significativos da DT ($F_{(1,34)}=5,68$, $P=0,023$); do Período ($F_{(1,34)}=7,51$, $P=0,002$) e ausência de interação ($F_{(1,34)}=1,75$ $P=0,189$). **(Figura 28 – Painel A)**

Testes *Post hoc* (Fisher) mostraram um aumento de ~208% ($p=0,018$) nos níveis de cálcio, dos animais do grupo DT ($0,645 \pm 0,14$, $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de tecido) comparados com os animais do grupo CP ($0,310 \pm 0,02$, $\mu\text{g Ca}^{+2}/\text{mg}$ de tecido), no tempo T2.

Nos tempos T1 ($p=0,251$) e T6 ($p=0,80$) não houve diferenças significativas.

⁵ **Nota I:** *Como não foi observada diferença significativa entre os dados dos níveis de cálcio nas amostras CP coletadas nos três diferentes tempos (T1, T2 e T6) e, além disto, o tamanho das três amostras era pequeno, decidimos reuni-las ficando, portanto, com apenas um grupo controle (Controle Pareado Final). Em vista disto, decidimos proceder a uma análise ANOVA- one way. Os resultados estão apresentados no ANEXO e considerados na Discussão do presente trabalho.*

Teste *Post hoc* comparando os níveis entre períodos, no **grupo DT**, mostrou:

Efeitos significativos entre:

* $p=0,016$, T1 (0,500 +/- 0,12) vs T6 (0,191 +/- 0,03) $\mu\text{g Ca}^{+2}$ / mg de tecido

* $p<0,0001$, T2 (0,645 +/- 0,14) vs T6 (0,191 +/- 0,03) $\mu\text{g Ca}^{+2}$ / mg de tecido

Não houve efeito significativo entre:

$p=0,283$, T1 (0,500 +/- 0,12) vs T2 (0,645 +/- 0,14) $\mu\text{g Ca}^{+2}$ / mg de tecido

Teste *Post hoc* comparando os níveis entre períodos, no **grupo CP**, mostrou:

Não houve efeito significativo entre:

$p=0,940$, T1 (0,321 +/- 0,11) vs T2 (0,310 +/- 0,02) $\mu\text{g Ca}^{+2}$ / mg de tecido

$p=0,254$, T1 (0,321 +/- 0,11) vs T6 (0,166 +/- 0,08) $\mu\text{g Ca}^{+2}$ / mg de tecido

$p=0,290$, T2 (0,310 +/- 0,02) vs T6 (0,166 +/- 0,08) $\mu\text{g Ca}^{+2}$ / mg de tecido

Hipocampo:

Não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,29)}=0,06$, $P=0,804$), e nem do Período ($F_{(1,29)}=1,86$, $P=0,173$). Também não houve interação significativa ($F_{(1,29)}=0,16$, $P=0,857$). (**Figura 28 – Painel B**)

Tálamo:

Não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,29)}=0,01$, $P=0,904$), nem do Período ($F_{(1,29)}=3,18$, $P=0,057$) e nem interação ($F_{(1,29)}=0,18$, $P=0,838$). (**Figura 28 – Painel C**)

Como ANOVA mostrou, no **tálamo**, uma tendência ($F_{(1,29)}=3,18$, $P=0,057$) de efeito do fator “Período”, avaliamos se havia uma diferença entre os períodos (T1, T2 e T6) para os grupos CP e DT.

O teste *Post hoc* Fisher mostrou, para o **grupo DT**:

$p=0,074$, T1 (0,132 +/- 0,09) vs T6 (1,75 +/- 0,73) $\mu\text{g Ca} / \text{mg de tecido}$

$p=0,061$, T2 (0,31 +/- 0,06) vs T6 (1,75 +/- 0,73) $\mu\text{gCa}^{+2}/\text{mg de tecido}$

$p=0,840$, T1 (0,132 +/- 0,09) vs T2 (0,31 +/- 0,06) $\mu\text{g Ca} / \text{mg de tecido}$

O teste *Post hoc* Fisher mostrou, para o **grupo CP**:

$p=0,241$, T1 (0,254 +/- 0,10) vs T6 (1,30 +/- 0,71) $\mu\text{g Ca} / \text{mg de tecido}$

$p=0,342$, T2 (0,46 +/- 0,16) vs T6 (1,30 +/- 0,71) $\mu\text{gCa}^{+2}/\text{mg de tecido}$

$p=0,842$, T1 (0,254 +/- 0,10) vs T2 (0,46 +/- 0,16) $\mu\text{g Ca} / \text{mg de tecido}$

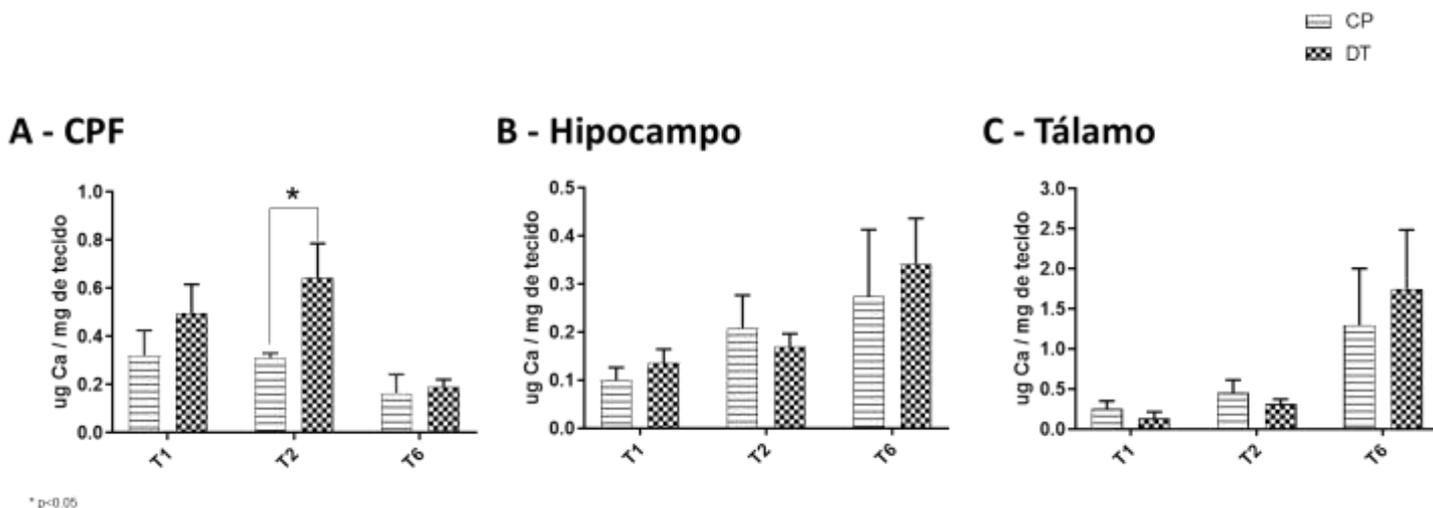


Figura 28: Níveis de cálcio livre (Média +/- SEM, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) no meio extracelular + citosol, em amostras do CPF (painel A), Hipocampo (painel B) e Tálamo (painel C).

As amostras foram obtidas dos animais do grupo CP e DT em três tempos distintos: T1 (10 dias do episódio DT), T2 (14 dias do episódio DT- após o aparecimento dos sinais neurológicos) e T6 (52 dias de tratamento – após período de recuperação e LAM). * $p=0,018$ no T2. Não indicado na figura: diferenças significativas entre os tempos T1 vs T6 ($p=0,017$) e T2x T6 ($p<0,0001$) no CPF. No tálamo, os valores de “p” indicam apenas tendências de diferenças: T1 vs T6 ($p=0,074$) e T2x T6 ($p=0,061$).

Tamanho das amostras:

Grupo CP:

CPF: T1 = 4, T2 = 4, T6 = 7
 Hipocampo: T1 = 4, T2 = 4, T6 = 8
 Tálamo: T1 = 4, T2 = 4, T6 = 8

Grupo DT:

CPF: T1 = 4, T2 = 7, T6 = 14
 Hipocampo: T1 = 4, T2 = 7, T6 = 8
 Tálamo: T1 = 4, T2 = 7, T6 = 8

Atividades das caspases

As determinações das atividades catalíticas das caspases 8, 9 e 3/7 foram realizadas nas três regiões cerebrais (CPF, H e T), em duas situações diferentes da condição clínica **grave, sem e com período de recuperação/LAM**. Os dados foram

analisados por ANOVA-*two way*, fatorial (2 x 2), onde os fatores foram tratamento/DT e o fator “Período”: 14º dia (T2) e 52º (T6).

CPF:

Caspase 8, efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,25)}=6,20$, $P=0,020$) e Período ($F_{(1,25)}=7,61$, $P=0,011$) e ausência de interação ($F_{(1,25)}=0,44$, $P=0,511$)

Caspase 9, ausência de efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,25)}=0,49$, $P=0,480$); do período ($F_{(1,25)}=4,20$, $P=0,051$) e interação ($F_{(1,25)}=0,001$, $P=0,97$).

Caspase 3/7, efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,24)}=11,80$, $P=0,002$) e ausência de efeitos significativos de período ($F_{(1,24)}=0,74$, $P=0,397$) e interação ($F_{(1,24)}=0,37$, $P=0,546$).

Teste *post hoc* (Sidak) mostrou efeito significativo da DT sobre a atividade das caspases 8 e 3/7, após período de 4 semanas de recuperação (T6), com redução de 14% ($p=0,041$) em comparação ao grupo CP (atividade de 6,93 em Ln Luminescência) e 20% ($p=0,007$), (CP= 5,00, em Ln Luminescência), respectivamente. **(Figura 29 – Painel A).**

Hipocampo:

Caspase 8, efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,20)}=13,11$ $P=0,002$), de período ($F_{(1,20)}=5,65$ $P=0,028$) e ausência de interação ($F_{(1,20)}=0,36$ $P=0,553$).

Caspase 9, efeitos significativos do tratamento/DT $F_{(1,20)}=9,04$ $P=0,007$, ausência de efeitos significativos de período ($F_{(1,20)}=3,20$, $P=0,089$) e interação ($F_{(1,20)}=1,25$ $P=0,278$).

Caspase 3/7, efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,19)}=4,40$, $P=0,049$) e ausência de efeitos significativos de período ($F_{(1,19)}=0,66$, $P=0,436$) e interação ($F_{(1,19)}=1,80$, $P=0,196$).

Teste *post hoc* (Sidak) mostrou efeito significativo da DT sobre a atividade das caspases 8 e 9, no grupo DT, com redução de 12% ($p=0,012$), em comparação ao CP (=6,24 em Ln Luminescencia) e 21% ($p=0,015$) em comparação com CP (=6,97 em Ln Luminescencia), respectivamente. Além disto, para caspase 3/7, observou-se tendência de redução de 16% ($p=0,051$), após período de recuperação (T6), em comparação com CP tempo T6 (=5,07 em Ln Luminescencia) (**Figura 29 – Painel B**).

Tálamo:

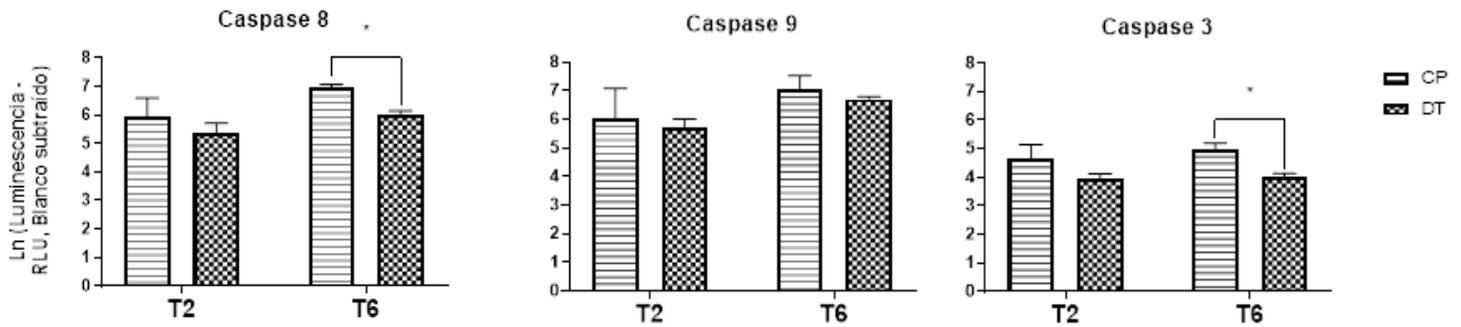
Caspase-8, não houve efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,23)}=1,16$, $P=0,292$), nem do período ($F_{(1,23)}=3,89$, $P=0,061$) e nem interação ($F_{(1,23)}=0,29$, $P=0,594$).

Caspase-9, não houve efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,23)}=2,40$, $P=0,135$), nem do período ($F_{(1,23)}=0,40$, $P=0,532$) e nem interação ($F_{(1,23)}=0,56$, $P=0,463$).

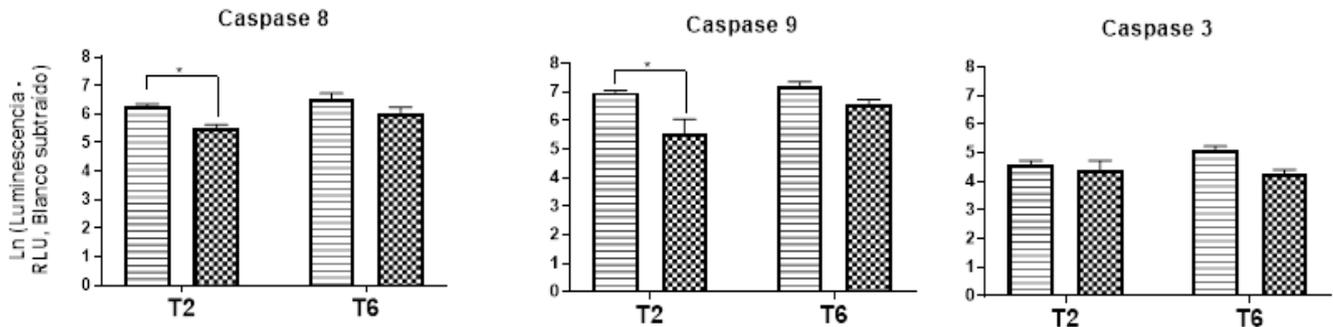
Caspase-3/7, não houve efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,22)}=1,20$, $P=0,285$), mas houve efeito significativo do período ($F_{(1,22)}=6,01$, $P=0,022$) e ausência de efeito significativo na interação ($F_{(1,22)}=1,12$, $P=0,301$).

Teste *post hoc* (Sidak) mostrou efeito significativo do fator “Período” na atividade da caspase 3/7, dos animais do grupo CP tempo T6 (=4,03 em Ln Luminescência) em relação ao grupo CP (=5,65 Ln Luminescência), com redução de 29% ($p=0,051$) (**Figura 29 – Painel C**).

A - CPF



B - Hipocampo



C- Tálamo

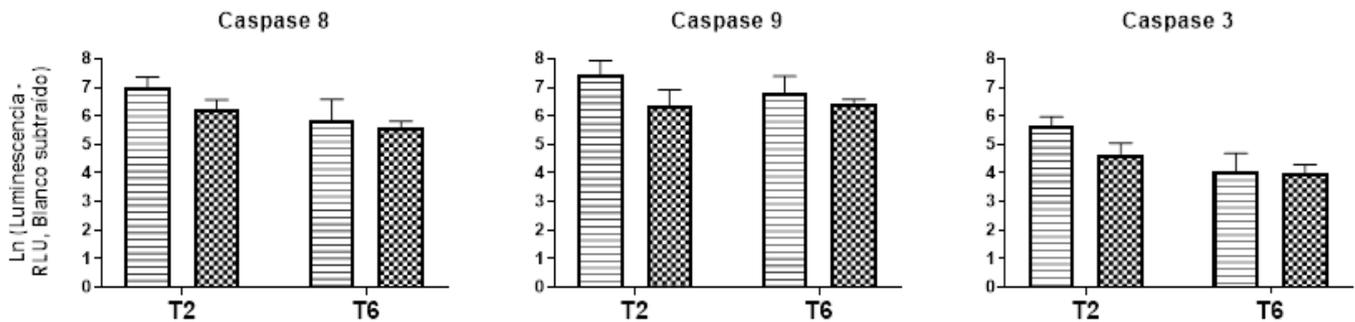


Figura 29: Atividades das caspases 8, 9 e 3/7, no CPF, hipocampo e tálamo, dos animais dos grupos CP e DT nos tempos T2 e T6.

Os dados estão expressos em Ln de luminescência (*Relative Light Units* – RLU, branco subtraído) que é proporcional à quantidade de enzima ativa (01 unidade de caspase). As barras de erro indicam SEM.

Tamanho das amostras:

- **CPF:** Caspase 8, Caspase 9 e Caspase 3/7: CP tempo T5 (n=5), CP tempo T6 (n=9) e DT tempo T5 (n=7) e DT tempo T6, n=8).
- **Hipocampo:** Caspase 8, Caspase 9 e Caspase 3/7: CP tempo T5 (n=5), CP tempo T6 (n=4) e DT tempo T5 (n=6) e DT tempo T6, n=8).
- **Tálamo:** Caspase 8, Caspase 9 e Caspase 3/7: CP tempo T5 (n=5), CP tempo T6 (n=7) e DT tempo T5 (n=6) e DT tempo T6, n=8)

Viabilidade Celular – MTT = Atividades desidrogenases mitocondriais

A viabilidade celular foi avaliada em amostras do CPF, H e T, obtidas dos animais dos grupos CP, e DT nos tempos T2 e T6. Portanto, a avaliação foi realizada em duas situações diferentes DT: **no tempo T2 (ultimo dia do episódio de DT) e T6 (período de recuperação/LAM)**. Os dados foram analisados pelo método ANOVA-*two way*, fatorial 2 x 2, onde os fatores foram: tratamento/DT e “Período”.

CPF: Não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,17)}=1,74$, $P=0,21$), nem do Período ($F_{(1,17)}=2,04$, $P=0,17$) e nem interação ($F_{(1,17)}=0,36$, $P=0,56$).
(Figura 30)

Hipocampo: Não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,10)}=0,025$, $P=0,88$), mas houve efeito significativo do Período $F_{(1,10)}=21,42$, $P=0,0009$. Não houve interação significativa $F_{(1,10)}=0,30$, $P=0,60$. **(Figura 30)**

Tálamo: Não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,18)}=2,75$, $P=0,12$), nem do Período ($F_{(1,18)}=3,80$, $P=0,07$) e nem interação ($F_{(1,18)}=1,14$, $P=0,30$).
(Figura 30)

Testes post hoc (Sidak) mostraram um decréscimo da atividade enzimática de 27% no hipocampo dos animais do grupo DT tempo T6 comparado com o grupo DT no tempo T2 ($p=0,0322$) e 32% para o grupo CP tempo T6 comparado com o CP no tempo T2 ($p=0,0088$).

Como ANOVA mostrou, no **tálamo**, uma tendência ($F_{(1,18)}=3,80$, $P=0,07$) de efeito do fator “Período”, avaliamos se havia uma diferença entre os grupos DT T2 x

T6. O resultado indica um aumento da atividade das desidrogenases mitocondriais de ~ 237% (p=0,09).

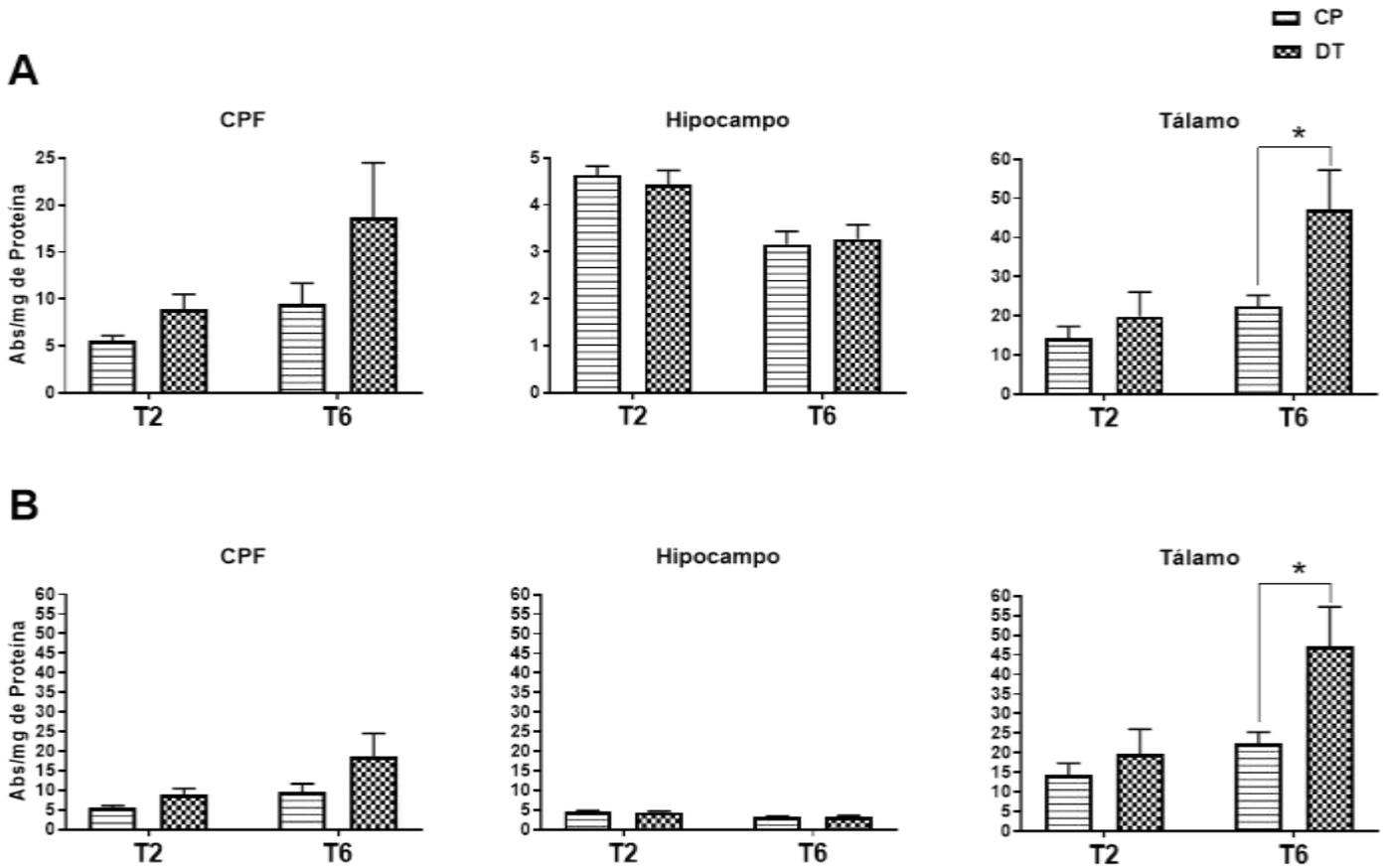


Figura 30: Atividades das desidrogenases mitocondriais

Absorbância (Abs) /mg de proteína, no CPF, Hipocampo e Tálamo. **Painel A:** dados apresentados usando a mesma escala para as três regiões. **Painel B:** dados apresentados usando escalas diferentes para cada uma das três regiões, propiciando melhor visualização dos dados na região do hipocampo (efeito do fator “Período”).

Para cada ensaio foi realizado um branco, utilizando TCA para inativação das enzimas. Nas amostras obtidas dos animais do grupo DT, aumentaram 50% da atividade após período de recuperação e teste comportamental (T4 e após os testes comportamentais) * p=0,0354. As linhas horizontais sobre as barras indicam SEM.

Ensaio de Viabilidade celular – Calceína e Iodeto de Propídio

O teste de viabilidade celular, avaliada através do método de marcação com fluoróforo (Calceína-AM e Iodeto de Propídio - IP) foi realizado em amostras do CPF, H e T, obtidas dos animais dos grupos CP e DT, coletadas nos tempos T2 e T6. Portanto, a avaliação foi realizada em dois tempos diferentes da evolução clínica do processo de tratamento com DT, incluindo o período de recuperação: **no tempo T2 (último dia do episódio de DT) e T6 (período de recuperação/LAM)**. Os dados foram analisados através do método ANOVA-*two way*, fatorial 2 x 2, onde os fatores foram: tratamento/DT e “Período”. ⁶*Vide Nota II*.

CPF:

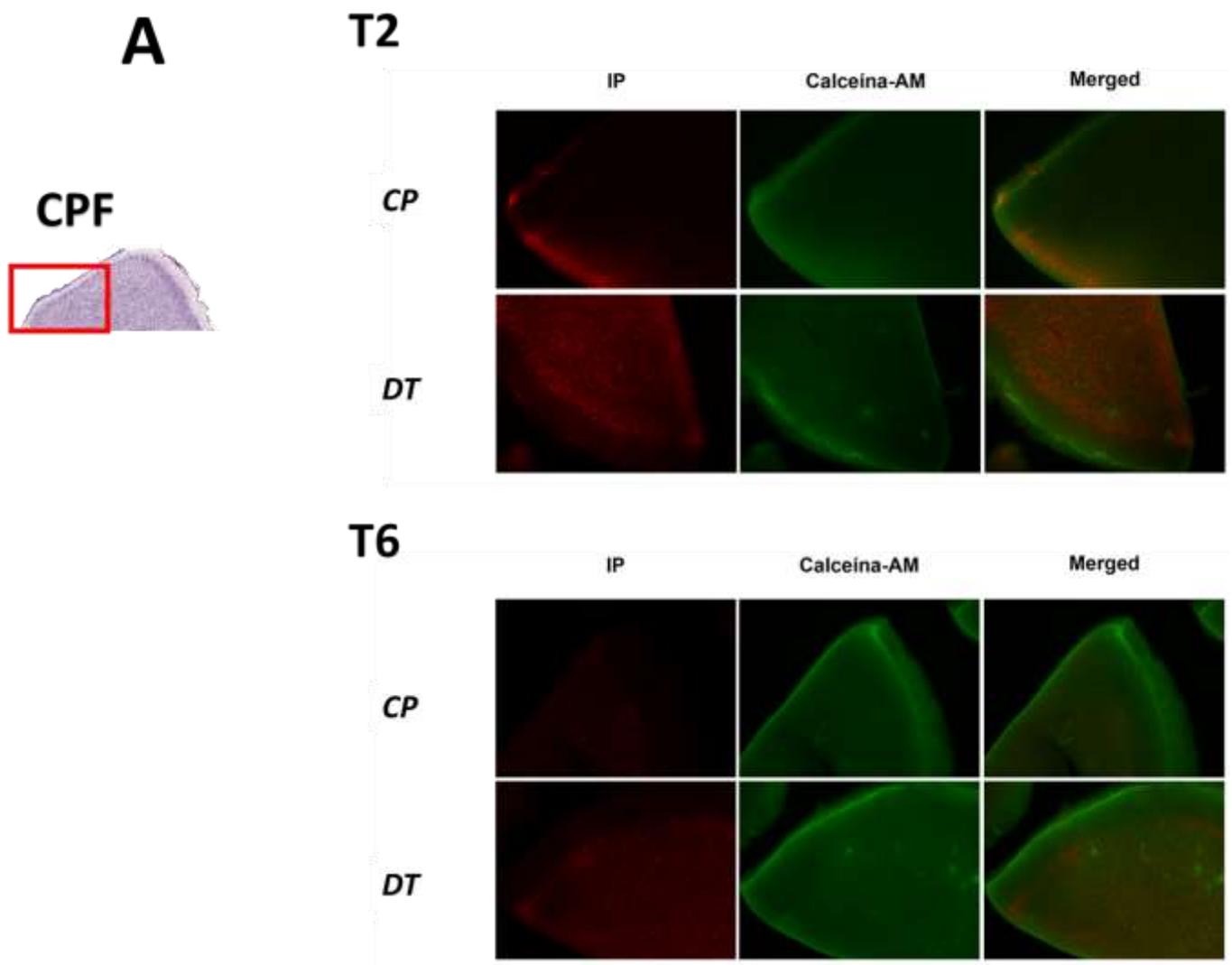
Não foi observado efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,20)}=3,47$, $P=0,078$), nem do Período ($F_{(1,20)}=0,03$, $P=0,875$) e nem interação ($F_{(1,20)}=0,03$, $P=0,875$).

No entanto, após aplicação do teste Grubbs, foi detectado um dado *outlier* no grupo CP. Com a remoção deste dado e re-análise dos dados, utilizando ANOVA, verificou-se: efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,19)}=4,56$, $P=0,046$), sem ocorrência de efeitos significativos do Período ($F_{(1,19)}=0,02$, $P=0,877$) e nem interação ($F_{(1,19)}=0,22$, $P=0,644$).

⁶**Nota II:** *Como não foi observada diferença significativa entre os dados de viabilidade celular (IP-Calceína) nas amostras controles coletadas nos dois diferentes tempos (T2 e T6) e, além disto, o tamanho das duas amostras era pequeno (n entre 3 e 5), decidimos reuni-las ficando, portanto, com apenas um grupo controle. Em vista disto, decidimos proceder a uma análise ANOVA- one way. Os resultados estão apresentados no ANEXO e considerados na Discussão do presente trabalho.*

Teste *post hoc* (Fisher) mostrou tendência:

$p=0,084$ CP (82,42% +/- 11,42) vs DT (158,69% +/- 20,9), tempo T2 (14^o dia do episódio de DT) (**Figura 31**).



B

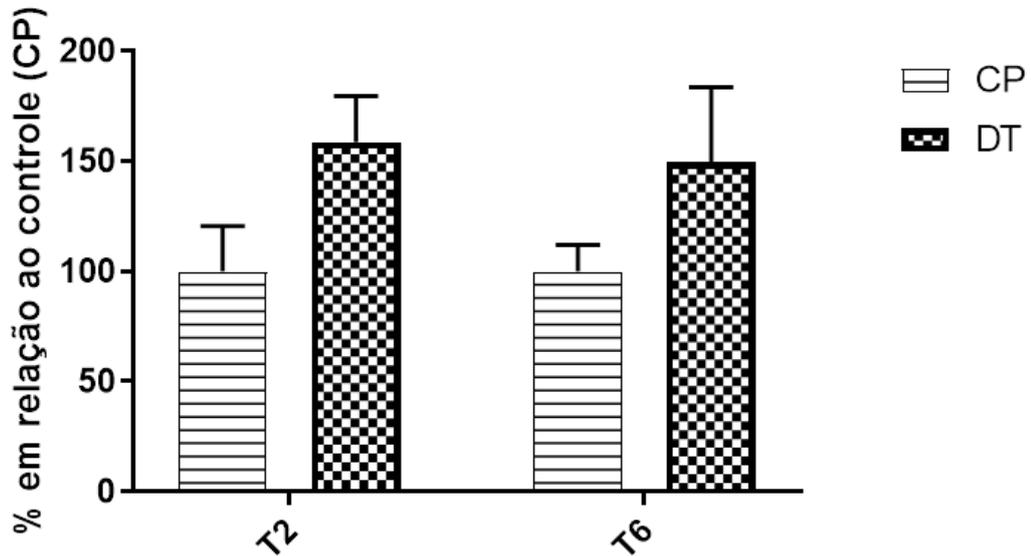


Figura 31: Imagens representativas (Painel A) e dados quantitativos (Painel B) dos resultados obtidos com a marcação com IP e Calceína, em amostras do CPF dos animais dos grupos DT e CP (Controle Pareado).

Painel A: Amostras foram coletadas nos tempos T2 (imagens no topo) e T6 (imagens inferiores). As fatias foram marcadas com Calceína-AM (fluorescência verde) e Iodeto de propídio (fluorescência vermelha). As imagens sobrepostas (*Merged*) mostram dupla marcação com estes fluoróforos.

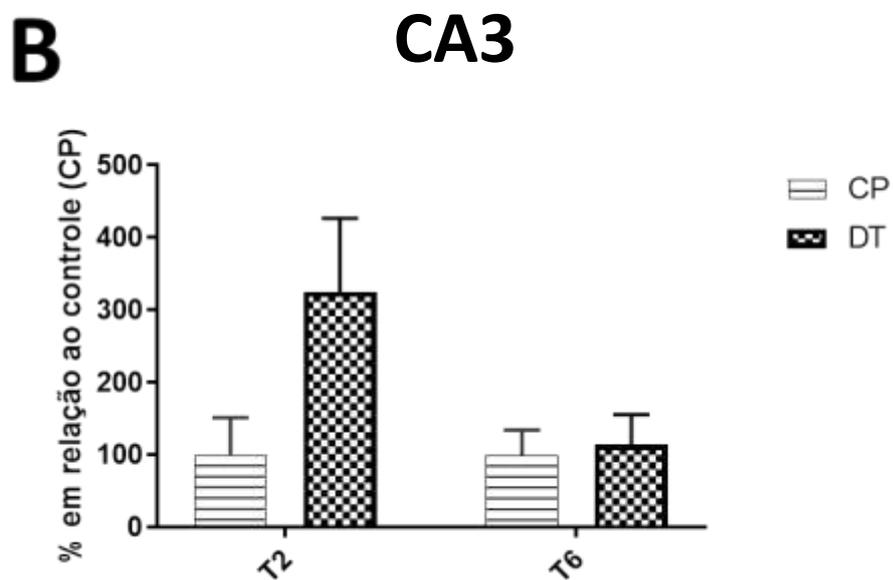
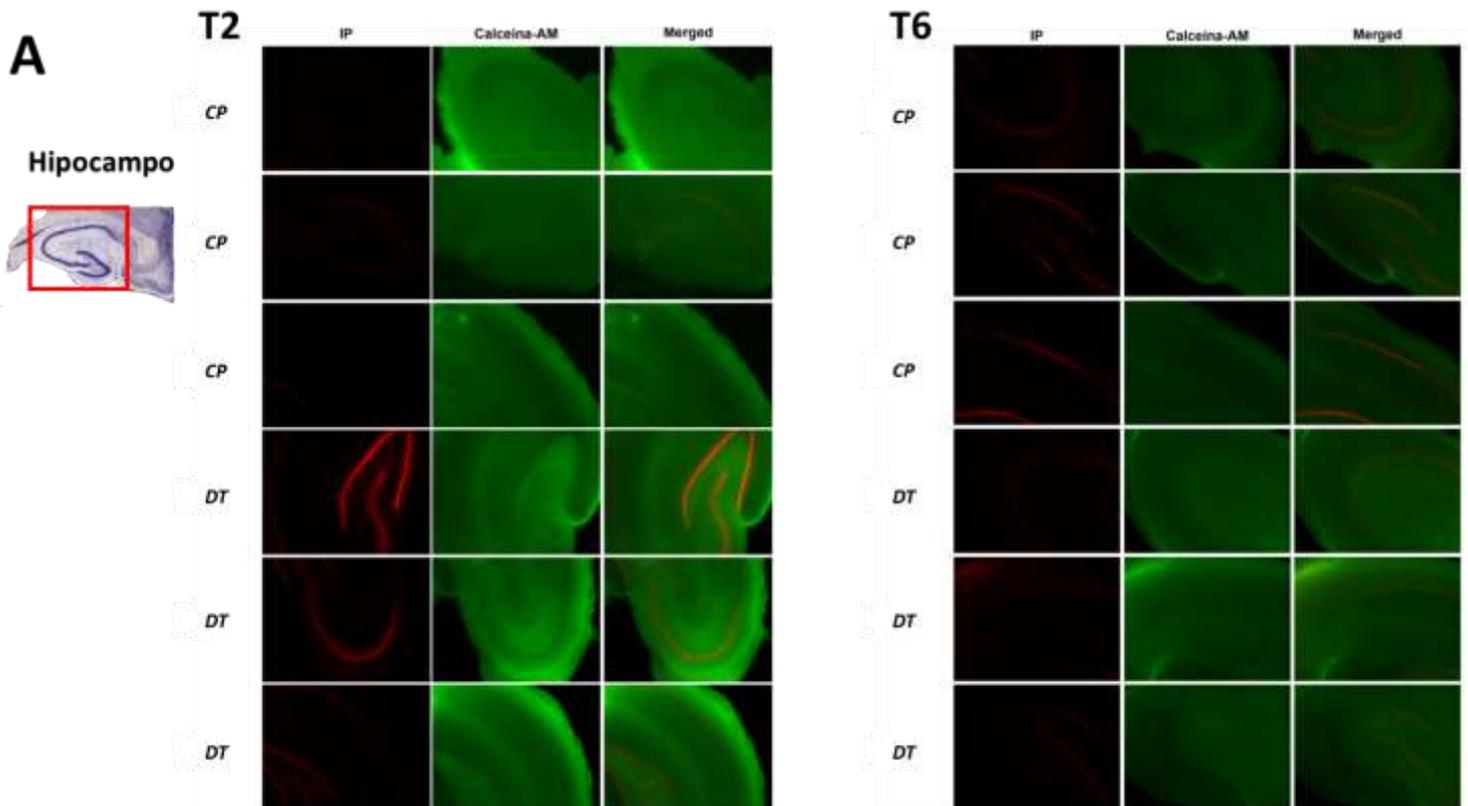
Painel B: Percentual (Média +/- SEM) da intensidade de pixels da marcação com IP em relação ao grupo controle CP=100%. Estágios T2 (14^o dia do episódio de DT) e T6 (52^o dia de tratamento, com recuperação-LAM). Tamanhos das amostras: CP (T2), n=5; CP (T6), n=4, DT (T2), n=7 e DT (T6), n=8

Hipocampo:

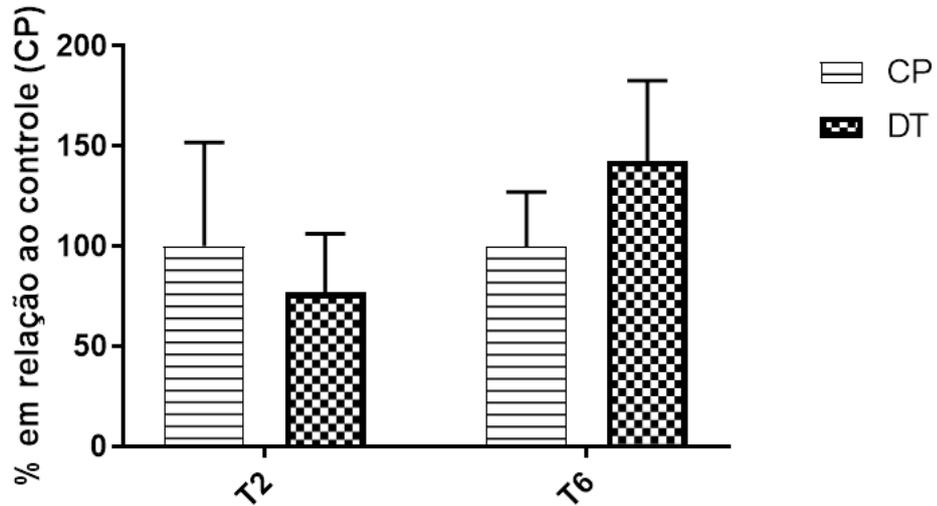
CA3: Não foi observado efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,18)}=2,15$ $P=0,160$), nem do Período ($F_{(1,18)}=1,68$, $P=0,211$) e nem interação ($F_{(1,18)}=1,68$, $P=0,212$).

CA1: Não foi observado efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,17)}=0,05$ $P=0,820$), nem do Período ($F_{(1,17)}=0,60$ $P=0,450$) e nem interação ($F_{(1,17)}=0,60$ $P=0,450$).

GD: Não foi observado efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,18)}=1,88$ $P=0,188$), nem do Período ($F_{(1,18)}=1,67$ $P=0,212$) e nem interação ($F_{(1,18)}=1,67$ $P=0,212$) (**Figura 32**).



CA1



GD

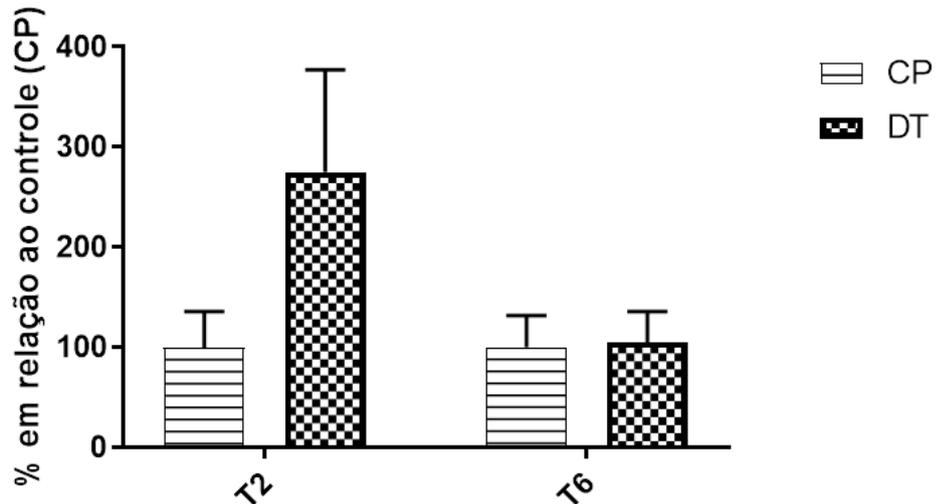


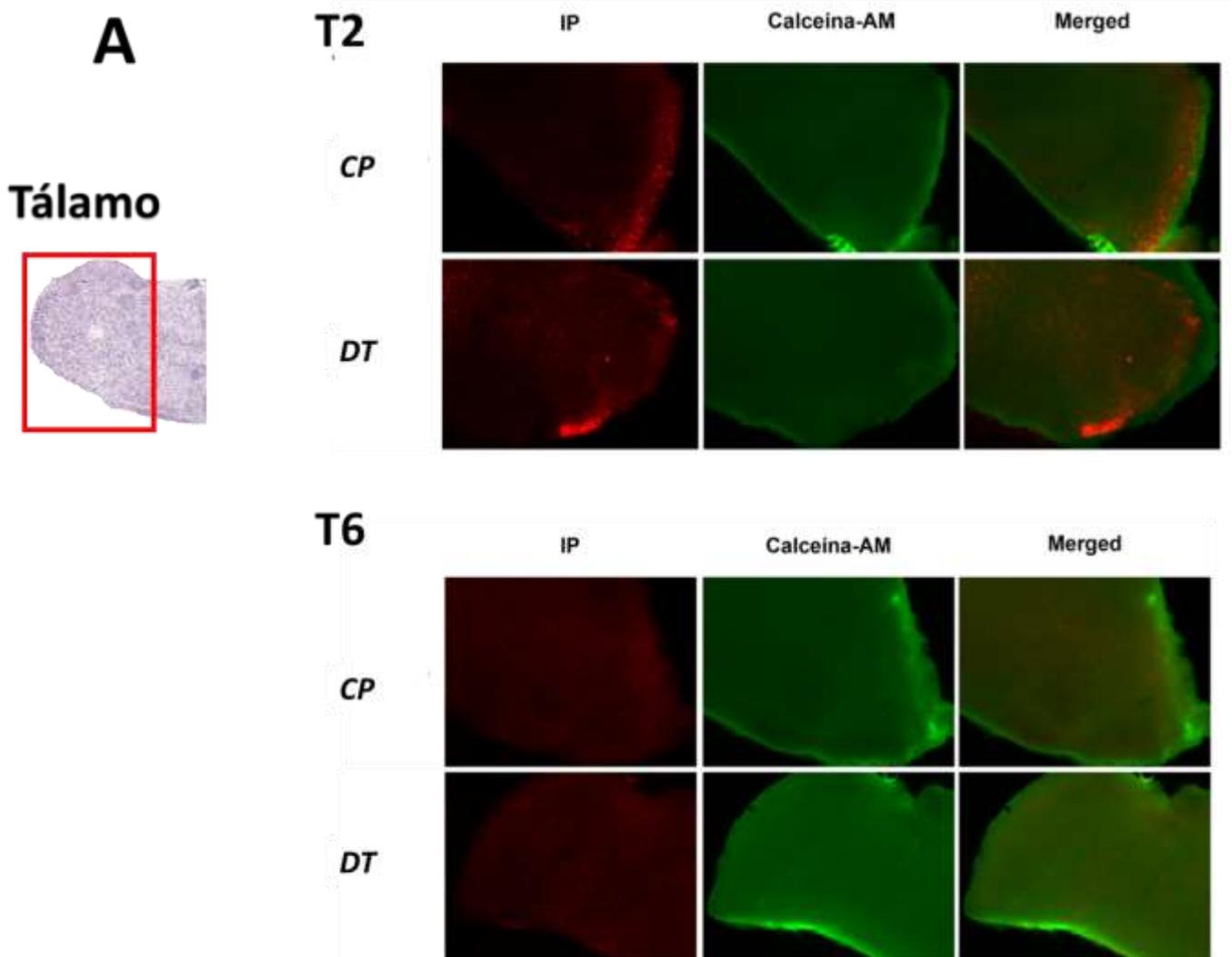
Figura 32: Imagens representativas (Painel A) e dados quantitativos (Painel B) dos resultados obtidos com a marcação com IP e Calceína, em amostras de subregiões do HIPOCAMPO, dos animais dos grupos DT e CP (Controle Pareado).

Painel A: Amostras foram coletadas nos tempos T2 (imagens à direita) e T6 (imagens à esquerda). As fatias foram marcadas com Calceína-AM (fluorescência verde) e Iodeto de propídio (fluorescência vermelha). As imagens sobrepostas (*Merged*) mostram dupla marcação com estes fluoróforos.

Painel B: Percentual (Média \pm SEM) da intensidade de pixels da marcação com IP em relação ao grupo controle CP=100% para três sub-regiões do hipocampo: CA3, CA1 e GD (giro denteado). Estágios T2 (14^o dia do episódio de DT) e T6 (52^o dia de tratamento, com recuperação-LAM). Tamanhos das amostras: **CA3:** CP (T2), n=3; CP (T6), n=4, DT (T2), n=7 e DT (T6), n=8; **CA1:** CP (T2), n=3; CP (T6), n=4, DT (T2), n=6 e DT (T6), n=8; **GD:** CP (T2), n=4; CP (T6), n=4, DT (T2), n=6 e DT (T6), n=8.

Tálamo: Não foi observado efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,20)}=1,14$, $P=0,298$), nem do Período ($F_{(1,20)}=0,03$, $P=0,872$) e nem interação ($F_{(1,20)}=0,00$, $P=0,978$)

Como ANOVA mostrou, no **CPF**, uma tendência ($F_{(1,20)}=3,47$ $P=0,078$) de efeito do fator “Tratamento/DT”, avaliamos se havia uma diferença entre os grupos CP vs DT, Não houve diferença estatística no T2 ($p=0,293$) e nem no T6 ($p=0,442$) (**Figura 33**).



B

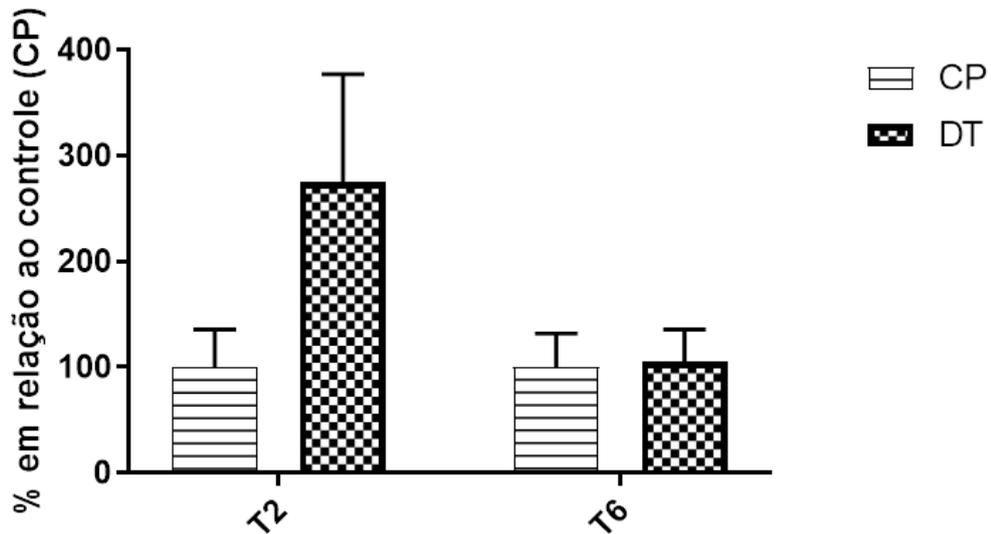


Figura 33: Imagens representativas (Painel A) e dados quantitativos (Painel B) dos resultados obtidos com a marcação com IP e Calceína, em amostras do TÁLAMO dos animais dos grupos DT e CP (Controle Pareado).

Painel A: Amostras foram coletadas nos tempos T2 (imagens no topo) e T6 (imagens inferiores). As fatias foram marcadas com Calceína-AM (fluorescência verde) e Iodeto de propídio (fluorescência vermelha). As imagens sobrepostas (*Merged*) mostram dupla marcação com estes fluoróforos.

Painel B: Percentual (Média +/- SEM) da intensidade de pixels da marcação com IP em relação ao grupo controle CP=100%. Estágios T2 (14^o dia do episódio de DT) e T6 (52^o dia de tratamento, com recuperação-LAM). Tamanhos das amostras: CP (T2), n=5; CP (T6), n=4, DT (T2), n=7 e DT (T6), n=8.

Expressão Gênica

Efeito do tratamento com DT, com ou sem “experiência cognitiva”, sobre a expressão de genes envolvidos na morte neuronal - Exp. IV

Considerando os resultados obtidos nos experimentos anteriores, com medidas dos níveis de cálcio e atividades das caspases, nos quais verificamos que a “experiência cognitiva” no LAM pode alterar esses parâmetros, decidimos incluir no Exp.IV a “experiência cognitiva” como uma das variáveis independentes, além da deficiência de tiamina. Portanto, o experimento IV se caracteriza como um estudo fatorial 2 x 2, com os fatores dieta (com e sem DT) e experiência cognitiva (com e sem tarefa no LAM). Os grupos e os tempos, entre parêntesis, nos quais as amostras foram coletadas estão descritos a seguir: CP e DT (tempo de coleta: T5), CP-LAM e DT-LAM (tempo de coleta: T6, ou seja, depois dos animais terem realizado a tarefa). Portanto, os grupos controles pareados CP e CP-LAM, a diferença entre eles é a execução ou não da tarefa cognitiva; e grupos deficiente em tiamina, em estágio grave, a diferença entre eles é a execução ou não da tarefa cognitiva.

As amostras foram coletadas nas três regiões do SNC (CPF, H e T), e os genes estudados foram *CASP8*, *CASP9*, *CASP3/7*, *AKT1*, *MAPK8*, *AMPA1*, *CACNA1C*, *NFK β 1* e *BDNF*.

CPF:

Não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT e nem da “experiência cognitiva”/LAM e nem interação entre esses dois fatores. **(Figura 34 - Painel A)**

CASP8, DT ($F_{(1,35)}=1,46$, $P=0,235$; LAM ($F_{(1,35)}=0,01$, $P=0,942$; interação ($F_{(1,35)}=1,04$, $P=0,314$).

CASP9, DT ($F_{(1,35)}=1,35$, $P=0,252$; LAM ($F_{(1,35)}=0,07$, $P=0,796$; interação ($F_{(1,35)}=1,29$, $P=0,263$).

CASP3, DT ($F_{(1,34)}=0,25$, $P=0,622$; LAM ($F_{(1,34)}=0,16$, $P=0,693$; interação ($F_{(1,34)}=1,01$, $P=0,321$).

AKT1, DT ($F_{(1,35)}=1,18$, $P=0,285$; LAM ($F_{(1,35)}=0,68$, $P=0,416$; interação ($F_{(1,35)}=0,78$, $P=0,383$).

MAPK8, DT ($F_{(1,35)}=1,07$, $P=0,308$; LAM ($F_{(1,35)}=0,04$, $P=0,850$; interação ($F_{(1,35)}=0,22$, $P=0,645$).

AMPA1, DT ($F_{(1,35)}=0,33$, $P=0,573$; LAM ($F_{(1,35)}=1,14$, $P=0,292$; interação ($F_{(1,35)}=0,92$, $P=0,344$).

CACNA1C, DT ($F_{(1,34)}=1,66$, $P=0,207$; LAM ($F_{(1,34)}=2,97$, $P=0,094$; interação ($F_{(1,34)}=1,15$, $P=0,291$).

NFKβ1, DT ($F_{(1,34)}=1,04$, $P=0,315$; LAM ($F_{(1,34)}=0,95$, $P=0,337$; interação ($F_{(1,34)}=0,77$, $P=0,386$).

BDNF, DT ($F_{(1,36)}=0,00$, $P=0,958$; LAM ($F_{(1,36)}=0,66$, $P=0,422$; interação ($F_{(1,36)}=0,85$, $P=0,364$).

Hipocampo:

De forma similar ao CPF, não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT e nem da “experiência cognitiva”/LAM e nem interação entre esses dois fatores (**Figura 34 - Painel B**).

CASP8, DT ($F_{(1,35)}=2,53$, $P=0,121$); LAM ($F_{(1,35)}=2,98$, $P=0,093$); interação ($F_{(1,35)}=0,00$, $P=0,971$).

CASP9, DT ($F_{(1,35)}=0,03$, $P=0,872$); LAM ($F_{(1,35)}=0,05$, $P=0,831$); interação ($F_{(1,35)}=0,06$, $P=0,814$).

CASP3, DT DT ($F_{(1,35)}=1,58$, $P=0,217$); LAM ($F_{(1,35)}=0,69$, $P=0,410$); interação ($F_{(1,35)}=3,83$, $P=0,058$).

AKT1, DT ($F_{(1,35)}=0,04$, $P=0,849$); LAM ($F_{(1,35)}=0,04$, $P=0,843$); interação ($F_{(1,35)}=0,17$, $P=0,679$).

MAPK8, DT ($F_{(1,35)}=0,03$, $P=0,868$); LAM ($F_{(1,35)}=2,49$, $P=0,124$); interação ($F_{(1,35)}=2,20$, $P=0,147$).

AMPA1, DT ($F_{(1,35)}=0,64$, $P=0,429$); LAM ($F_{(1,35)}=0,11$, $P=0,742$); interação ($F_{(1,35)}=0,14$, $P=0,717$).

CACNA1C, DT ($F_{(1,35)}=0,00$, $P=0,966$); LAM ($F_{(1,35)}=0,47$, $P=0,496$); interação ($F_{(1,35)}=0,10$, $P=0,759$).

NFK β , DT ($F_{(1,35)}=1,08$, $P=0,306$); LAM ($F_{(1,35)}=0,30$, $P=0,588$); interação ($F_{(1,35)}=1,15$, $P=0,290$).

BDNF, DT ($F_{(1,35)}=1,06$, $P=0,310$); LAM ($F_{(1,35)}=1,03$, $P=0,318$); interação ($F_{(1,35)}=0,89$, $P=0,353$).

Tálamo:

Diferente dos tecidos anteriores, o tálamo apresentou algumas alterações na expressão dos genes, conforme descritos abaixo (**Figura 34 - Painel C**).

CASP8, não houve efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,35)}=0,60$, $P=0,443$ e nem do LAM ($F_{(1,35)}=0,11$, $P=0,742$; e houve efeito significativo da interação entre esses dois fatores ($F_{(1,35)}=9,03$, $P=0,005$).

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferença significativa entre:

* $p=0,014$, DT (84,3 % +/- 9,2%) vs DT-LAM (124,8 % +/- 10,8).

* $p=0,012$, CP-LAM (78,9% +/- 8,5) vs DT-LAM (124,8 % +/- 10,8).

Teste *post hoc* mostrou tendência:

$p=0,090$ CP (111,4% +/- 19,2) vs CP-LAM (78,9% +/- 8,5)

CASP9, não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,35)}=0,28$, $P=0,597$; nem do LAM ($F_{(1,35)}=0,09$, $P=0,763$; e nem interação entre esses dois fatores ($F_{(1,35)}=2,58$, $P=0,118$).

CASP3, não houve efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,36)}=0,45$, $P=0,508$ e nem do LAM ($F_{(1,36)}=1,48$, $P=0,231$; e houve efeito significativo da interação entre esses dois fatores ($F_{(1,36)}=6,47$, $P=0,015$).

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferença significativa

* $p=0,02$, entre CP (110,1 % +/- 18,4%) vs CP-LAM (71,6 % +/- 9,2%);

* $p=0,029$ entre CP (110,1 % +/- 18,4%) vs DT (77,2 % +/- 5,1%)

Não houve diferença significativa entre:

$p=0,19$ entre CP (110,1 % +/- 18,4%) vs DT-LAM (97,2 % +/- 5,7%)

AKT1, não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,35)}=0,16$, $P=0,691$); nem do LAM ($F_{(1,35)}=0,10$, $P=0,749$); e nem interação entre esses dois fatores ($F_{(1,35)}=3,11$, $P=0,087$).

MAPK8, não houve efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,35)}=1,25$, $P=0,272$) e nem do LAM ($F_{(1,35)}=0,04$, $P=0,839$); e houve efeito significativo da interação entre esses dois fatores ($F_{(1,35)}=6,95$, $P=0,012$). Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças não significativas, que podem ser consideradas tendências: $p=0,07$ entre CP (108,8% +/- 16,7%) vs CP-LAM (82,7% +/- 8,9%) e, um $p=0,06$ entre DT (74,4 % +/- 6,4%) vs DT-LAM (96,7 % +/- 4,7%).

AMPA1, não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,35)}=1,20$, $P=0,279$); nem do LAM ($F_{(1,35)}=0,59$, $P=0,446$); e nem interação entre esses dois fatores ($F_{(1,35)}=2,89$, $P=0,098$).

CACNA1C, não houve efeito significativo do tratamento/DT ($F_{(1,35)}=1,59$, $P=0,215$) e nem do LAM ($F_{(1,35)}=0,08$, $P=0,774$); e houve efeito significativo da interação entre esses dois fatores ($F_{(1,35)}=5,96$, $P=0,020$).

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferença significativa:

*p=0,04, entre DT (72,2 % +/- 7,8%) vs DT-LAM (99,2 % +/- 5,4%).

*p=0,012 entre CP (108,8 % +/- 15,9) vs DT (72,2 % +/- 7,8)

Não houve diferença significativa:

*p=0,50 entre CP (108,8 % +/- 15,9) vs DT-LAM (99,2 % +/- 5,4)

NFKβ1, não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,34)}=0,83$, $P=0,370$); nem do LAM ($F_{(1,34)}=0,07$, $P=0,790$); e nem interação entre esses dois fatores ($F_{(1,34)}=3,62$, $P=0,066$). Como ocorreu uma tendência de interação ($P=0,066$), decidimos verificar possíveis diferenças, detectadas via teste *post hoc* (Fisher) entre as variáveis: diferença não significativa, apenas tendência ($p=0,09$) entre DT (97,3 % +/- 6,5 %) vs DT-LAM (114,0 % +/- 3,9%).

BDNF, não foram observados efeitos significativos do tratamento/DT ($F_{(1,35)}=0,40$, $P=0,529$); nem do LAM ($F_{(1,35)}=1,00$, $P=0,324$); e nem interação entre esses dois fatores ($F_{(1,35)}=0,31$, $P=0,581$).

A CPF

Expressão gênica		CP	DT	CP-LAM	DT-LAM
		T5 n=8	T5 n=11	T6 n=8	T6 n=11-12
		<i>CASP3</i>	102,00 7,56	91,43 6,40	92,12 8,86
<i>CASP8</i>	103,40 9,95	101,60 8,79	113,80 11,94	92,49 7,91	
<i>CASP9</i>	103,30 10,03	103,00 5,99	115,30 10,13	95,53 8,25	
<i>AKT1</i>	103,20 9,87	101,50 7,48	117,60 10,60	101,00 6,53	
<i>AMPA1</i>	102,30 8,35	105,70 7,73	120,10 10,73	106,70 8,02	
<i>MAPK8</i>	102,70 9,08	98,19 6,02	104,80 9,93	93,05 6,85	
<i>NFKB1</i>	102,00 7,61	101 t 4,13	114,90 10,79	101,70 5,68	
<i>CACNA1C</i>	102,20 8,35	100,40 7,45	125,80 11,75	105,90 6,61	
<i>BDNF</i>	102,40 8,30	111,40 8,82	103,50 16,22	93,42 8,05	

B Hipocampo

Expressão gênica		CP	DT	CP-LAM	DT-LAM
		T5 n=8	T5 n=12	T6 n=7-8	T6 n=11-12
		<i>CASP3</i>	100,80 4,71	100,50 3,42	82,43 11,60
<i>CASP8</i>	102,40 8,19	91,12 3,98	114,10 9,91	103,30 6,44	
<i>CASP9</i>	101,30 6,06	100,90 3,75	98,83 6,94	101,70 4,75	
<i>AKT1</i>	101,20 5,94	98,02 3,84	97,98 6,22	99,17 5,18	
<i>AMPA1</i>	101,20 5,88	107,00 2,73	104,70 6,22	106,80 4,99	
<i>MAPK8</i>	101,00 5,71	92,07 3,50	84,41 6,96	91,56 5,54	
<i>NFKB1</i>	101,40 6,32	92,41 3,20	94,51 4,79	94,66 3,14	
<i>CACNA1C</i>	101,00 5,28	102,60 3,19	105,60 6,08	104,40 4,45	
<i>BDNF</i>	101,30 6,50	110,70 2,99	110,60 4,45	111,10 4,70	

C Tálamo

Expressão gênica		CP	DT	CP-LAM	DT-LAM
		T5 n=7-8	T5 n=12	T6 n=8	T6 n=11
		<i>CASP3</i>	110,10 18,42	77,22 5,06	71,61 9,28
<i>CASP8</i>	111,40 19,15	84,30 9,16	78,90 8,54	124,80 10,83	
<i>CASP9</i>	110,70 19,84	87,63 7,02	90,10 11,53	101,60 4,55	
<i>AKT1</i>	110,40 16,87	86,80 9,29	94,67 13,33	109,50 4,19	
<i>AMPA1</i>	115,30 23,68	81,98 6,54	85,90 11,16	93,05 5,10	
<i>MAPK8</i>	108,80 16,69	74,34 6,39	82,72 8,92	96,69 4,68	
<i>NFKB1</i>	104,90 12,76	97,30 6,53	92,38 8,46	114,00 3,93	
<i>CACNA1C</i>	108,80 15,88	72,21 7,84	87,55 11,03	99,22 5,43	
<i>BDNF</i>	102,20 8,58	91,66 6,79	88,42 9,62	87,73 9,14	

Aumento

T6 > T5 (CP ou DT)

*** p < 0,0001

** p < 0,005

* p < 0,05

Diminuição

T6 < T5 (CP ou DT)

*** p < 0,0001

** p < 0,005

* p < 0,05

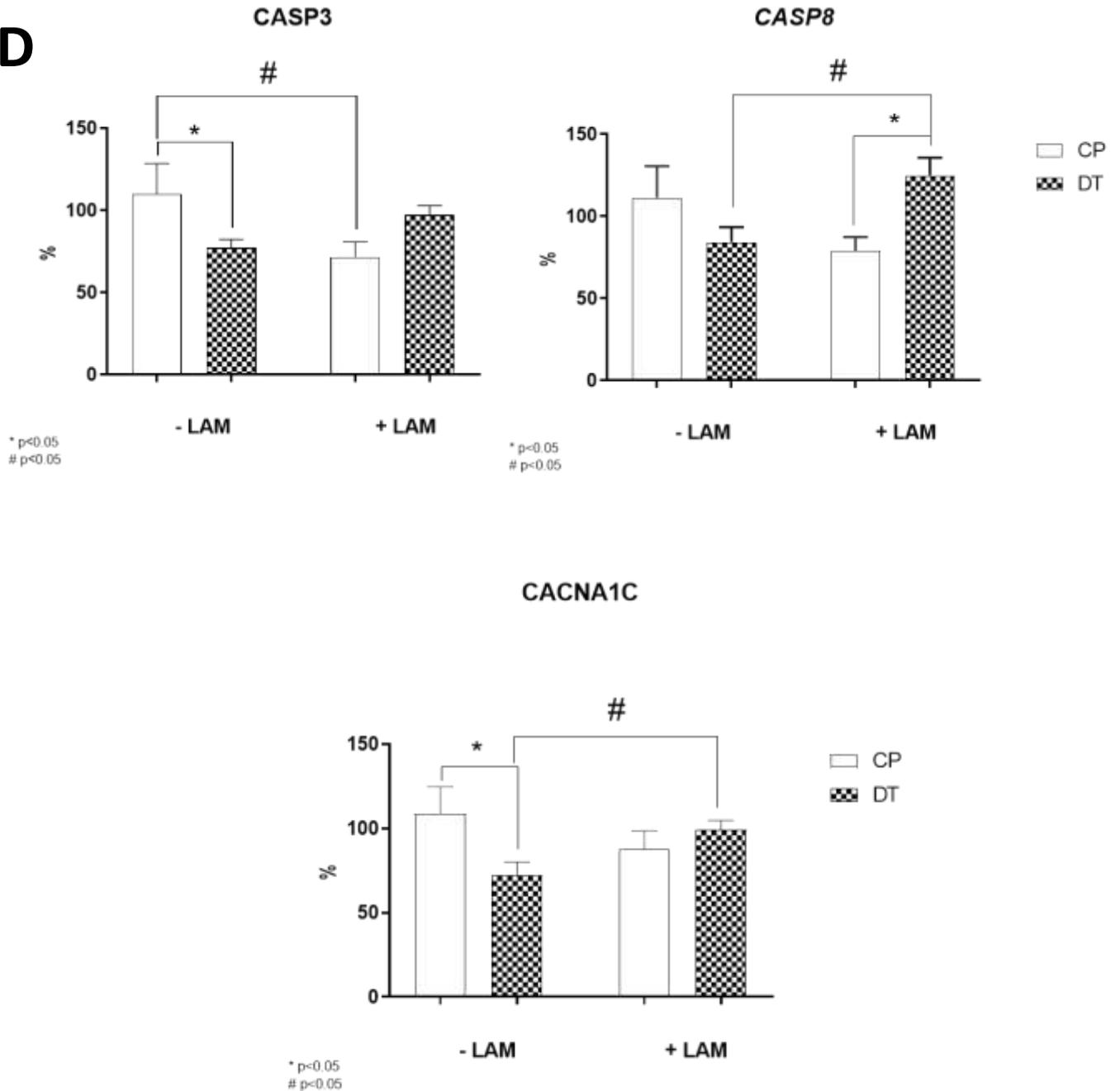
D

Figura 34: Dados (Média, em **negrito +/- SEM, em *itálico*) da expressão dos genes *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *AKT1*, *AMPA1*, *MAPK8*, *NFKβ1*, *CACNA1C* e *BDNF***

Nas três regiões do SNC (**Painel A: CPF**, **Painel B: Hipocampo**, **Painel C: Tálamo** e **Painel D: Gráficos/Barras genes com diferenças significativas**) nos quatro grupos experimentais: CP e CP-LAM, DT e DT-LAM. As amostras foram coletadas nos tempos T5 e T6, respectivamente.

Os dados são expressos em %, normalizados em relação ao gene *house keeper*. (*Detalhes em Material e Métodos*). Testes Grubbs ($\alpha = 0,05$) e *post hoc* Fisher foram usados para detectar *outliers* e comparações múltiplas, respectivamente. Representações com a cor vermelha indicam níveis mais altos, e com a cor azul, indicam níveis mais baixos ($p < 0,05$).

Efeito do tratamento com DT associado ou não ao consumo de etanol sobre a expressão de genes envolvidos na morte neuronal – Exps. V e VI.

Experimento V:

O experimento V se caracteriza como um estudo fatorial 2 x 2, com os fatores dieta (com e sem tiamina) e consumo de líquido (com e sem consumo crônico de etanol). As amostras foram coletadas no 10º dia (T1) após início do episódio de DT. Os grupos experimentais foram: CP, ET, ET-DT e DT. A única diferença entre CP e ET é o consumo de etanol, entre CP e DT é a deficiência de tiamina.

As amostras foram coletadas nas três regiões do SNC (CPF, H e T), e os genes estudados foram *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *AKT1*, *MAPK8*, *AMPA1*, *CACNA1C*, *NFKβ1* e *BDNF*.

CPF:

Não foram observados efeitos significativos dos tratamentos, DT e ET, e nem interação entre esses dois fatores, para nenhum dos genes analisados nesta região, com exceção dos genes *AMPA1* e *CACNA1C*, que foram afetados de forma significativa pela DT. **(Figura 35 - Painel A):**

CASP8, DT, $F_{(1,36)}=0,34$, $P=0,565$; ET, $F_{(1,36)}=1,15$, $P=0,290$ e interação $F_{(1,36)}=0,12$, $P=0,733$.

CASP9, DT, $F_{(1,36)}=1,34$, $P=0,254$; ET, $F_{(1,36)}=2,03$, $P=0,163$ e interação $F_{(1,36)}=0,39$, $P=0,536$.

CASP3, DT, $F_{(1,36)}=0,06$, $P=0,806$; ET ($F_{(1,36)}=0,44$, $P=0,510$ e interação $F_{(1,36)}=0,43$, $P=0,514$).

AKT1, DT, ($F_{(1,36)}=0,00$, $P=0,972$; ET, $F_{(1,36)}=2,66$, $P=0,112$ e interação ($F_{(1,36)}=0,41$, $P=0,525$).

MAPK8, DT, $F_{(1,36)}=0,17$, $P=0,685$; ET, $F_{(1,36)}=0,00$, $P=0,949$ e interação ($F_{(1,36)}=0,63$, $P=0,431$).

AMPA1, houve efeito significativo da DT ($F_{(1,35)}=25,83$, $P<0,0001$); ausência de efeito para o tratamento ET ($F_{(1,35)}=0,44$, $P=0,513$); e ausência de interação ($F_{(1,35)}=0,91$, $P=0,347$). Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferença significativa (aumento):

* $p=0,006$, ET (101,5 % +/- 2,2%) vs ET-DT (117,2 % +/- 5,1%);

** $p=0,0002$, ET (101,5 % +/- 2,2%) vs DT (123,4% +/- 3,9%);

** $p=0,004$, ET-DT (117,2% +/- 5,4%) vs CP (100,4% +/- 3,1%);

** $p=0,0002$, CP (100,4% +/- 3,1%) vs DT (123,4% +/- 3,9%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre

$p=0,840$ entre CP (100,4% +/- 3,1%) vs ET (101,5 % +/- 2,2%)

$p=0,255$ entre ET-DT (117,2% +/- 5,4%) vs DT (123,4% +/- 3,9%)

CACNA1C, efeito significativo da DT ($F_{(1,35)}=10,12$, $P=0,003$); ausência de efeito do tratamento ET ($F_{(1,35)}=0,019$, $P=0,890$) e ausência de interação ($F_{(1,35)}=3,18$, $P=0,083$).

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferença significativa

* $p=0,027$, ET (115,5 % +/- 3,7%) vs DT (140,2 % +/- 11,1%);

* $p=0,036$, ET-DT (125,9% +/- 6,6%) vs CP (103,3% +/- 7,3%);

**p=0,0014, CP (103,3% +/- 7,3%) vs DT (140,2% +/- 11,5%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

p=0,323, ET (115,5 % +/- 3,7%) vs ET-DT (125,9% +/- 6,6%);

p= 0,247, CP (103,3% +/- 7,3%) vs ET (115,5 % +/- 3,7%);

p= 0,189, ET-DT (125,9% +/- 6,6%) vs DT (140,2% +/- 11,5%).

NFKβ1, Não houve efeitos significativos da DT ($F_{(1,36)}=0,31$, $P=0,583$; nem do ET ($F_{(1,36)}=0,66$, $P=0,421$; e nem interação ($F_{(1,36)}=0,43$, $P=0,515$).

BDNF, DT Não houve efeitos significativos da ($F_{(1,31)}=0,63$, $P=0,430$; nem do ET ($F_{(1,31)}=1,21$, $P=0,280$; e nem interação ($F_{(1,31)}=2,30$, $P=0,139$).

Hipocampo:

Ao contrário do observado no CPF, no hipocampo quase todos os genes analisados foram afetados pela DT e/ou ET, havendo ou não interação significativa dos fatores. Apenas o gene *CACNA1C* não foi afetado pelos tratamentos (DT e ET), não havendo interação significativa entre esses fatores. **(Figura 35 - Painel B)**

CASP8, observamos efeito significativo dos tratamentos DT, $F_{(1,35)}=7,71$, $P=0,009$ e ET ($F_{(1,35)}=4,16$, $P=0,049$; e uma tendência para interação, $F_{(1,35)}=3,82$, $P=0,059$).

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferença significativa:

**p=0,002, ET (98,2 % +/- 7,0%) vs ET-DT (70,5% +/- 5,0%);

**p=0,002, ET-DT (70,5% +/- 5,0%) vs CP (101,3% +/- 5,7%);

**p=0,007, ET-DT (70,5% +/- 5,0%) vs DT (96,0% +/- 6,2%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

p=0,952, ET (98,2 % +/- 7,0%) vs CP (101,3% +/- 5,7%);

p= 0,602, ET (98,2 % +/- 7,0%) vs DT (96,0% +/- 6,2%);

p= 0,570 CP (101,3% +/- 5,7%) vs DT (96,0% +/- 6,2%).

CASP9, ausência de efeito dos tratamentos DT, $F_{(1,35)}=0,46$, $P=0,500$ e ET, $F_{(1,35)}=0,00$, $P=0,996$ e de interação entre esses fatores, $F_{(1,35)}=3,60$, $P=0,066$. Como houve uma tendência para efeito de interação, resolvemos verificar através de teste *post hoc* (Fischer) se existe uma possível diferença entre os grupos.

Teste *post hoc* mostrou apenas uma tendência de diferença, $p=0,07$, entre ET (112,9% +/- 4,7%) e ET-DT (96,6% +/- 7,2%).

CASP3, efeito significativo da DT, $F_{(1,35)}=9,08$, $P=0,005$; ausência de efeito do ET, $F_{(1,35)}=1,12$, $P=0,298$ e ausência de interação, $F_{(1,35)}=0,368$, $P=0,548$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou as seguintes diferenças significativas:

*p=0,014, ET (97,8 % +/- 5,4%) vs ET-DT (78,6% +/- 5,8%);

**p=0,008, ET-DT (78,6% +/- 5,8%) vs CP (100,3% +/- 2,7%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

p=0,756, ET (97,8 % +/- 5,4%) vs CP (100,3% +/- 2,7%);

p= 0,170, ET (97,8 % +/- 5,4%) vs DT (87,5% +/- 6,2%);

p= 0,241, ET-DT (78,6% +/- 5,8%) vs DT (87,5% +/- 6,2%);

p=0,102 DT (87,5% +/- 6,2%) vs CP (100,3% +/- 2,7%).

AKT1, efeito significativo da DT, $F_{(1,35)}=7,53$, $P=0,010$; ausência de efeito do ET, $F_{(1,35)}=0,90$, $P=0,349$; mas ocorreu interação significativa entre os fatores ($F_{(1,35)}=7,83$, $P=0,008$).

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

** $p=0,0003$, ET (111,8% +/- 5,1%) vs ET-DT (78,3% +/- 6,9%);

* $p=0,014$, ET-DT (78,3% +/- 6,9%) vs CP (100,6% +/- 3,9%);

* $p=0,011$, ET-DT (78,3% +/- 6,9%) vs DT (100,9% +/- 7,1%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,970$, ET (111,8% +/- 5,1%) vs ET-DT (78,3% +/- 6,9%);

$p=0,205$, ET (111,8% +/- 5,1%) vs CP (100,6% +/- 3,9%);

$p=0,207$, ET (111,8% +/- 5,1%) vs DT (100,9% +/- 7,1%).

MAPK8, não houve efeito da DT, $F_{(1,35)}=1,15$, $P=0,291$; mas houve efeito significativo de ET, $F_{(1,35)}=5,75$, $P=0,022$; e ausência de interação significativa, apenas uma tendência, $F_{(1,35)}=3,03$, $P=0,091$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

* $p=0,021$, ET-DT (83,3% +/- 4,9%) vs CP (100,6% +/- 3,8%);

* $p=0,005$, ET-DT (83,3% +/- 4,9%) vs DT (103,9% +/- 6,6%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,052$, ET (97,3 % +/- 3,6%) vs ET-DT (83,3% +/- 4,9%);

$p=0,650$, ET (97,3 % +/- 3,6%) vs CP (100,6% +/- 3,8%);

$p=0,348$, ET (97,3 % +/- 3,6%) vs DT (103,9% +/- 6,6%);

$p=0,644$ DT (103,9% +/- 6,6%) vs CP (100,6% +/- 3,8%).

AMPA1, não houve efeitos significativo da DT, $F_{(1,35)}=2,97$, $P=0,094$; e ET, $F_{(1,35)}=3,82$, $P=0,059$; mas mostrou interação significativa entre os fatores, $F_{(1,35)}=5,61$, $P=0,024$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

* $p=0,006$, ET (102,8% +/- 4,2%) vs ET-DT (81,5% +/- 6,4%);

* $p=0,015$, ET-DT (81,5% +/- 6,4%) vs CP (100,6% +/- 4,0%);

** $p=0,004$, ET-DT (81,5% +/- 6,4%) vs DT (104,0% +/- 5,5%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,656$, CP (100,6% +/- 4,0%) vs DT (104,0% +/- 5,5%);

$p=0,775$, ET (102,8% +/- 4,2%) vs CP (100,6% +/- 4,0%);

$p=0,870$ ET (102,8% +/- 4,2%) vs DT (104,0% +/- 5,5%).

CACNA1C, não houve efeitos significativos da DT, $F_{(1,35)}=1,39$, $P=0,246$; e do ET, $F_{(1,35)}=1,23$, $P=0,275$; e nem interação significativa dos fatores, $F_{(1,35)}=1,66$, $P=0,206$.

NFK β 1, não houve efeito significativo da DT, $F_{(1,35)}=3,21$, $P=0,082$; mas houve efeito significativo do ET, $F_{(1,35)}=8,05$, $P=0,008$; sem efeito de interação entre os fatores, $F_{(1,35)}=1,13$, $P=0,295$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

* $p=0,048$, ET (93,1% +/- 3,3%) vs ET-DT (80,8% +/- 5,1%);

** $p=0,003$, ET-DT (80,8% +/- 5,1%) vs CP (100,8% +/- 4,3%);

* $p=0,008$, ET-DT (80,8% +/- 5,1%) vs DT (97,6% +/- 4,3%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,615$, CP (100,8% +/- 4,3%) vs DT (97,6% +/- 4,3%);

$p=0,224$, ET (93,1% +/- 3,3%) vs CP (100,8% +/- 4,3%);

$p=0,458$ ET (93,1% +/- 3,3%) vs DT (97,6% +/- 4,3%).

BDNF, houve efeito significativo da DT, $F_{(1,33)}=133,0$, $P<0,0001$; mas ausência de efeito do ET, $F_{(1,33)}=0,91$, $P=0,348$; com interação significativa entre os fatores, $F_{(1,33)}=7,42$, $P=0,010$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

*** $p<0,0001$, ET (106,2% +/- 3,8%) vs ET-DT (57,2% +/- 2,0%);

*** $p<0,0001$, ET (106,2% +/- 3,8%) vs DT (69,8% +/- 4,4%);

*** $p<0,0001$, ET-DT (57,2% +/- 2,0%) vs CP (100,1% +/- 2,0%);

* $p=0,013$, ET-DT (57,2% +/- 2,0%) vs DT (69,8% +/- 4,4%);

*** $p<0,0001$, CP (100,1% +/- 2,0%) vs DT (69,8% +/- 4,4%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,226$, ET (106,2% +/- 3,8%) vs CP (100,1% +/- 2,0%);

Tálamo:

No tálamo observamos efeito dos tratamentos DT e ET em quase todos os genes analisados. Apenas os genes *CASP8*, *CASP3* e *AKT1* não foram afetados por nenhum dos dois tratamentos (DT e ET). Também não foi observada interação entre esses fatores para esses dois genes. **(Figura 35 - Painel C):**

CASP8, não ocorreram efeitos significativos da DT, $F_{(1,34)}=0,00$, $P=0,986$ e nem do ET, $F_{(1,34)}=2,30$, $P=0,139$; e nem interação, $F_{(1,34)}=0,032$, $P=0,860$.

CASP9, não foram observados efeitos significativos da DT, $F_{(1,34)}=2,20$, $P=0,147$, mas houve efeitos significativos do ET $F_{(1,34)}=6,68$, $P=0,014$ e interação entre os dois fatores $F_{(1,34)}=5,43$, $P=0,026$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

* $p=0,007$, ET (99,4% +/- 6,9%) vs DT (127,4% +/- 8,1%);

** $p=0,001$, ET-DT (93,6% +/- 6,5%) vs DT (127,4% +/- 8,1%);

* $p=0,011$, CP (101,3% +/- 5,1%) vs DT (127,4% +/- 8,1%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,435$, CP (101,3% +/- 5,1%) vs ET-DT (93,6% +/- 6,5%);

$p=0,553$, ET (99,4% +/- 6,9%) vs ET-DT (93,6% +/- 6,5%);

$p=0,854$ ET (99,4% +/- 6,9%) vs CP (101,3% +/- 5,1%).

CASP3, não ocorreram efeitos significativos dos tratamentos DT, $F_{(1,34)}=2,07$, $P=0,159$ e ET, $F_{(1,34)}=2,08$, $P=0,158$; e não houve efeito significativo da interação entre os dois fatores, $F_{(1,34)}=3,95$, $P=0,055$, apenas uma tendência.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

* $p=0,020$, ET (66,9 % +/- 6,2%) vs ET-DT (51,5 % +/- 4,6%);

* $p=0,049$, ET-DT (51,5 % +/- 4,6%) vs CP (64,5% +/- 1,1%);

* $p=0,018$, ET-DT (51,5 % +/- 4,6%) vs DT (66,9 % +/- 4,5%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,702$, CP (64,5% +/- 1,1%) vs DT (66,9 % +/- 4,5%);

$p=0,710$, CP (64,5% +/- 1,1%) vs ET (66,9 % +/- 6,2%);

$p=0,999$ ET (66,9 % +/- 6,2%) vs DT (66,9 % +/- 4,5%).

AKT1, não foram observados efeitos significativos dos tratamentos DT, $F_{(1,33)}=0,19$, $P=0,662$ e ET, $F_{(1,33)}=1,99$, $P=0,167$; e nem interação entre esses dois fatores $F_{(1,33)}=2,99$, $P=0,093$.

MAPK8, não houve efeitos significativos dos tratamentos DT, $F_{(1,34)}=4,12$, $P=0,050$ e ET, $F_{(1,34)}=4,04$, $P=0,052$; e nem efeito significativo da interação entre esses dois fatores, $F_{(1,34)}=3,27$, $P=0,079$. No entanto, considerando o valor de “p” houve tendências de efeitos dos tratamentos e interação entre os dois fatores. Portanto, apesar de não observamos efeitos significativos, decidimos verificar se havia alguma diferença detectada pelo teste *post hoc* (Fischer).

Teste *post hoc* mostrou diferenças significativas:

* $p=0,010$, ET (99,82 % +/- 4,6%) vs ET-DT (79,9% +/- 6,7%);

* $p=0,007$, ET-DT (79,9% +/- 6,7%) vs CP (100,9% +/- 4,4%);

* $p=0,009$, ET-DT (79,9% +/- 6,7%) vs DT (99,7% +/- 4,2%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,876$, CP (100,9% +/- 4,4%) vs DT (99,7% +/- 4,2%);

$p=0,890$, CP (100,9% +/- 4,4%) vs ET (99,82 % +/- 4,6%);

$p=0,989$ ET (99,82 % +/- 4,6%) vs DT (99,7% +/- 4,2%).

AMPA1, não foram observados efeitos significativos dos tratamentos DT, $F_{(1,34)}=1,47$, $P=0,23$ e ET, $F_{(1,34)}=0,002$, $P=0,966$; por outro lado ocorreu interação significativa entre esses dois fatores, $F_{(1,35)}=6,53$, $P=0,0152$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferença significativa,

* $p=0,012$, CP (100,5% +/- 4,4%) vs DT (123,4% +/- 8,7%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,350$, ET (100,8% +/- 4,3%) vs ET-DT (97,6% +/- 4,3%);

$p=0,092$, ET (93,1% +/- 3,3%) vs CP (100,8% +/- 4,3%);

$p=0,380$ ET (93,1% +/- 3,3%) vs DT (97,6% +/- 4,3%).

$p=0,414$, ET-DT (100,8% +/- 4,3%) vs CT (97,6% +/- 4,3%);

$p=0,068$, ET-DT (93,1% +/- 3,3%) vs DT (100,8% +/- 4,3%);

CACNA1C, houve efeito significativo da DT, $F_{(1,34)}=7,77$, $P=0,009$; ausência de efeitos significativos do ET, $F_{(1,34)}=3,51$, $P=0,070$; e da interação entre esses dois fatores, $F_{(1,34)}=2,79$, $P=0,104$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas

** $p=0,003$, ET (100,6% +/- 8,5%) vs ET-DT (67,8% +/- 8,6%);

** $p=0,002$, ET-DT (67,8% +/- 8,6%) vs CP (102,1% +/- 6,5%);

* $p=0,015$, ET-DT (67,8% +/- 8,6%) vs DT (93,8% +/- 5,4%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,435$, DT (93,8% +/- 5,4%) vs CP (102,1% +/- 6,5%);

$p=0,889$, ET (100,6% +/- 8,5%) vs CP (102,1% +/- 6,5%);

$p=0,523$ ET (100,6% +/- 8,5%) vs DT (93,8% +/- 5,4%).

NFKβ1, não foram observados efeitos significativos da DT, $F_{(1,34)}=0,44$, $P=0,511$ e do ET, $F_{(1,34)}=2,77$, $P=0,105$; mas houve efeito significativo da interação entre esses dois fatores, $F_{(1,34)}=5,21$, $P=0,029$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

* $p=0,007$, ET-DT (95,0% +/- 7,4%) vs DT (119,7% +/- 5,0%);

* $p=0,045$ CP (101,2% +/- 5,4%) vs DT (119,7% +/- 5,0%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,261$, ET (105,1% +/- 6,9%) vs ET-DT (95,0% +/- 7,4%);

$p=0,673$, ET (105,1% +/- 6,9%) vs CP (101,2% +/- 5,4%);

$p=0,109$ ET (105,1% +/- 6,9%) vs DT (93,8% +/- 5,4%);

$p=0,484$, CP (101,2% +/- 5,4%) vs ET-DT (95,0% +/- 7,4%).

BDNF, foram observados efeitos significativos da DT, $F_{(1,36)}=11,02$, $P=0,002$; ausência de efeitos para o tratamento com ET ($F_{(1,36)}=1,26$, $P=0,270$ e da interação entre esses dois fatores, $F_{(1,35)}=0,36$, $P=0,302$.

Teste *post hoc* (Fischer) mostrou diferenças significativas:

** $p=0,004$, ET (106,3% +/- 7,1%) vs ET-DT (66,7% +/- 6,0%);

** $p=0,003$, ET-DT (66,7% +/- 6,0%) vs CP (107,0% +/- 12,6%).

Teste *post hoc* não mostrou efeito significativo entre:

$p=0,959$, ET (106,3% +/- 7,1%) vs CP (107,0% +/- 12,6%);

$p=0,129$, ET (106,3% +/- 7,1%) vs DT (86,4% +/- 9,3%);

$p=0,134$ ET-DT (66,7% +/- 6,0%) vs DT (86,4% +/- 9,3%);

$p=0,117$, CP (107,0% +/- 12,6%) vs DT (86,4% +/- 9,3%).

A CPF

		CP	ET	ET-DT	DT
		T1 n=9-10	T1 n=10	T1 n=10	T1 n=9-10
Expressão gênica	CASP3	101,90 6,19	101,80 3,47	97,81 7,34	95,12 6,15
	CASP8	101,80 6,18	89,58 6,56	87,54 12,09	93,81 8,28
	CASP9	103,80 8,38	109,60 5,80	122,70 5,65	107,70 8,87
	AKT1	103,80 8,56	122,10 10,22	116,60 5,61	102,50 3,45
	MAPK8	101,10 4,52	105,30 3,75	103,40 4,39	107,00 6,40
	AMPA1	100,40 3,10	101,50 2,25	117,20 5,14	123,40 3,94
	CACNA1C	103,30 7,36	115,50 3,66	125,90 6,89	140,20 11,05
	NFKB1	101,20 5,23	94,66 3,65	100,10 3,28	100,80 5,29
	BDNF	103,00 8,07	115,60 10,03	98,45 8,40	138,30 30,21

Aumento



Em relação ao grupos:

AMPA1	ET
AMPA1	CP e ET
AMPA1	CP
CACNA1C	CP e ET
CACNA1C	CP

B Hipocampo

		CP	ET	ET-DT	DT
		T1 n=8-9	T1 n=10	T1 n=9-10	T1 n=10
Expressão gênica	CASP3	100,30 2,68	97,88 5,46	78,57 5,81	87,44 6,20
	CASP8	101,30 5,71	98,23 6,94	70,48 5,00	96,04 6,27
	CASP9	100,90 4,55	113,00 4,75	96,58 7,17	108,60 7,91
	AKT1	100,60 3,99	111,80 5,08	78,31 6,99	100,90 7,12
	MAPK8	100,60 3,85	97,31 3,56	83,32 4,98	103,90 6,67
	AMPA1	100,60 4,01	102,80 4,20	81,50 6,44	104,00 5,50
	CACNA1C	100,90 4,87	102,00 4,83	86,16 7,65	101,60 7,47
	NFKB1	100,80 4,34	93,13 3,27	80,80 5,05	97,64 4,39
	BDNF	100,10 2,00	106,20 3,85	57,19 2,00	69,84 4,40

Diminuição



Em relação ao grupos:

CASP8	CP, ET e DT
CASP3	CP e ET
AKT1	CP, ET e DT
MAPK8	CP, DT
AMPA1	CP e ET
AMPA1	DT
NFKB1	ET e DT
NFKB1	CP
BDNF	DT
BDNF	CP e ET
BDNF	CP e ET

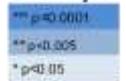
C Tálamo

		CP	ET	ET-DT	DT
		T1 n=8-9	T1 n=9	T1 n=10	T1 n=10
Expressão gênica	CASP3	64,50 1,11	66,96 6,17	51,49 4,68	66,97 4,46
	CASP8	101,10 5,21	85,93 5,92	87,69 6,22	99,66 14,07
	CASP9	101,30 5,12	99,43 6,94	93,63 6,50	127,40 8,12
	AKT1	100,20 2,46	103,00 9,46	91,75 9,28	119,10 9,66
	MAPK8	100,90 4,44	99,83 4,62	79,96 6,70	99,72 4,25
	AMPA1	100,50 3,49	115,70 4,36	107,60 5,66	123,40 8,68
	CACNA1C	102,10 6,53	100,60 8,46	67,81 8,59	93,88 5,36
	NFKB1	101,20 5,41	105,10 6,87	94,97 7,35	119,70 5,04
	BDNF	107,00 12,57	106,30 7,06	66,65 5,89	86,35 9,29

Aumento



Diminuição



Em relação ao grupos:

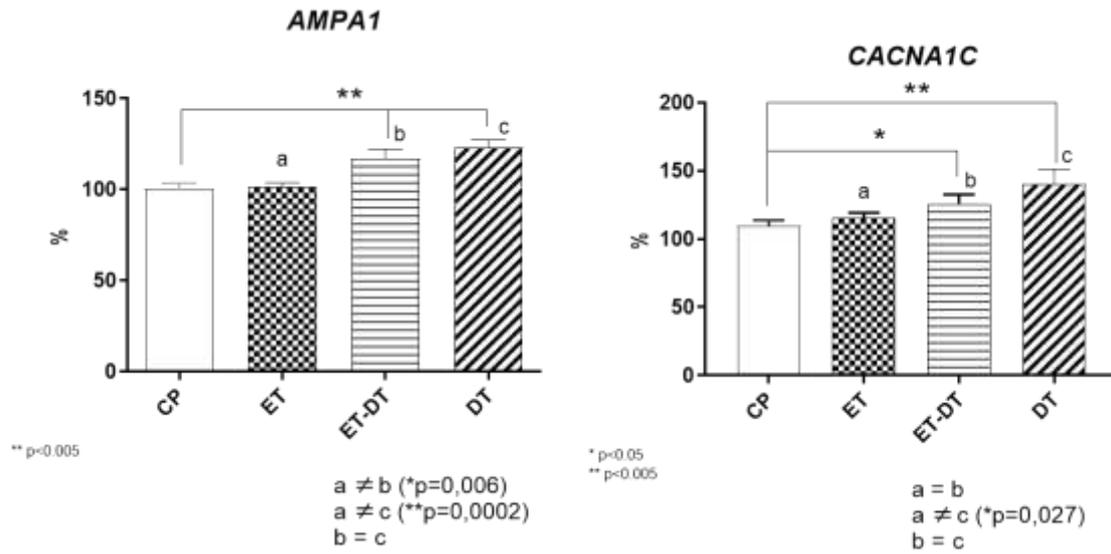
CASP9	CP e ET
CASP9	ETDT
AMPA1	CP
NFKB1	CP e ET-DT

Em relação ao grupos:

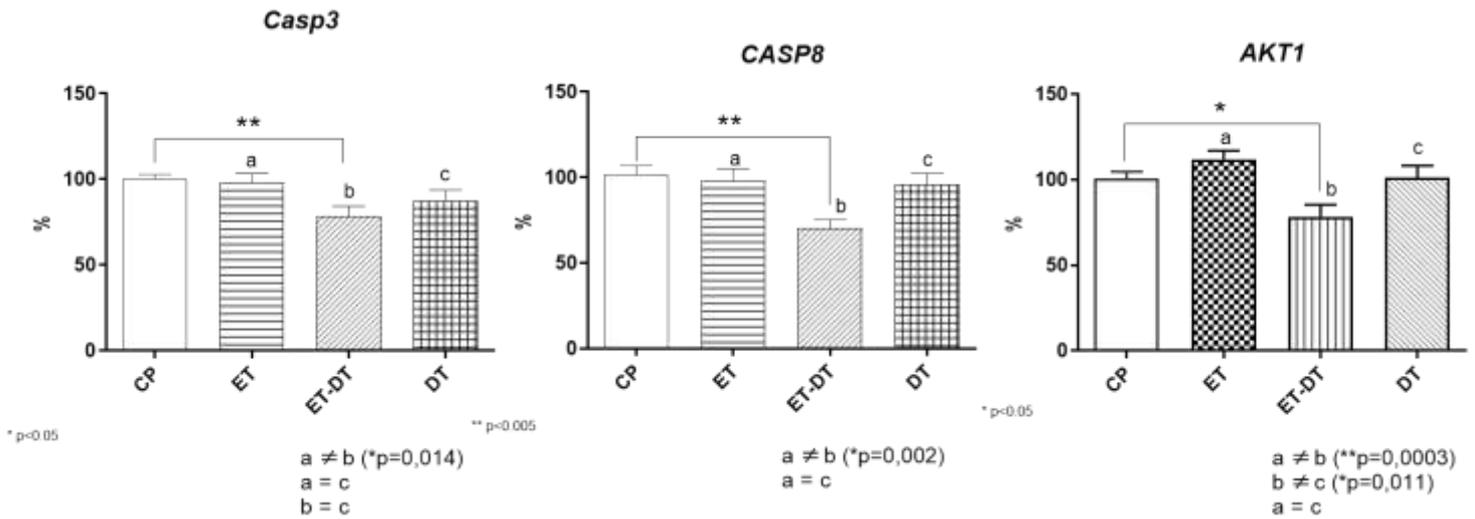
CACNA1C	CE e ET
CACNA1C	DT
BDNF	CP e ET

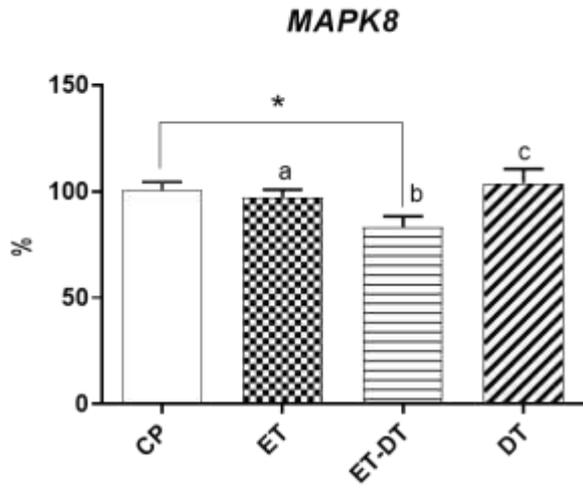
D

CPF



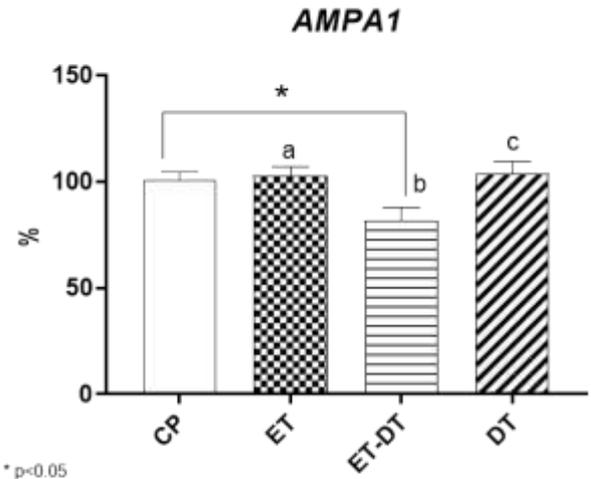
Hipocampo





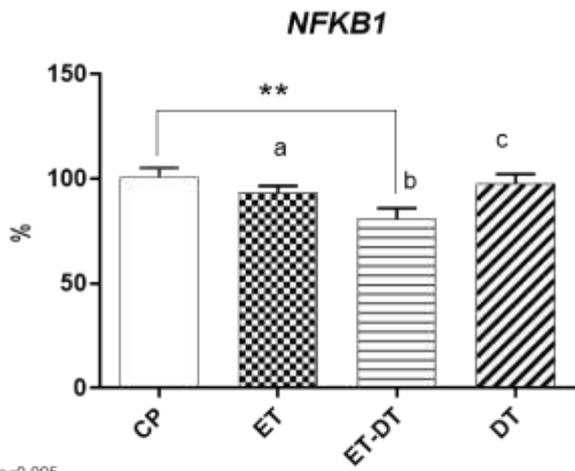
* p<0.05

a ≠ b (**p=0,0003)
 b = c
 a = c



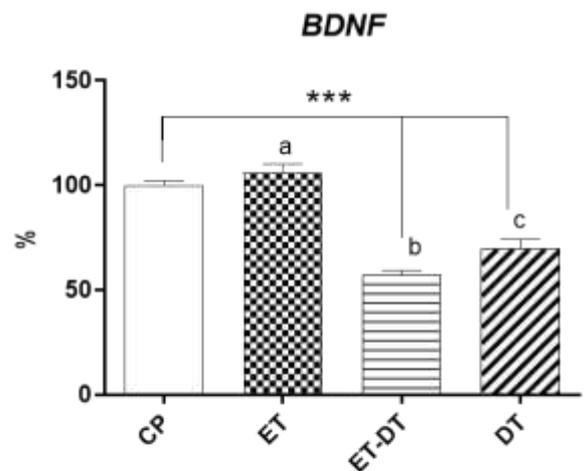
* p<0.05

a ≠ b (*p=0,006)
 b ≠ c (**p=0,004)
 a = c



** p<0.005

a ≠ b (*p=0,048)
 b ≠ c (**p=0,008)
 a = c



*** p<0.0001

a ≠ b (***p<0,0001)
 b = c
 a ≠ c (***p<0,0001)

Tálamo

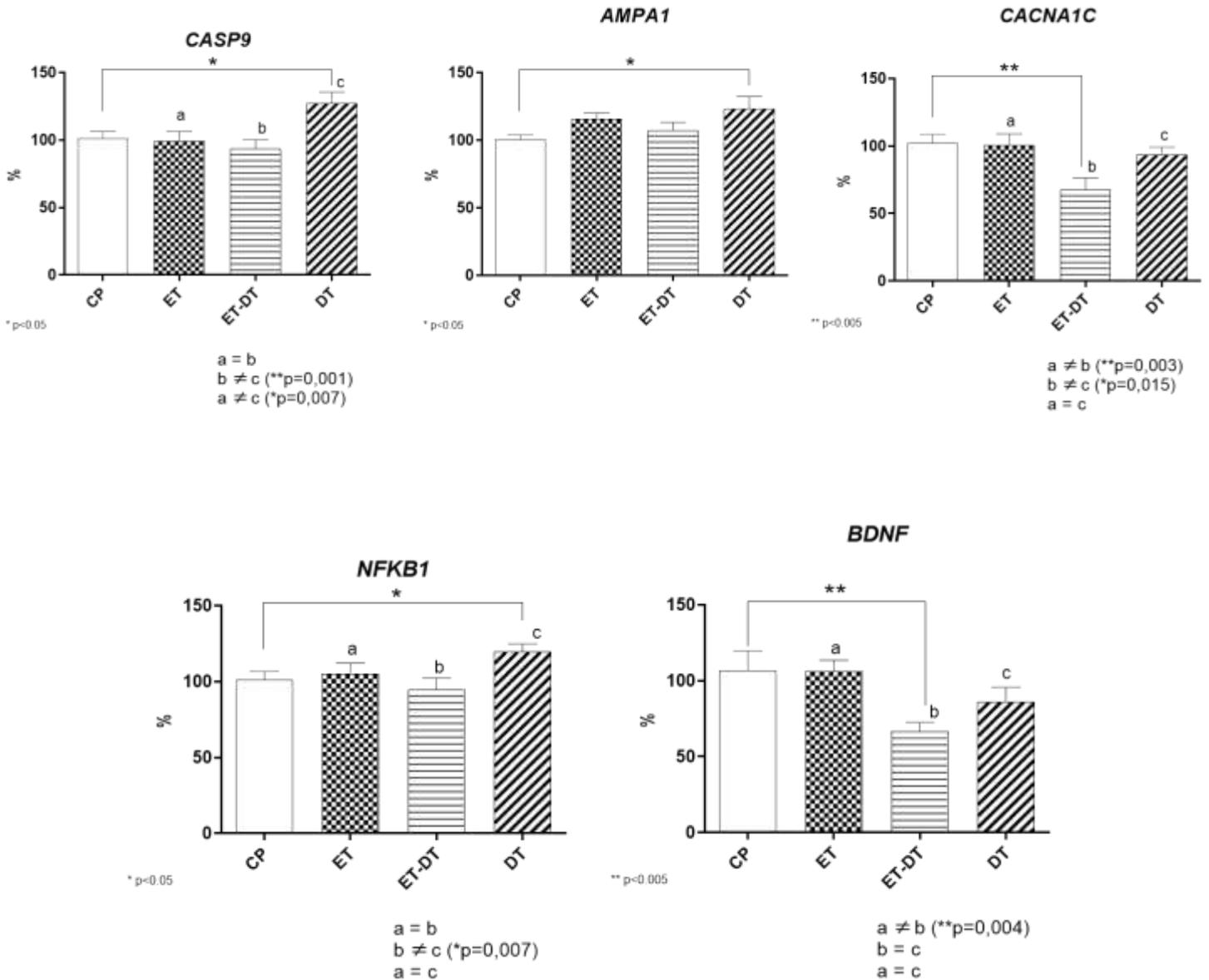


Figura 35: Dados (Média, em negrito +/- SEM, em itálico) da expressão dos genes CASP8, CASP9, CASP3, AKT1, AMPA1, MAPK8, NFKβ1, CACNA1C e BDNF

Nas três regiões do SNC (**Painel A: CPF, Painel B: Hipocampo, painel C: Tálamo e Painel D: Gráficos/Barras genes com diferenças significativas**) dos quatro grupos experimentais: CP (Controle Pareado), DT (Deficiência de Tiamina), ET (consumo crônico de ETanol) e ET-DT (consumo crônico de Etanol associado à Deficiência de Tiamina). As amostras foram coletadas no tempo T1 (10^o dia do episódio de DT). Os dados estão expressos em %, normalizados em relação ao gene house keeper. (Detalhes em Material e Métodos). Testes Grubbs ($\alpha = 0,05$) e post hoc Fisher foram usados para detectar outliers e comparações múltiplas, respectivamente. As cores (vermelho ou azul) indicam diferenças detectadas nos testes *post hoc*.

Experimento VI:

Conforme descrito em Material e Métodos, os grupos experimentais que constituíram o experimento VI foram:

- CP: Controle Pareado → Dieta deficiente em tiamina em quantidade pareada ao consumido pelo grupo DT no dia anterior, associada com injeções de tiamina.
- ET: Dieta comercial padrão controle associada ao consumo crônico de etanol
- ET-T: Mesma dieta dos animais do grupo ET, com suplementação de Tiamina;
- DT → Dieta deficiente em tiamina associada com injeções de pirritiamina (i.p.) diárias (0,25 mg/kg), reversão do episódio de DT correspondentes a 1h (DT-1h) após o aparecimento dos sinais neurológicos.
- DT → Dieta deficiente em tiamina associada com injeções de pirritiamina (i.p.) diárias (0,25 mg/kg), reversão do episódio de DT correspondentes a 4h (DT-4h) após o aparecimento dos sinais neurológicos.
- ET-DT: Mesma dieta dos animais DT associada com injeções diárias de pirritiamina, associada ao consumo crônico de etanol.

Amostras das três regiões do SNC (CPF, H e T), tanto para os controles (CP) como para os que receberam tratamento de DT e/ou ET, foram coletadas em três tempos diferentes (estágios clínicos distintos) dos processos de tratamento. Os três tempos (T) de coleta foram:

T2': 14 dias após início do episódio de DT, o qual corresponde ao último dia do episódio – delineamento experimental B;

T3': um dia de recuperação, ou seja, 24 horas após reversão (com injeções de tiamina, 100 mg/Kg), do episódio de DT – delineamento experimental B;

T4': três semanas de recuperação, ou seja, 21 dias após reversão (com injeções de tiamina, 100 mg/Kg), do episódio de DT – delineamento experimental B.

Os resultados abaixo se referem às seguintes análises, para cada variável dependente:

- (i) existência de diferenças significativas entre os dados obtidos nos três estágios em relação aos grupos controles (CP-T2', CP-T3', CP-T4') para cada uma das variáveis dependentes medidas (genes *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *AKT1*, *MAPK8*, *AMPA1*, *CACNA1C* e *NFκβ1*). No caso de ausência de diferença significativa entre os três grupos CPs, esses foram agrupados constituindo apenas um grupo denominado Controle Pareado Final. Por outro lado, se houver efeito significativo do tempo (entre CP T2', CPT3' CPT4'), as comparações foram realizadas entre cada grupo CP e os dados obtidos nos grupos testes (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h, DT-4h), para cada um dos tempos separadamente (T2', T3' e T4').
- (ii) entre os dados do grupo Controle Pareado Final e os dados obtidos nos grupos testes (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h, DT-4h), para cada um dos tempos separadamente (T2', T3' e T4'), para cada uma das variáveis dependentes.
- (iii) entre os dados obtidos para cada variável dependente nos três tempos diferentes (T2', T3' e T4'), para cada um dos grupos testes separadamente (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h). P.ex. Dados obtidos para *CASP3*, nos tempos T2', T3' e T4' para o grupo ET.

CPF:
(Figura 36)

CASP8:

- (i) Não houve diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,53$ $P=0,241$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não houve efeitos significativos dos tratamentos no tempo T2', $F_{(5,54)}=1,84$, $P=0,120$, em relação ao grupo CP final, nem no tempo T3', $F_{(5,53)}=1,93$, $P=0,105$, em relação ao grupo CP final e nem no tempo T4', $F_{(5,59)}=0,48$, $P=0,793$, em relação ao grupo CP final.
- (iii) Não houve efeito significativo dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

CASP9:

- (i) Os dados obtidos dos grupos controle pareados, dos três tempos, não foram agrupados, porque houve efeito significativo do tempo, $F_{(2,21)}=5,69$ $P=0,001$.

Teste *post hoc* (Fisher) mostrou diferença entre os tempos T2' e T4' ($p=0,008$). Assim, para a *CASP9*, os grupos CPs (T2', T3' e T4') não foram agrupados.

- (ii) Houve efeitos significativos dos tratamentos $F_{(5,38)}=2,57$, $P=0,042$ para o tempo T3', e ausência de efeitos significativos para T2' $F_{(5,38)}=2,18$, $P=0,077$ e T4' $F_{(5,43)}=2,10$, $P=0,084$, para esses dois tempos, apenas uma tendência.

Análises "*post hoc* (Fisher), T3", mostraram:

*p=0,041, **ET** (86,2% +/- 3,3) diminuição de 15% em relação ao **CP-T3'** (103,4 +/- 5,1)%.

Para os tempos T2' e T4', que foram apenas tendências na ANOVA:

*p=0,006, DT-1h (108,4 +/-7,8), um aumento em relação à **CP-T2'** (87,6% +/- 5,2).

*p=0,012, DT-1h (78,5 +/-1,4), uma diminuição em relação à **CP-T4'** (113,9% +/- 6,3).

*p=0,005, ET-T (86,2 +/-3,9), uma diminuição em relação à **CP-T4'** (113,9% +/- 6,3).

(iii) Efeitos entre os Tempos (T2', T3' e T4')

Não houve efeito significativo dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

CASP3:

(i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,55$ $P=0,235$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.

(ii) Houve efeito significativo dos tratamentos $F_{(5,54)}=2,53$, $P=0,040$ no tempo **T2'** em relação ao CP Final. Não houve efeitos significativos dos tratamentos nos tempos T3' $F_{(5,54)}=1,11$, $P=0,369$ e T4' $F_{(5,59)}=0,89$, $P=0,494$.

Análises *post hoc* (Fisher) mostraram para o **T2'**:

*p=0,018, **ET-T** (85,9% +/- 5,3) menor em relação ao CP-Final (101,4 +/- 3,5)%.

*p=0,008, **DT-4h** (83,7% +/- 4,0), menor em relação ao CP-Final (101,4% +/- 3,5).

(iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,20)}=6,28$, $P=0,008$, apenas para o grupo **DT-4h**.

Testes *post hoc* (Fisher), para **DT-4h**, mostraram diferenças significativas:

** $p=0,003$, T2' (83,7% +/- 4,0) menor em relação à T3' (102,7% +/- 2,7);

* $p=0,013$, T2' (83,7% +/- 4,0) menor em relação à T4' (94,9% +/- 2,7)

AKT1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=2,44$, $P=0,112$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,54)}=0,79$, $P=0,556$), T3' ($F_{(5,54)}=1,35$, $P=0,259$) e T4' ($F_{(5,59)}=1,27$, $P=0,288$)
- (iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

MAPK8:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=0,64$, $P=0,540$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,54)}=1,76$, $P=0,137$), T3' ($F_{(5,54)}=0,47$, $P=0,800$) e T4' ($F_{(5,59)}=0,70$, $P=0,624$)
- (iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

AMPA1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,27$, $P=0,303$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,54)}=1,20$, $P=0,326$), T3' ($F_{(5,54)}=1,61$, $P=0,172$) e T4' ($F_{(5,59)}=0,27$, $P=0,927$)
- (iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

CACNA1C:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=0,53$, $P=0,595$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,54)}=1,42$, $P=0,230$), T3' ($F_{(5,54)}=0,78$, $P=0,570$) e T4' ($F_{(5,59)}=0,50$, $P=0,774$)
- (iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

NFκβ1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=3,37$, $P=0,054$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Houve efeitos significativos dos tratamentos $F_{(5,54)}=4,14$, $P=0,003$ para o tempo **T2'**, e ausência de efeitos significativos para T3' $F_{(5,54)}=1,75$, $P=0,390$ e T4' $F_{(5,59)}=1,04$, $P=0,405$, para esses dois tempos.

Análises *post hoc* (Fisher) mostraram no T2':

*p=0,046, ET (89,0% +/- 3,2) menor em relação ao CP-final (102,20 +/- 4,3)%.

**p=0,004, ET-DT (82,5% +/-4,8) menor em relação ao CP-final (102,20 +/- 4,3)%.

**p=0,0005, ET-T (76,8% +/- 4,2) menor em relação ao CP-final (102,20 +/- 4,3)%.

*p=0,019, DT-4h (85,7% +/- 3,2) menor em relação ao CP-final (102,20 +/- 4,3)%.

(iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,20)}=5,20$, $P=0,015$, apenas para o grupo ET-T.

Testes *post hoc* (Fisher), para ET-T, mostraram diferenças significativas:

**p=0,004, T2' (76,8% +/- 4,2) menor em relação à T3' (103,3% +/- 7,5).

A

		CP			ET			ET-DT			ET-T			DT-1h			DT-4h		
		T2'-T4'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'
		n=8 - 24	n=8	n=8	n=7-8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=7	6-7	n=9	n=6	n=5	6-8	n=7	n=8	n=7-8
Expressão gênica	CASP3	101,40 3,06			97,49 5,65	86,70 4,82	91,49 5,40	89,63 4,42	94,78 6,03	93,48 5,12	85,69 5,28	87,15 6,12	91,76 5,93	91,52 2,69	105,20 6,19	98,77 3,87	83,73 3,98	102,70 2,67	94,97 2,69
	CASP8	103,30 5,41			87,76 6,34	88,11 6,462	103,7 8,577	82,67 7,057	103,8 11,02	107,5 6,448	85,58 9,218	81,5 9,579	97,44 5,524	82,7 7,079	94,46 5,23	91,73 7,159	97,76 6,404	79,4 4,396	104,8 11,11
	& CASP9	87,59 5,16	103,40 5,08	113,90 8,32	96,01 4,51	86,24 3,26	97,96 7,94	95,02 2,78	106,10 7,82	94,91 7,25	87,09 3,62	86,57 7,39	86,22 3,64	108,40 7,76	88,14 4,74	78,48 1,35	93,36 5,71	103,60 5,61	97,05 8,00
	AKT1	101,30 3,44			99,07 3,44	91,01 4,57	99,56 8,34	93,32 4,61	96,76 4,66	100,70 5,00	101,60 5,33	98,22 7,93	86,43 3,67	106,90 7,86	112,80 6,81	92,58 7,28	93,04 7,83	106,50 7,29	97,28 3,28
	MAPK8	103,00 5,28			91,95 5,49	90,48 7,40	93,43 8,26	85,74 4,61	97,93 4,28	93,10 7,08	85,57 7,02	98,92 8,41	90,45 4,47	104,30 5,78	97,55 9,88	95,07 4,86	89,29 4,93	104,00 6,02	95,78 3,69
	AMPA1	101,80 3,84			107,40 10,87	95,74 6,99	98,52 7,99	96,53 5,16	99,69 2,79	96,16 5,91	90,76 5,36	95,09 5,62	95,94 5,08	113,70 6,04	100,70 6,77	97,61 4,63	102,80 5,47	118,70 10,44	101,60 4,07
	CACNA1C	102,90 4,928			103,90 7,703	88,69 7,11	99,55 7,541	92,13 6,215	100,60 6,807	107,10 6,522	89,50 7,337	97,73 6,382	97,22 3,978	116,50 9,066	101,40 7,729	94,64 5,211	107,40 7,155	108,80 8,598	96,76 5,043
	NFKB1	102,20 4,28			88,96 3,21	84,15 3,53	93,16 8,44	82,53 4,83	94,16 5,51	92,37 4,78	76,82 4,15	103,30 7,45	89,96 4,63	89,91 3,67	90,32 3,08	90,14 6,46	85,66 3,16	94,95 3,62	92,09 4,23

Aumento

Grupo Teste > CP	T3'>T2'/T4'>T2'
*** p<0.0001	*** p<0.0001
** p<0.005	** p<0.005
* p<0.05	* p<0.05

Diminuição

Grupo Teste < CP	T3'<T2'
*** p<0.0001	*** p<0.0001
** p<0.005	** p<0.005
* p<0.05	* p<0.05

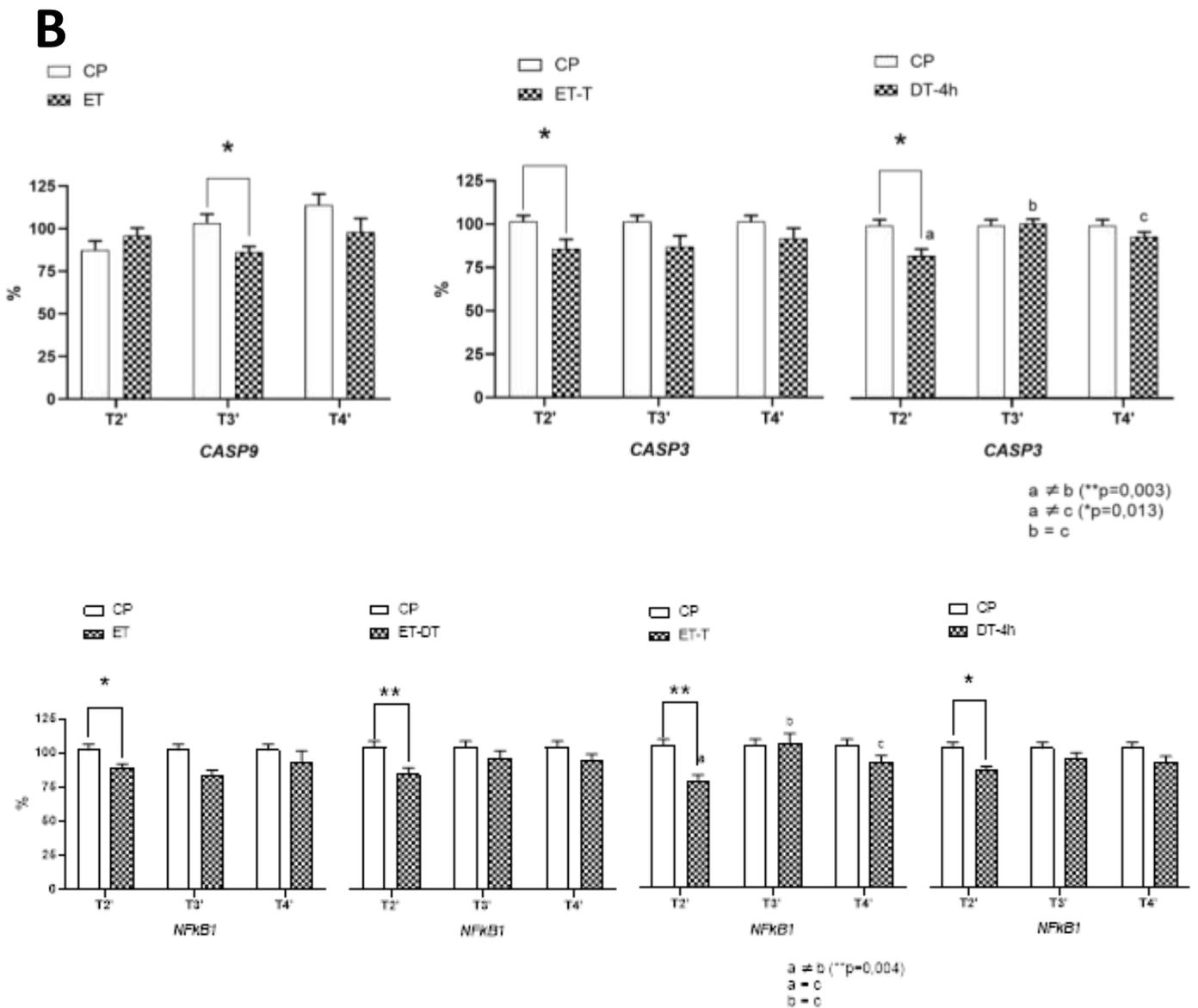


Figura 36: Dados (Média, em **negrito +/- SEM, em *itálico*) da expressão dos genes *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *AKT1*, *AMPA1*, *MAPK8*, *CACNA1C* e *NFκβ1*, em amostras do CPF**

Seis grupos experimentais: CP, ET, ET-T, ET-DT, DT-1h e DT-4h (**Painel A**); Gráficos/Barras genes com diferenças significativas (**Painel B**).

As amostras foram coletadas nos tempos T2', T3' e T4'. & Na coluna CP, os valores são de CP Final, resultado dos agrupamentos de CPT2', CPT3' e CPT4', exceto para *CASP9*. Os dados são expressos em %, normalizados em relação ao gene *house keeper*. (*Detalhes em Material e Métodos*). Testes Grubbs ($\alpha = 0,05$) e *post hoc* Fisher foram usados para detectar *outliers* e comparações múltiplas, respectivamente. As cores (vermelho ou azul cheio ou em linhas horizontais) indicam diferenças detectadas nos testes *post hoc* para comparações entre “grupos testes” vs “CP Final ou CPs correspondentes para *CASP9*” e entre os Tempos (T2', T3' e T4'), respectivamente.

Hipocampo:
(Figura 37)

CASP8:

- (i) Não houve diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=2,60$ $P=0,098$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Houve efeitos significativos dos tratamentos no tempo **T2'**, $F_{(5,58)}=2,41$, $P=0,047$, em relação ao grupo CP final. Não houve efeito no tempo T3', $F_{(5,57)}=1,10$, $P=0,370$, em relação ao grupo CP final e nem no tempo T4', $F_{(5,59)}=1,33$, $P=0,264$, em relação ao grupo CP final.

Testes *Post hoc* mostraram para o **T2'**:

* $p=0,027$, **ET** (78,5 +/-6,2), menor em relação à **CP final** (102,3% +/- 4,7).

* $p=0,06$, **DT-1h** (75,3 +/-8,7), menor em relação à **CP final** (102,3% +/- 4,7).

- (iii) Não houve efeito significativo dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

CASP9:

- (i) Os dados obtidos dos grupos controle pareados, dos três tempos, foram agrupados, porque não houve efeito significativo do tempo, $F_{(2,21)}=0,92$ $P=0,414$.

- (ii) Não foram observados efeitos significativos dos tratamentos $F_{(5,58)}=1,30$, $P=0,277$ para o tempo **T2'**, para **T3'** $F_{(5,57)}=0,99$, $P=0,432$ e **T4'** $F_{(5,59)}=0,83$, $P=0,532$
- (iii) Não houve efeito significativo dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

CASP3:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,29$ $P=0,296$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Houve efeito significativo dos tratamentos $F_{(5,58)}=2,39$, $P=0,049$ no tempo **T2'** em relação ao CP Final. Não houve efeitos significativos dos tratamentos nos tempos **T3'** $F_{(5,57)}=1,25$, $P=0,297$ e **T4'** $F_{(5,59)}=2,18$, $P=0,070$ (tendência)

Análise *post hoc* (Fisher), do tempo **T2'**, mostrou:

* $p=0,030$, **ET** (85,2% +/- 4,3) menor em relação ao CP-Final (101,6 +/- 3,6)%.

Para o tempo **T4'** (tendência):

* $p=0,026$, **DT-1h** (90,7% +/- 5,1) menor em relação ao CP-Final (101,6 +/- 3,6)%.

- (iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,22)}=11,98$, $P=0,0003$, apenas para o grupo **DT-1h**.

Testes *post hoc* (Fisher), para **DT-1h**, mostraram diferenças significativas:

** $p=0,0003$, **T2'** (90,7% +/- 5,1) menor em relação à **T3'** (121,6% +/- 6,4);

****p=0,0005, T2' (90,7% +/- 5,1) menor em relação à T4' (116,5% +/- 1,3)**

AKT1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,13$, $P=0,342$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,58)}=1,51$, $P=0,201$), T3' ($F_{(5,57)}=0,54$, $P=0,745$) e T4' ($F_{(5,59)}=1,08$, $P=0,380$)
- (iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

MAPK8:

- (i) Os dados obtidos dos grupos controle pareados, dos três tempos, não foram agrupados, porque houve efeito significativo do tempo, $F_{(2,20)}=0,537$, $P=0,593$.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,57)}=1,78$, $P=0,131$), T3' ($F_{(5,56)}=1,00$, $P=0,426$) e T4' ($F_{(5,58)}=1,01$, $P=0,421$).
- (iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

AMPA1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=0,21$, $P=0,814$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.

- (ii) Foi observado efeito significativo dos tratamentos no tempo **T2'** ($F_{(5,58)}=3,07$, $P=0,016$). Não foram observados efeitos significativos nos tempos **T3'** ($F_{(5,57)}=1,93$, $P=0,103$) e **T4'** ($F_{(5,59)}=0,78$, $P=0,566$).

Testes *Post hoc* (Fisher), para **DT-1h**, mostrou diferença significativa:

* $p=0,025$, **T2'** (83,06% +/- 8,8) menor em relação à CP Final (101,7% +/- 3,7).

- (iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,22)}=11,77$, $P=0,0003$, apenas para o grupo **DT-1h**.

Testes *post hoc* (Fisher), para **DT-1h**, mostraram diferenças significativas:

** $p=0,0002$, **T2'** (83,06% +/- 8,8) menor em relação à **T3'** (123,4% +/- 3,8);

** $p=0,001$, **T2'** (83,06% +/- 8,8) menor em relação à **T4'** (117,0% +/- 4,7)

CACNA1C:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – **T2'**, **T3'** e **T4'**): $F_{(2,21)}=0,04$, $P=0,964$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.

- (ii) Foi observado efeito significativo dos tratamentos no tempo **T2'** ($F_{(5,58)}=2,52$, $P=0,039$). Não foram observados efeitos significativos nos tempos **T3'** ($F_{(5,57)}=1,97$, $P=0,097$), apenas tendência; e nem **T4'** ($F_{(5,59)}=1,66$, $P=0,158$).

Teste *Post hoc* para o tempo **T2'**:

* $p=0,012$, **DT4h T2'** (122,3% +/- 10,1) maior em relação ao CP-Final (101,5 +/- 3,6)%.

Para o tempo **T3'** (tendência):

* $p=0,06$, **DT1h T3'** (124,4% +/- 6,0) maior em relação ao CP-Final (101,5 +/- 3,6)%.

- (iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,22)}=5,75$, $P=0,010$, apenas para o grupo **DT-1h**.

Testes *post hoc* (Fisher), para **DT-1h**, mostraram diferenças significativas:

* $p=0,005$, T2' (98,4% +/- 7,1) menor em relação à T3' (124,4% +/- 6,0);

* $p=0,016$, T2' (98,4% +/- 7,1) menor em relação à T4' (120,0% +/- 3,6);

NFk β 1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,19$, $P=0,323$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,58)}=1,83$, $P=0,120$), T3' ($F_{(5,57)}=1,59$, $P=0,178$) e T4' ($F_{(5,59)}=0,99$, $P=0,429$)
- (iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,22)}=3,97$, $P=0,034$, apenas para o grupo **DT-1h**.

Testes *post hoc* (Fisher), para **DT-1h**, mostraram diferenças significativas:

* $p=0,027$, T2' (91,2% +/- 7,5) menor em relação à T3' (116,8% +/- 7,4);

A

		CP	ET			ET-DT			ET-T			DT-1h			DT-4h		
		T2'-T4' n=24	T2' n=7-8	T3' n=8	T4' n=8	T2' n=8	T3' n=8	T4' n=7-8	T2' n=8	T3' n=7	T4' n=8	T2' n=9	T3' n=8	T4' n=7-8	T2' n=8	T3' n=7-8	T4' n=7-8
Expressão gênica	CASP3	101,60 3,58	85,23 4,26	88,19 6,31	96,94 6,32	102,50 4,99	102,40 6,17	107,20 6,65	90,05 4,41	100,60 4,15	91,35 9,60	90,67 5,09	121,60 6,40	116,50 1,25	108,60 9,23	113,00 5,16	113,20 3,58
	CASP8	102,30 4,66	78,48 6,17	84,77 7,57	99,51 5,41	95,28 5,69	90,34 7,49	85,03 3,79	83,53 8,79	92,98 1,55	83,63 6,93	75,30 8,68	103,60 11,88	101,50 4,45	96,88 13,02	106,20 8,89	96,82 9,22
	CASP9	102,40 4,35	89,13 4,93	90,80 7,02	95,87 9,34	106,80 6,67	99,98 9,94	105,50 8,17	86,61 6,12	101,20 7,15	86,90 7,30	101,10 9,93	103,70 4,65	102,60 9,39	103,20 0,82	114,30 8,46	98,15 6,11
	AKT1	103,60 5,33	84,43 3,18	89,39 7,22	98,65 12,41	103,20 8,00	94,68 11,78	101,70 8,47	86,05 6,74	98,03 6,84	81,36 7,66	86,97 10,73	99,27 6,87	94,49 10,31	98,04 5,10	104,60 7,72	105,60 8,22
	MAPK8	100,90 2,93	88,17 6,63	93,66 9,08	99,08 2,66	107,10 6,44	101,00 5,77	102,70 6,75	88,91 3,35	94,77 4,32	97,24 8,32	98,41 6,05	109,50 8,23	107,50 3,75	102,60 7,56	93,65 6,18	99,01 5,26
	AMPA1	101,70 3,68	88,23 6,68	100,40 11,53	96,99 6,92	110,10 4,20	105,80 7,24	104,60 10,11	91,52 6,64	116,00 1,89	101,00 10,97	83,06 8,78	123,40 3,79	117,00 4,65	114,30 10,80	107,40 7,74	104,20 7,94
	CACNA1C	101,50 3,56	95,31 5,85	100,00 10,60	96,53 2,81	111,70 5,01	106,00 8,16	117,80 11,71	94,55 7,20	108,10 3,73	103,40 12,57	98,40 7,09	124,40 6,04	120,00 3,57	122,30 10,07	112,70 6,50	112,30 7,11
	NFKB1	101,40 3,46	83,33 4,21	93,80 8,41	95,17 5,19	100,80 3,27	97,45 6,73	97,95 7,14	86,92 4,31	99,59 4,44	88,24 6,94	91,22 7,54	116,80 7,36	100,60 3,46	94,83 9,34	99,44 4,70	93,98 3,92

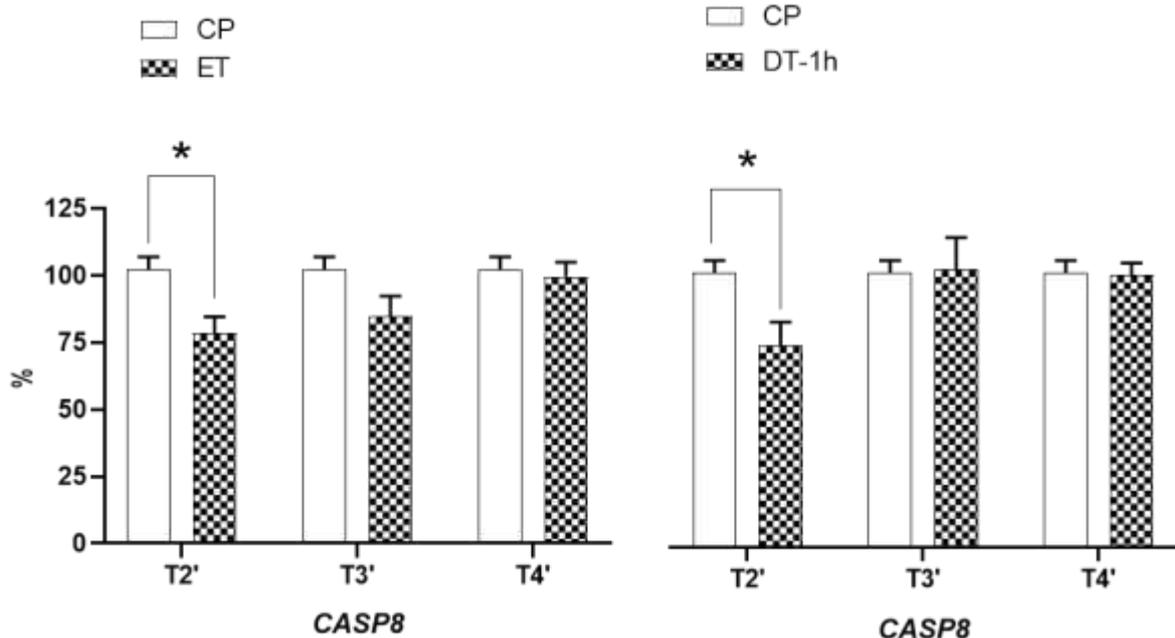
Aumento

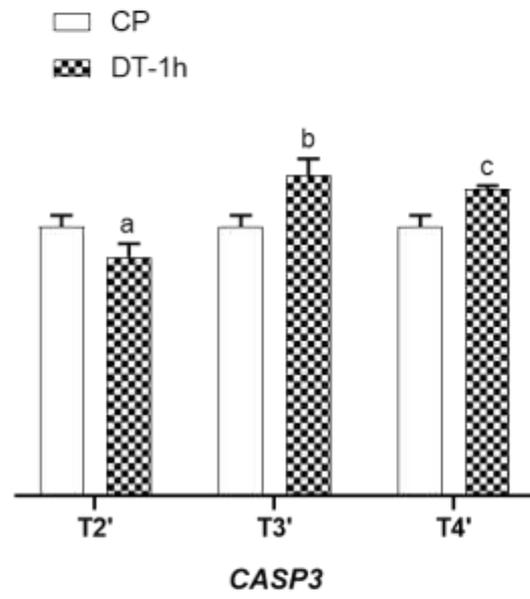
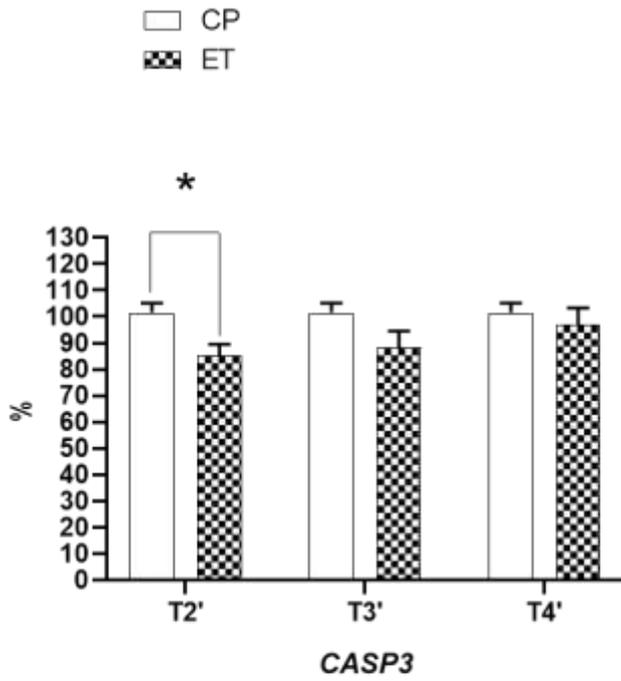
Grupo Teste > CP	T3'>T2'/T4'>T2'
*** p<0.0001	*** p<0.0001
** p<0.005	** p<0.005
* p<0.05	* p<0.05

Diminuição

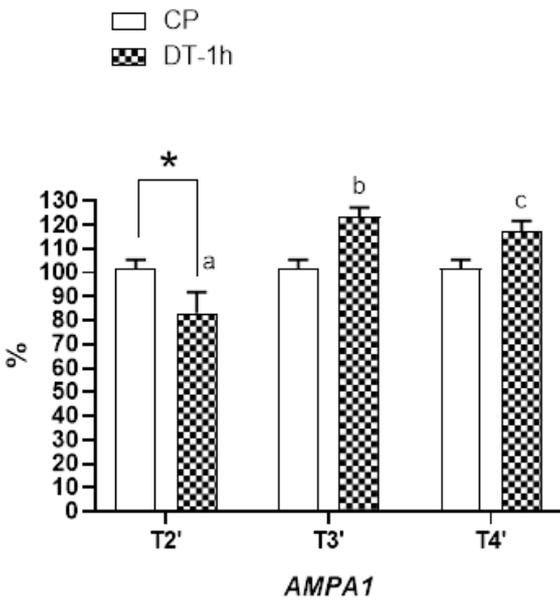
Grupo Teste < CP	T3'<T2'
*** p<0.0001	*** p<0.0001
** p<0.005	** p<0.005
* p<0.05	* p<0.05

B

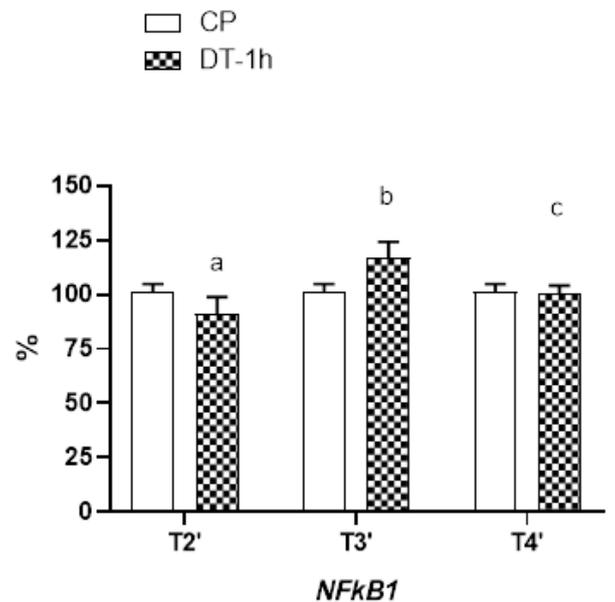




a ≠ b (**p=0,0003)
 a = c (**p=0,0005)
 b = c



a ≠ b (**p=0,0002)
 a ≠ c (**p=0,001)
 b = c



a ≠ b (*p=0,027)
 a = c

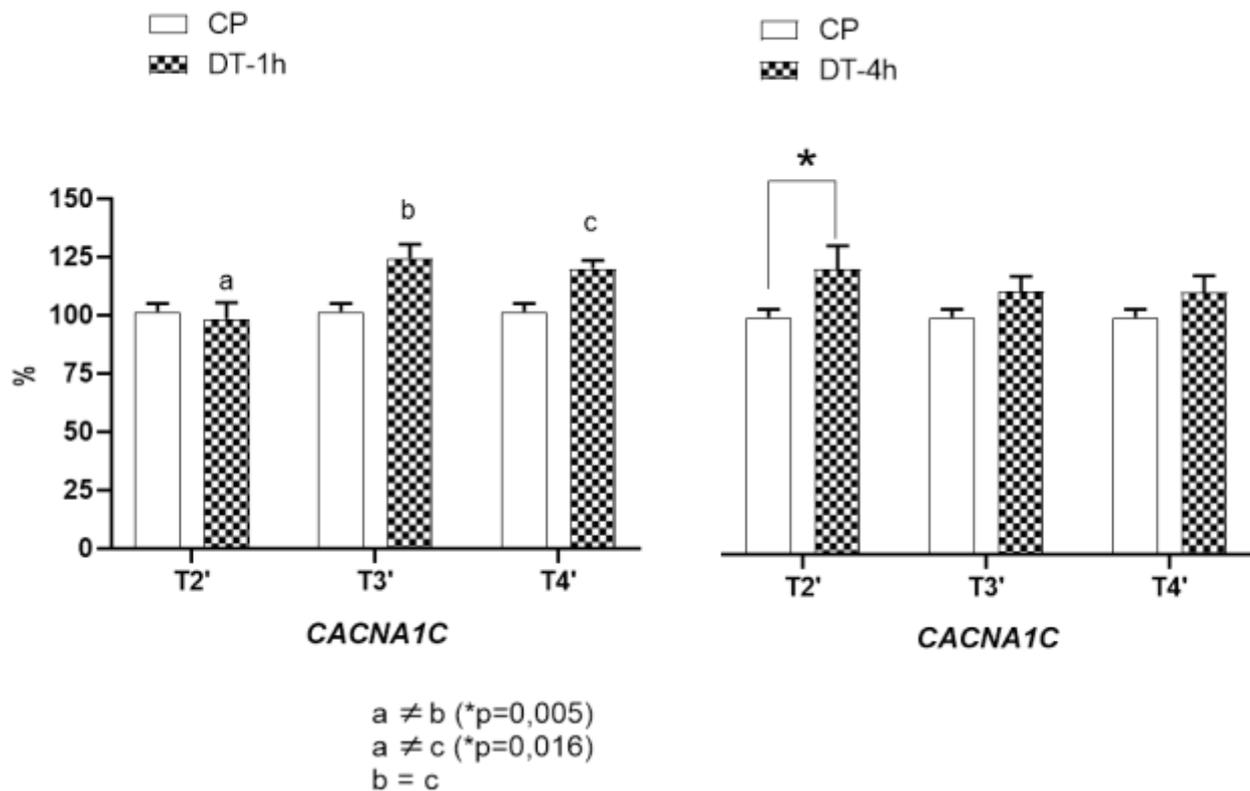


Figura 37: Dados (Média, em negrito +/- SEM, em itálico) da expressão dos genes *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *AKT1*, *AMPA1*, *MAPK8*, *CACNA1C* e *NFκβ1*, em amostras do HIPOCAMPO

Seis grupos experimentais: CP, ET, ET-T, ET-DT, DT-1h e DT-4h (**Painel A**); Gráficos/Barras genes com diferenças significativas (**Painel B**).

As amostras foram coletadas nos tempos T2', T3' e T4'. Na coluna CP, os valores são de CP Final, resultado do agrupamento dos CPT2', CPT3' e CPT4'

Os dados são expressos em %, normalizados em relação ao gene *house keeper*. (Detalhes em *Material e Métodos*). Testes Grubbs ($\alpha = 0,05$) e *post hoc* Fisher foram usados para detectar *outliers* e comparações múltiplas, respectivamente. As cores (vermelho ou azul cheio ou em linhas horizontais) indicam diferenças detectadas nos testes *post hoc* para comparações entre “grupos testes” vs “CP Final e entre os Tempos (T2', T3' e T4’), respectivamente.

Tálamo:
(Figura 38)

CASP8:

- (i) Não houve diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,90$, $P=0,175$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Foram observados efeitos significativos dos tratamentos no Tempo T2', $F_{(5,59)}=3,24$, $P=0,012$, T3', $F_{(5,57)}=6,04$, $P=0,0001$ e T4', $F_{(5,58)}=8,33$, $P<0,000$, 1em relação ao grupo CP final.

Testes *Post hoc* mostraram:

- * $p=0,007$, **DT-4h, T2'** (146,5 +/-29,1), maior em relação à **CP final** (103,2% +/- 5,3).
- ** $p=0,0009$, **DT1h, T3'** (154,7 +/-13,3), maior em relação à **CP final** (103,2% +/- 5,3).
- ** $p=0,0005$, **DT4h, T3'** (157,3 +/-24,3), maior em relação à **CP final** (103,2% +/- 5,3).
- * $p=0,016$, **ET-DT, T4'** (135,3 +/-14,5), maior em relação à **CP final** (103,2% +/- 5,3).
- *** $p<0,0001$, **DT-1h,T4'** (158,5 +/-7,9), maior em relação à **CP final** (103,2% +/- 5,3).
- ** $p=0,003$, **DT-4h, T4'** (142,8 +/-12,0), maior em relação à **CP final** (103,2% +/- 5,3).
- (iii) Não houve efeito significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T , DT-1h e DT-4h)

CASP9:

- (i) Os dados obtidos dos grupos controle pareados, dos três tempos, foram agrupados, porque não houve efeito significativo do Tempo, $F_{(2,21)}=1,81$ $P=0,188$.

- (ii) Foi observado efeito significativo dos tratamentos no tempo **T2'** ($F_{(5,59)}=2,48$, $P=0,042$). Não foram observados efeitos significativos nos tempos **T3'** ($F_{(5,57)}=1,86$, $P=0,115$), apenas tendência; e nem **T4'** ($F_{(5,58)}=0,99$, $P=0,431$).

Teste *Post hoc* para o tempo **T2'**:

* $p=0,024$, **ET T2'** (81,1% +/- 6,8) menor em relação ao CP-Final (102,6 +/- 4,6)%.

* $p=0,036$, **DT-4h T2'** (82,7% +/- 7,0) menor em relação ao CP-Final (102,6 +/- 4,6)%.

- (iii) Não houve efeito significativo dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

CASP3:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=3,38$, $P=0,053$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,59)}=1,74$, $P=0,140$), T3' ($F_{(5,57)}=0,60$, $P=0,703$) e T4' ($F_{(5,58)}=1,30$, $P=0,276$)
- (iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,21)}=6,21$, $P=0,008$, apenas para o grupo **ET**.

Teste *Post hoc* (Fisher), para **ET**, mostrou diferença significativa:

** $p=0,002$, T2' (86,8% +/- 7,5) menor em relação à T4' (119,8% +/- 7,2).

Teste *Post hoc*, para **ET**, mostrou as seguintes tendências:

$p=0,094$, T2' (86,8% +/- 7,5) menor em relação à T3' (103,2% +/- 4,9).

$p=0,092$, T3' (103,2% +/- 4,9) menor em relação à T4' (119,8% +/- 7,2).

AKT1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,48$, $P=0,250$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Foi observado efeito significativo dos tratamentos no tempo **T4'**, ($F_{(5,58)}=2,45$, $P=0,045$) . Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,59)}=1,47$, $P=0,213$), T3' ($F_{(5,57)}=2,07$, $P=0,083$).

Teste *Post hoc* para o tempo **T4'**:

* $p=0,026$, **ET-T, T4'** (80,6% +/- 9,9) menor em relação ao CP-Final (103,0+/- 5,0)%.

Para o tempo **T4'** (**Tendências**):

$p=0,060$, **DT-1h T4'** (84,1% +/- 7,3) menor em relação ao CP-Final (103,0+/- 5,0)%.

$p=0,053$, **DT-4h T4'** (83,5% +/- 6,5) menor em relação ao CP-Final (103,0+/- 5,0)%.

Para o tempo **T3'**:

* $p=0,041$, **ET-T T3'** (82,0% +/- 8,3) menor em relação ao CP-Final (103,0+/- 5,0)%.

* $p=0,011$, **DT-1h T3'** (77,8% +/- 8,5) menor em relação ao CP-Final (103,0+/- 5,0)%.

- (iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T , DT-1h e DT-4h)

MAPK8:

- (i) Os dados obtidos dos grupos controle pareados, dos três tempos, não foram agrupados, porque houve efeito significativo do tempo, $F_{(2,21)}=4,65$, $P=0,021$.

Teste *post hoc* (Fisher) mostrou diferenças entre os tempos T2' e T3' ($p=0,007$). Assim, para a **MAPK8**, os grupos CPs (T2', T3' e T4') não foram agrupados.

- (ii) Houve efeitos significativos dos tratamentos para o tempo **T2'** $F_{(5,43)}=4,54$, $P=0,002$ e **T4'** $F_{(5,42)}=2,79$, $P=0,029$. Não houve efeito significativo para o tempo **T3'** $F_{(5,41)}=0,78$, $P=0,571$.

Análises *post hoc* (Fisher) mostraram, para o **T2'**:

- ** $p=0,0005$, **ET** (75,3% +/- 7,3) menor em relação ao **CP-T2'** (120,1 +/- 6,7)%.
* $p=0,013$, **ET-DT** (87,5% +/- 5,7) menor em relação ao **CP-T2'** (120,1 +/- 6,7)%.
* $p=0,009$, **ET-T** (85,9% +/- 4,0) menor em relação ao **CP-T2'** (120,1 +/- 6,7)%.
** $p=0,003$, **DT-4h** (82,3% +/- 7,3) menor em relação ao **CP-T2'** (120,1 +/- 6,7)%.

Análises *post hoc* (Fisher) mostrou, para o **T4' (Tendência)**:

$p=0,064$, **DT-4h** (77,8% +/- 6,4) menor em relação ao **CP-T4'** (100,1 +/- 5,5)%.

- (iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,21)}=6,60$, $P=0,006$, apenas para o grupo **ET**.

Testes *post hoc* (Fisher), para **ET**, mostraram diferenças significativas:

- ** $p=0,002$, **T2'** (75,4% +/- 7,3) menor em relação à **T4'** (116,8% +/- 7,9);
* $p=0,024$, **T3'** (88,5% +/- 9,4) menor em relação à **T4'** (116,8% +/- 7,9);

AMPA1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (**CP – T2'**, **T3'** e **T4'**): $F_{(2,21)}=0,59$, $P=0,563$, os **CPs** foram agrupados => grupo **CP final**.
- (ii) Foi observado efeito significativo dos tratamentos no tempo **T4'** ($F_{(5,58)}=2,47$, $P=0,043$). Não foram observados efeitos significativos nos tempos **T2'** ($F_{(5,59)}=2,35$, $P=0,052$) e **T3'** ($F_{(5,57)}=1,64$, $P=0,164$).

Teste *Post hoc* para o **T4'** mostrou uma **Tendência**:

$p=0,057$, **ET-T**, **T4'** (81,5% +/- 7,3) menor em relação à CP-Final (102,2% +/- 4,3).

Teste *Post hoc* para o **T2'** mostrou:

* $p=0,030$, **DT-1h**, **T2'** (137,8% +/- 31,2) maior em relação à CP-Final (102,2% +/- 4,3).

(iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

CACNA1C:

(i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=2,00$, $P=0,161$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.

(ii) Foram observados efeitos significativos dos tratamentos nos tempos **T2'** ($F_{(5,59)}=2,58$, $P=0,035$) e **T3'** ($F_{(5,57)}=2,78$, $P=0,026$). Não foi observado efeito significativo no tempo **T4'** ($F_{(5,58)}=2,15$, $P=0,073$), apenas tendência.

Teste *Post hoc* para o tempo **T2'**:

* $p=0,020$, **ET T2'** (75,4% +/- 8,2) menor em relação ao CP-Final (107,5 +/- 7,3)%.

* $p=0,005$, **DT-4h T2'** (68,1% +/- 8,6) menor em relação ao CP-Final (107,5 +/- 7,3)%.

Post hoc para o tempo **T3'**:

** $p=0,004$, **DT-1h T3'** (66,4% +/- 8,8) menor em relação ao CP-Final (107,5 +/- 7,3)%.

* $p=0,008$, **DT-4h T3'** (70,3% +/- 7,5) menor em relação ao CP-Final (107,5 +/- 7,3)%.

Para o tempo **T2'** (tendências):

$p=0,076$, **ET-DT T2'** (83,3% +/- 12,1) menor em relação ao CP-Final (107,5 +/- 7,3)%.

$p=0,055$, **ET-T T2'** (81,3% +/- 6,8) menor em relação ao CP-Final (107,5 +/- 7,3)%.

- (iii) Houve efeito significativo dos Tempos $F_{(2,21)}=6,61$, $P=0,006$, apenas para o grupo **ET**.

Teste *post hoc* (Fisher), para **ET**, mostrou diferença significativa:

** $p=0,002$, **ET**, T2' (75,4% +/- 8,2) menor em relação à T4' (132,7% +/- 11,7);

Teste *post hoc* (Fisher), para **ET**, mostrou uma tendência:

$p=0,058$, T3' (101,1% +/- 13,0) menor em relação à T4' (132,7% +/- 11,7);

NFk β 1:

- (i) Não foram observadas diferenças entre os dados obtidos em cada um dos tempos dos grupos controles (CP – T2', T3' e T4'): $F_{(2,21)}=1,94$, $P=0,169$, os CPs foram agrupados => grupo CP final.
- (ii) Não foram observados efeitos dos tratamentos nos tempos T2' ($F_{(5,59)}=1,52$, $P=0,197$), T3' ($F_{(5,57)}=1,44$, $P=0,224$) e T4' ($F_{(5,58)}=1,79$, $P=0,130$)
- (iii) Não foram observados efeitos significativos dos tempos para nenhum dos tratamentos (ET, ET-DT, ET-T, DT-1h e DT-4h)

A

	CP			ET			ET-DT			ET-T			DT-1h			DT-4h		
	T2'-T4'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'	T2'	T3'	T4'
	n=8 - 24	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=7 - 8	n=8	n=7	n=8	n=9	n=8	n=7 - 8	n=8	n=8	n=8
CASP3	102,30 4,28			86,80 7,45	103,20 4,91	119,80 7,20	91,98 7,39	103,50 10,91	111,90 9,51	86,39 5,68	91,28 8,30	102,90 12,47	109,60 11,16	111,60 11,74	120,10 8,34	111,30 12,84	97,25 9,24	103,30 4,60
CASP8	103,20 5,31			87,70 7,01	99,07 8,68	113,30 5,94	99,32 9,80	111,50 12,42	135,30 14,47	81,66 5,73	83,73 8,01	94,25 9,30	122,30 13,16	154,70 13,30	158,50 7,89	146,50 29,11	157,30 24,32	142,80 11,95
CASP9	102,60 4,60			81,07 6,77	105,20 9,80	106,00 7,41	86,52 4,49	99,37 8,51	94,76 8,43	91,49 5,96	86,28 8,54	85,96 8,61	108,30 12,08	80,64 4,46	94,37 5,80	82,73 6,98	90,01 7,55	93,44 9,19
AKT1	103,00 5,03			81,98 7,89	92,47 9,55	109,80 10,28	90,42 7,65	93,98 6,99	90,64 7,40	94,95 7,41	81,96 8,30	80,55 9,85	92,91 8,52	77,81 8,49	84,14 7,29	83,79 7,89	84,37 6,86	83,53 6,45
MAPK8	120,10 6,74	88,43 9,50	100,10 5,49	75,30 7,31	88,49 9,43	116,8 7,86	87,46 5,72	95,91 12,64	100,40 8,68	85,91 4,01	83,33 11,92	93,44 12,96	95,66 10,18	72,37 8,26	83,39 6,28	82,26 7,26	77,00 6,03	77,78 6,36
AMPA1	102,20 4,32			84,50 10,23	118,80 17,30	119,70 10,20	87,25 8,33	108,20 9,10	89,55 11,46	89,61 8,62	93,00 15,22	81,51 7,34	137,80 31,20	82,83 7,09	94,14 10,89	81,59 9,25	89,06 9,41	112,60 10,53
CACNA1C	107,50 7,32			75,40 8,21	101,10 12,97	132,70 11,73	83,27 12,11	90,82 12,81	105,10 12,76	81,27 6,80	89,23 13,76	97,78 19,56	91,58 14,65	66,37 8,75	83,11 9,17	68,05 8,55	70,29 7,50	83,81 6,76
NFKB1	101,40 3,41			89,25 5,41	90,45 5,56	111,90 9,68	92,15 5,23	96,80 5,44	100,30 6,35	85,66 3,05	86,64 6,12	91,01 7,97	101,90 7,52	102,60 7,40	113,70 6,05	98,17 8,62	105,30 7,50	97,06 2,61

Aumento

Grupo Teste > CP T3'>T2'/T4'>T2'

*** p<0.0001	*** p<0.0001
** p<0.005	** p<0.005
* p<0.05	* p<0.05

Diminuição

Grupo Teste < CP T3'<T2'

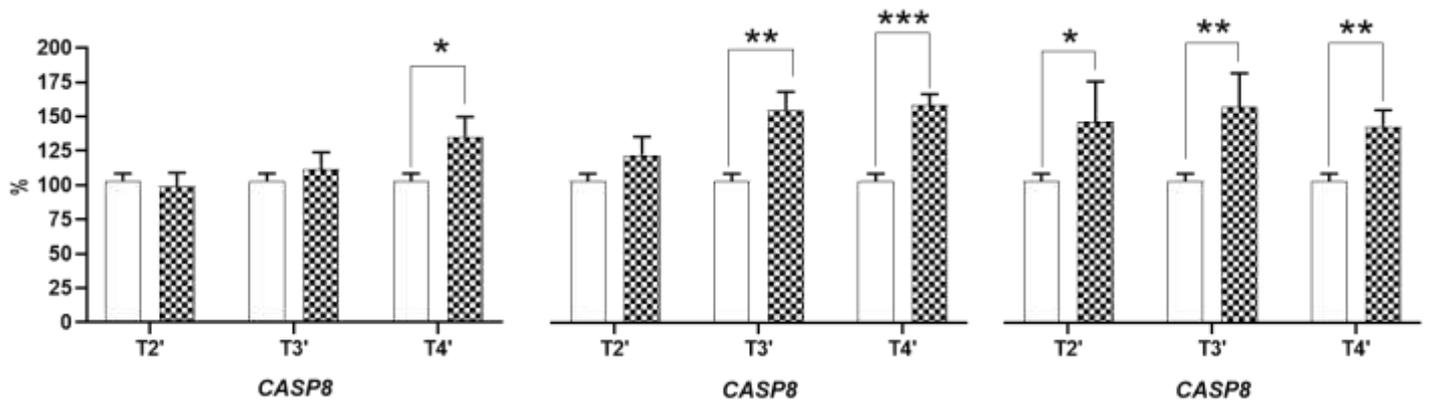
*** p<0.0001	*** p<0.0001
** p<0.005	** p<0.005
* p<0.05	* p<0.05

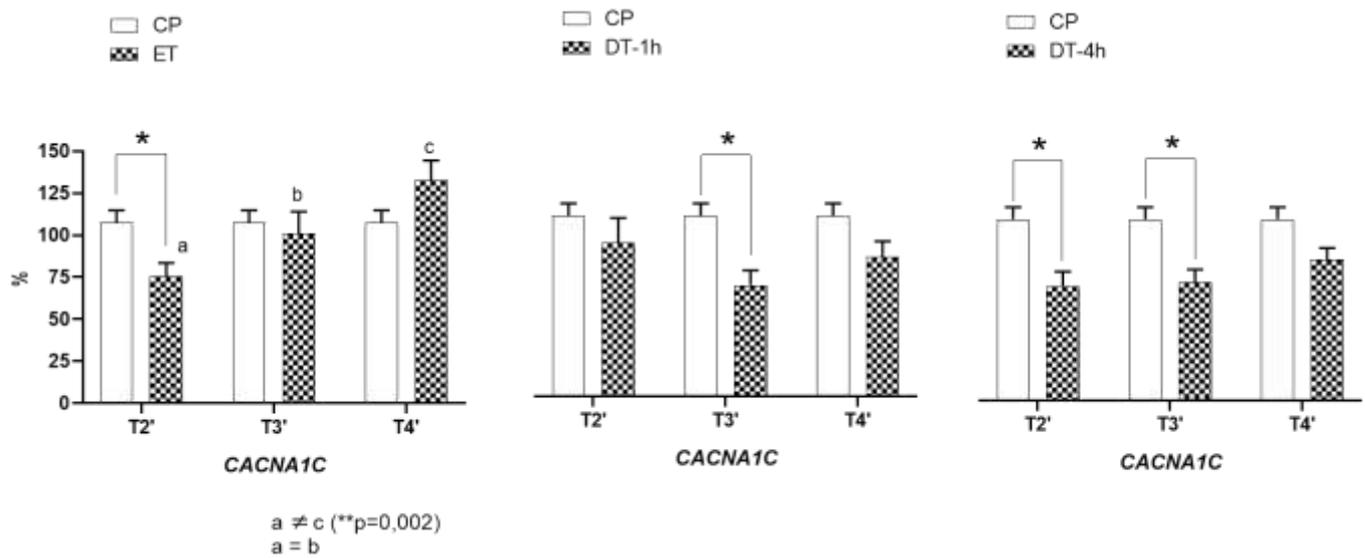
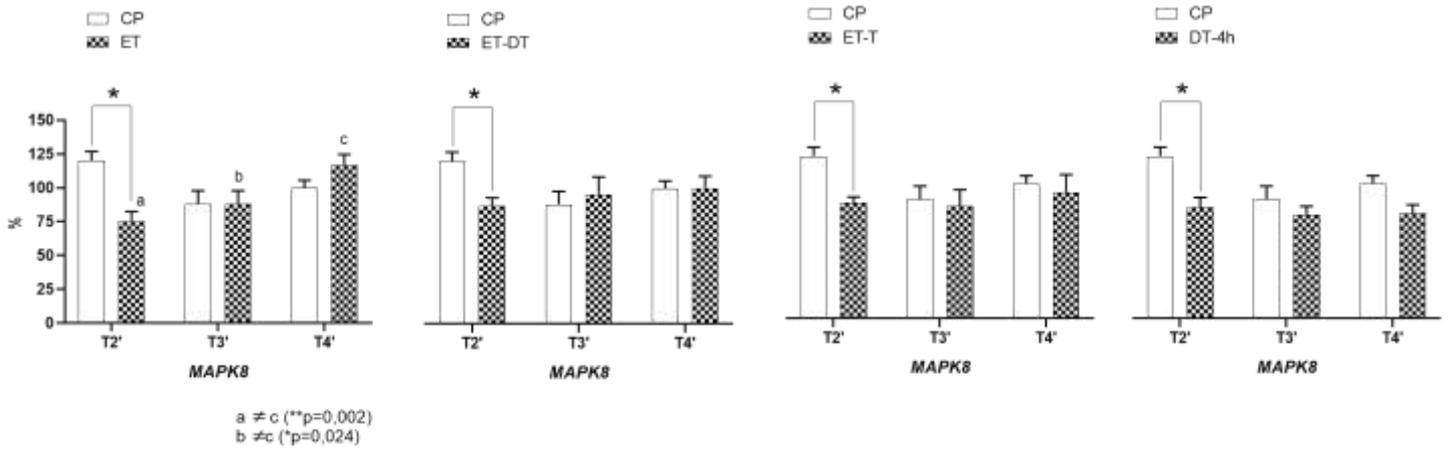
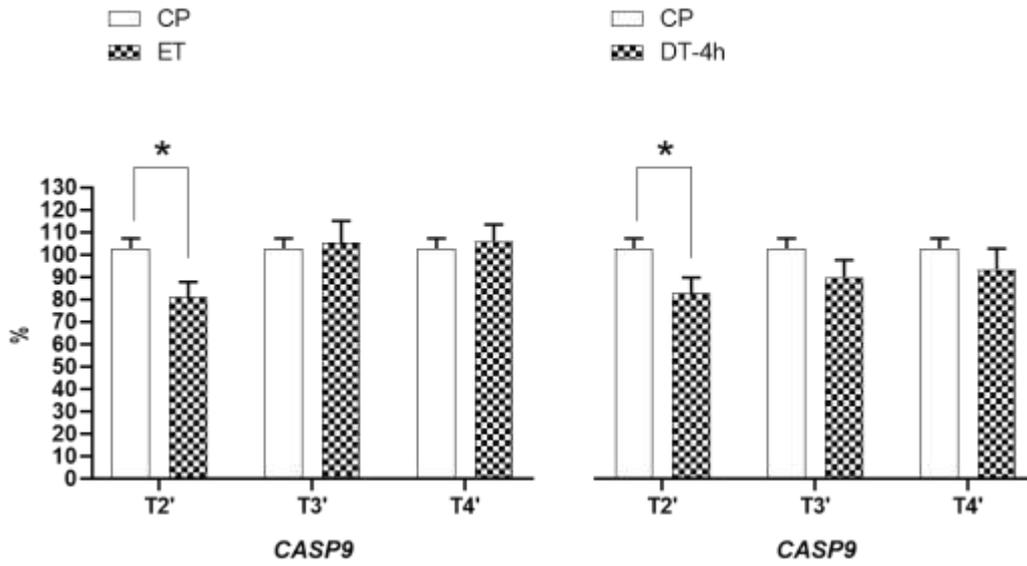
B

□ CP
▣ ET-DT

□ CP
▣ DT-1h

□ CP
▣ DT-4h





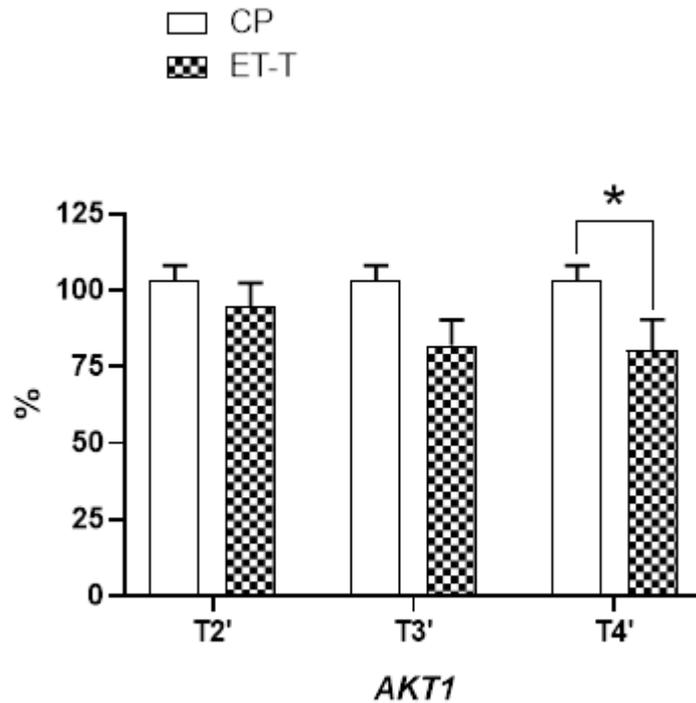


Figura 38: Dados (Média, em **negrito +/- SEM, em *itálico*) da expressão dos genes *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *AKT1*, *AMPA1*, *MAPK8*, *CACNA1C* e *NFκβ1*, em amostras do **TÁLAMO****

Seis grupos experimentais: CP, ET, ET-T, ET-DT, DT-1h e DT-4h (**Painel A**); Gráficos/Barras genes com diferenças significativas (**Painel B**).

As amostras foram coletadas nos tempos T2', T3' e T4'. & Na coluna CP, os valores apresentados são de CP Final, resultado do agrupamento de CPT2', CPT3' e CPT4', exceto para *MAPK8*.

Os dados são expressos em %, normalizados em relação ao gene *house keeper*. (*Detalhes em Material e Métodos*). Testes Grubbs ($\alpha = 0,05$) e *post hoc* Fisher foram usados para detectar *outliers* e comparações múltiplas, respectivamente. As cores (vermelho ou azul cheio ou em linhas horizontais) indicam diferenças detectadas nos testes *post hoc* para comparações entre “grupos testes” vs “CP Final ou CPs correspondentes para *MAPK8*” e entre os Tempos (T2', T3' e T4'), respectivamente.

7. DISCUSSÃO

Modelo Experimental

O modelo de deficiência de tiamina utilizado no presente estudo com ratos *Wistar* ou *Sprague Dawley* está bem estabelecido na literatura e vem sendo utilizado pelo nosso grupo (BUENO, KENIA DE OLIVEIRA, 2015; DE FÁTIMA OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2014; NUNES; GÓMEZ-MENDOZA; *et al.*, 2018), e por outros autores (Bâ, 2017; BOBAL; SAVAGE, 2015; LIU; KE; LUO, 2017; SAVAGE, LISA M. *et al.*, 1997; SAVAGE, LISA M, 2012). Sabe-se que, animais submetidos a um episódio de deficiência de tiamina apresentam uma sequência de sinais clínicos que se iniciam com anorexia e perda de peso e culminam com sinais neurológicos (SAVAGE, LISA M.; HALL; RESENDE, 2012). O modelo de deficiência de tiamina tem se mostrado um instrumento bastante útil para se estudar o processo de neurodegeneração, pois, além de permitir diferentes tipos de manipulação, também reproduz várias características comuns com doenças neurodegenerativas, incluindo a Síndrome de Wernicke-Korsakoff, D. de Alzheimer e D. de Parkinson (BALLARD *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2015; LIU; KE; LUO, 2017; PIRES *et al.*, 2007; SECHI; SERRA, 2007; SOUZA *et al.*, 2011; SVEINBJORNSDOTTIR, 2016; UPADHYAYA; SETH; AHMAD, 2010; YAHIA *et al.*, 2015).

A variação de peso e o consumo de ração pelos animais utilizados nos experimentos do presente trabalho reproduziram os perfis observados em estudos prévios realizados pelo nosso grupo (NUNES; GÓMEZ-MENDOZA; *et al.*, 2018) e por outros autores. Os sinais neurológicos de DT foram observados apenas nos animais do grupo DT e não nos animais do grupo CP. Os animais CP mantiveram seu peso corporal

sem variação significativa entre os dias 12-14. Este fato, somado à observação de não haver diferença significativa entre o consumo de ração entre os grupos CP e DT, indica que os sinais neurológicos observados nos animais do grupo DT são devido à falta de tiamina e não ao menor consumo de nutrientes (dieta). O peso dos animais do grupo DT se mostrou estável após o 41º dia de tratamento (22º dia do período de recuperação). Os animais deficientes em tiamina, após o 45º dia de tratamento, não apresentam diferença de peso em relação ao grupo CP, e pela observação clínica, não mais se observava diferenças entre os animais CP e DT.

A evolução dos sinais clínicos observada aqui está de acordo com o descrito por ZHANG, S. X. *et al.*, (1995), que mostram que os sinais da deficiência de tiamina iniciam tipicamente no 10º dia, evoluindo com perda de peso por volta do 12-13 dias; perda do reflexo de endireitamento com ataxia grave entre os dias 13 a 16, seguido de convulsões. Os dados obtidos mostraram que os animais do grupo DT apresentaram os sinais neurológicos, como convulsão e perda do reflexo de endireitamento entre os dias 13 e 14 (mediana dos dados), conforme pode ser observadas nas Curvas de Sobrevivência, apresentadas na seção de Resultados. Os estágios clínicos referentes aos tempos 10º e 14º dias foram selecionados para coletas de amostras e estudos neuroquímicos. Além desses tempos, os ensaios bioquímicos foram também realizados utilizando amostras coletadas após dois períodos diferentes de recuperação (43º e 52º dias após interrupção do episódio de deficiência, sendo o último incluindo o período de teste comportamental) após interrupção do episódio de deficiência.

O modelo de animais tratados com etanol, consumo crônico, pela administração de soluções aquosas contendo etanol, como única fonte de líquido, também se encontra bem estabelecido e tem sido usado pelo grupo de pesquisa coordenado pela professora Savage (NUNES; VEDDER; *et al.*, 2018b; SAVAGE, LISA M.; HALL; RESENDE,

2012), como também pela equipe do LANEK-UFMG (DE FÁTIMA OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2001, 2005). No experimento executado no presente estudo, no qual o consumo crônico de etanol foi utilizado como uma das variáveis dependentes, os animais foram tratados de acordo com protocolo previamente estabelecido por esses autores.

Estudos Comportamentais: aspectos cognitivos espaciais

Os dados provenientes dos estudos comportamentais, realizados no presente trabalho, também corroboram o fato dos animais deficientes atenderem características do modelo relacionadas à déficits cognitivos induzidos pela deficiência de tiamina. Os déficits observados nos processos de aprendizagem e memória espacial de referência, reproduzem achados prévios do nosso grupo (BUENO, K.O. *et al.*, 2015; BUENO, KENIA DE OLIVEIRA, 2015) e outros autores (BOBAL; SAVAGE, 2015; SAVAGE, L. M., 2003; SAVAGE, LISA M. *et al.*, 1997; SAVAGE, LISA M.; BUZZETTI; RAMIREZ, 2004), nos quais mostramos que os animais deficientes apresentam um desempenho pior, em relação aos animais controles, demorando mais tempo para aprender a tarefa, mas conseguindo atingir um desempenho similar aos controles ao longo da repetição das sessões. Esse fato foi observado tanto para os ratos *Wistar* como *Sprague-Dawley*, conforme pode ser observado nas **figuras 22 e 26** na seção de Resultados. No entanto, os dados do desempenho dos animais *Sprague-Dawley*, principalmente nos primeiros quatro dias de testes (curva de aprendizagem e memória operacional) mostram uma maior variabilidade tanto para os animais controles como deficientes, comparada aos *Wistar*. Uma possível explicação para o fato de não ter sido detectado efeito da DT utilizando-se *Sprague Dawley* como modelo experimental, seria

o fato do desempenho dos controles estar relativamente pior quando comparado com os controles *Wistar* e, portanto, um deslocamento da linha de base controle interferir na detecção de um possível efeito induzido pela DT. Embora não tenhamos realizado um estudo sistemático comparativo (não fazia parte dos objetivos do presente trabalho), decidimos plotar em um mesmo gráfico (apresentado no ANEXO, item 13.5) os desempenhos cognitivos dos ratos controles *Wistar* e *Sprague Dawley*. Como pode ser observada, a comparação entre as duas curvas, reforça a hipótese de que a ausência da detecção de efeito da DT sobre o desempenho cognitivo dos animais *Sprague Dawley*, pode ser devido a um pior desempenho dos animais do grupo controle. Vários fatores poderiam explicar esse pior desempenho dos *Sprague Dawley* na condição controle, entre eles uma diferença fisiológica entre as linhagens. Sabe-se que, mesmo se tratando da mesma espécie, os organismos de linhagens diferentes podem apresentar respostas fisiológicas e comportamentais diferentes frente ao mesmo fator estressor (PÓVOA, 2007), no caso, o estímulo aversivo usado no LAM, a água. Uma observação que vale mencionar é que durante todos os procedimentos experimentais, incluindo os testes comportamentais, observamos que a linhagem *Sprague Dawley*, embora originária da linhagem *Wistar*, parece mais ansiosa que os animais da linhagem *Wistar*, o que pode ter interferido no desempenho cognitivo. A diferença cognitiva entre os *Sprague Dawley* e *Wistar* parece diminuir ao longo das sessões de treino, pois, a partir do 5º dia até o 9º dia a diferença diminui. VILAR (2015) mostrou evidências que a medida que os animais são expostos ao labirinto, ao longo das sessões/dias, eles diminuem a ansiedade e o prejuízo cognitivo causado pela idade é gradativamente revertido pela repetição da tarefa.

Como o treino e teste de memória de referência foram realizados após os animais terem passado pelo teste de memória operacional, a experiência prévia na tarefa

refletiu no desempenho dos animais na tarefa seguinte, que foi o treino/teste da função cognitiva de referência. Observa-se que os animais (*Wistar e Sprague Dawley*) do grupo CP, no 4º e 5º dia, respectivamente, da tarefa, se lembraram da regra aprendida durante os primeiros dias no LAM (3-4 primeiros dias de tarefa operacional), enquanto os animais do grupo DT, não tiveram o mesmo desempenho e iniciaram o treino da tarefa de memória de referência com uma performance significativamente pior comparada aos controles.

Em relação à memória operacional, até onde pesquisamos os dados obtidos aqui são inéditos e, mostram pela primeira vez que a deficiência de tiamina afeta de forma significativa o desempenho dos animais *Wistar e Sprague Dawley* na execução da tarefa operacional. Observando o perfil das curvas, seria pertinente levantar a hipótese de que os animais deficientes foram capazes de aprender a tarefa em uma determinada sessão (apesar de que, com menos eficiência comparado aos controles), mas não tiveram a mesma flexibilidade dos controles para buscar o reforço (plataforma=alvo) em outro local no dia seguinte. A diferença na capacidade de aquisição da tarefa ao longo dos três dias do teste é bastante evidente. Os animais do grupo CP, ao não encontrarem a plataforma no local que esta se encontrava no dia anterior, passam a procurá-la em outro local, enquanto os animais deficientes não apresentam essa flexibilidade, demonstrando uma dificuldade em encontrar o reforço. Esses achados estão de acordo com VILLAS-BOAS, (2014) que mostrou que animais deficientes em tiamina perseveram na busca da plataforma em locais onde a mesma se encontrava em sessões anteriores do treino em tarefas de navegação espacial.

A hipótese de um possível déficit na flexibilidade comportamental induzido pela DT é corroborada quando se analisa o comportamento dos animais CP e DT no 1º e 2º minutos do teste comprobatório. Embora não detectamos um efeito significativo da DT

(talvez pelo pequeno tamanho da amostra) o perfil do comportamento dos animais controles é diferente dos animais deficientes. Enquanto os controles alteram o local da busca, os deficientes parecem manter a mesma estratégia de busca no 1º e 2º mins. Essa diferença de comportamento pode ser verificada quando se compara os grupos CP e DT, em relação à permanência dos animais nos quadrantes SW (quadrante adjacente) vs NW (quadrante alvo), conforme dados apresentados na **Figura 24, painéis A e B**. Os dados de avaliação de memória de referência espacial e extinção do comportamento, expressos em número de vezes que os animais de cada grupo cruzaram o local onde se encontrava a plataforma durante o treino, também indicam um pior desempenho cognitivo, memória e extinção, dos animais deficientes comparados com os controles (**Figura 25**). Existem evidências de que pacientes com Síndrome de Wernicke-Korsakoff apresentam uma perda da flexibilidade comportamental (JOYCE; ROBBINS, 1991) e, portanto, o modelo de roedores deficientes em tiamina representam um instrumento útil para o estudo dos mecanismos moleculares subjacentes à essas disfunções.

Estudos Histológicos e Neuroquímicos

Concentrações de tiamina e isoformas fosforiladas:

Durante o episódio de DT (10º dia) observamos redução das formas fosforiladas (TMP e TDP) em torno de 75% tanto do CPF como hipocampo. A redução das formas fosforiladas pode ser explicada pela ação do inibidor piritiamina, que impede a conversão ou fosforilação da tiamina em TDP (MCCANDLESS, 1985). A utilização do inibidor piritiamina na inibição da enzima tiamina pirofosfocinase provavelmente aumentaria os níveis da forma não fosforilada (tiamina) em todos os tecidos, nos animais do grupo DT, causado pelo impedimento do uso desse substrato. No entanto verificamos uma diminuição dos níveis de tiamina nos animais do grupo DT (10.901,47

+/- 4597,86 nmols/g tecido) em comparação ao CP (42.990,56 +/- 1326,21 nmols/g tecido) no hipocampo. Em contrapartida no CPF os valores nos animais do grupo DT aumentam, mas para valores muito acima do comparável ao grupo CP, não sendo possível detecção (detector saturado). Esses dados obtidos nos fazem levantar uma hipótese, principalmente quando comparamos os dados obtidos no hipocampo e no CPF. A diferença encontrada entre os tecidos, CPF e hipocampo em relação aos níveis de tiamina remetem a importância funcional do córtex pré-frontal e sua falta de capacidade regenerativa diminuída em comparação ao hipocampo. Neste caso a importância da tiamina como cofator enzimático no metabolismo energético faz com que este tecido (CPF) possua uma quantidade maior de reserva. Neste caso a ação inibitória pelo químico piritiamina favoreceria o aumento não mensurável desta vitamina em detrimento dos demais tecidos. Outro ponto desta análise se refere a não modificação destes parâmetros (TMP e TDP) com o agravamento dos efeitos da deficiência de tiamina nos animais do grupo DT, não observando uma redução ainda maior dos níveis das formas fosforiladas TMP e TDP entre o 10º (T1) e 14º (T2) dias.

Quando comparamos os valores médios em porcentagem da tiamina e seus derivados TMP, TDP e TTP do grupo CP com valores médios também em porcentagem encontrados por NUNES *et al.*, 2017 e outros autores (BETTENDORFF, L. *et al.*, 1991; BETTENDORFF, L, 1991; BETTENDORFF, LUCIEN; WINS; LESOURD, 1994) estão muito similares. Vale ressaltar ainda que dados da literatura apontam uma nova isoforma fosforilada, a Adenosina tiamina trifosfato – ATP (BETTENDORFF, LUCIEN *et al.*, 2007; BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, 2009), que poderia, nas condições do ensaio responder as variações de concentrações das formas fosforiladas (TMP, TDP e TTP).

Em relação aos níveis da forma fosforilada TTP, observamos alterações nas concentrações principalmente no CPF e hipocampo, visto que no tálamo tanto no grupo DT e como no grupo CP não foram detectáveis no tempo T1. O aumento da concentração de TTP no CPF e ausência de detecção no hipocampo, mesmo que não significativos, nos dias iniciais do episódio de DT (T1) pode ser explicado pela ação da atividade das enzimas responsáveis pelo seu metabolismo, enzimas de degradação ou síntese de TTP. A atividade da TTPase, enzima que desfosforila a tiamina trifosfato (EC 3.6.1.28), solúvel, está localizada no citosol e possui atividade ótima em pH alcalino (~9,0) e é modulada por cofatores bivalentes (BETTENDORFF, LUCIEN; WINS, 2009; BUTTERWORTH, 2003; DELVAUX *et al.*, 2013; HASHITANI; COOPER, 1972; MAKARCHIKOV; CHERNIKEVICH, 1992). Vale ressaltar que a TTPase, como outras fosfohidrolases possuem ativação por cátions bivalentes, em especial os íons magnésio e inibição por íons cálcio (DELVAUX *et al.*, 2013; MAKARCHIKOV; CHERNIKEVICH, 1992). Dados obtidos e apresentados na seção Resultados mostraram, no CPF, um aumento tanto na expressão de genes da proteína transportadoras de cálcio (canais dependentes de voltagem - Cav1.2) como receptores AMPA que poderiam facilitar o fluxo do íon cálcio para o citosol da célula, aumentando os níveis citosólico desse íon. Como consequências desses eventos, teríamos resultado a provável inibição da enzima TTPase e conseqüentemente maior concentração dos níveis de TTP no CPF no tempo T1. Além do que não foi observado aumento dos níveis de cálcio, no hipocampo nos tempos T1 e T2, possível inibidor da enzima TTPase que possui papel na degradação da forma fosforilada TTP (GANGOLF *et al.*, 2010; GIGLIOBIANCO *et al.*, 2013). Corroborando com os valores de TTP neste tecido.

No tempo de coleta seguinte, T2 (14 dias do episódio de DT), observamos uma diminuição dos níveis de TTP no CPF e manutenção dos valores baixos tanto no

hipocampo como no tálamo. Dado esse obtido poderia ser explicado pela atividade de enzimas que degradam a forma TTP, gerando a forma TDP. E com isso explicando em parte o fato de apesar do tempo transcorrido os valores das formas TDP e TMP permanecem constantes sem alteração. A ação das enzimas TTPase e/ou TDP fosforiltransferase, que possui atividade neuronal nesse processo de clivagem (BUTTERWORTH, 2003), estaria corroborando com nosso resultado, principalmente no hipocampo. Os dados divergentes em relação ao CPF que mesmo com níveis de cálcio citosólico aumentados ainda sim apresentaram diminuição dos níveis de TTP no tempo T2 podem ser corroborados pela alteração metabólica induzida pela própria DT.

O papel da tiamina na sua forma fosforilada (TDP) como coenzima nas vias de degradação e produção de energia celular. Já citado aqui e de conhecimento abrangente no meio científico, possui papel nas ações catalisadas pelos complexos enzimáticos, piruvato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase, auxiliando no processo de descaboxilação dos substratos catalizados (KOIKE; KOIKE, 1976; YEAMAN, 1989). A baixa atividade das enzimas piruvato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase durante o tratamento com DT, impacta no aumento dos níveis de lactato e alanina e conseqüentemente redução dos valores de pH (NAVARRO *et al.*, 2005; SECHI; SERRA, 2007). Corroborando como os efeitos sobre a enzima TTPase solúvel.

Além disso, a não detectação da forma TTP durante o episódio de DT, no hipocampo e ainda sua redução, mesmo que não significativa no CPF e no tálamo seria corroborada ainda pelo próprio déficit energético. Podemos destacar que a síntese de tiamina trifosfato estaria prejudicada durante o episódio de DT, tanto pela falta do precursor (substrato) TDP que possui sua síntese inibida pela utilização da piritiamina como também pela falta de precursores (energéticos) como o ATP. Dados da literatura mostram que a síntese dessa forma fosforilada (TTP) pode acontecer por meio das

enzimas como adenilato cinase que convertem a reação $TDP + ATP$ em $TTP +$ fosfato inorgânico ou até mesmo enzimas já conhecidas como a F_0F_1 -ATP sintetase, que através do fluxo de elétrons ocasionado pelo bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial sintetizam a forma TTP. Ambas condições que incorporam o fosfato inorgânico na molécula de tiamina difosfato (DELVAUX *et al.*, 2013; GANGOLF *et al.*, 2010; GIGLIOBIANCO *et al.*, 2013). Durante o episódio de DT o funcionamento das vias de produção de energia (metabolismo energético) estaria comprometidas, com a síntese de ATP e a formação do gradiente na membrana mitocondrial corroborando com uma baixa atividade das enzimas responsáveis pela síntese de novas moléculas de TTP (JANKOWSKA-KULAWY *et al.*, 2010; PANNUNZIO *et al.*, 2000).

Outro ponto a analisar sobre esta forma fosforilada (TTP) se refere à função de modulação de canais aniônicos (canais cloreto) aumentando a expressão destes (BETTENDORFF, LUCIEN, 1994). Uma diminuição dos canais GABAérgicos pode resultar em uma maior excitabilidade da célula, sendo assim uma provável diminuição do neurotransmissor (GABA) ou da forma fosforilada (TTP) poderiam agravar os efeitos da DT (BETTENDORFF, L *et al.*, 1993; BETTENDORFF, LUCIEN, 1994). A diminuição dos valores de TTP pode estar relacionado à um equilíbrio de efeitos entre os canais cloreto e seu agonista (GABA). Como citado esta forma fosforilada exerce papel na síntese de canais aniônicos (Cl^-), neste caso possivelmente diminuído durante o tratamento enquanto o agonista GABA, possivelmente aumentados pela expressão de enzimas que catalisam sua formação (BETTENDORFF, L. *et al.*, 1993; NUNES; GÓMEZ-MENDOZA; *et al.*, 2018). Segundo HÉROUX; BUTTERWORTH, 1988; e LANGLAIS *et al.*, 1988 após período de recuperação valores de GABA são restabelecidos, e possivelmente os níveis da tiamina e suas formas fosforiladas voltam ao normal, como observado em nossos experimentos.

Níveis de cálcio livre

Observamos no CPF, nos animais do grupo DT em comparação com os animais do grupo CP, um aumento gradativo da concentração de íons cálcio ao longo do tempo, sendo não significativo no tempo T1 (10^o dia do episódio de DT), mas significativo no final do episódio (14^od do episódio de DT, T2). O interessante deste dado é que, após um período de recuperação/LAM (dosagens no tempo T6), os valores observados retornam à níveis comparáveis ao controle.

Tanto no hipocampo como no tálamo não observamos alterações significativas nos níveis de cálcio em nenhum dos estágios (T1, T2 e T6).

As alterações nos níveis de cálcio livre, determinadas no presente estudo, não podem ser consideradas um aumento no “*pool*” citosólico, devido à limitações da técnica empregada, como discutido abaixo.

Como mencionado em Material e Métodos, utilizamos o método colorimétrico para avaliar os níveis de cálcio extra e intracelular (citosol). Apesar das limitações deste método, impossibilitando a distinção entre os níveis de cálcio citosólico e extracelular, foi possível observar alterações dos níveis de cálcio dos tecidos analisados nos diferentes tempos nos quais as amostras foram coletadas. As amostras foram as mesmas utilizadas para dosagem de tiamina e seus derivados e, no processamento destas amostras foi utilizado o agente desnaturante TCA 10% (NUNES *et al.*, 2017), o qual rompe apenas a membrana citoplasmática. Assim, como as membranas das organelas intracelulares não foram rompidas, os níveis de cálcio de organelas, como a mitocôndria e/ou retículo, não foram quantificados. Desta forma, os dados apresentados dos níveis de cálcio se referem à soma das concentrações dos meios extracelular e citosólico. Sabe-se que, alterações citosólicas nos níveis do íon cálcio, são tamponadas por organelas como a mitocôndria, que no caso de aumento, capturaram o excedente

(KONDRATSKYI *et al.*, 2015). O retículo endoplasmático, por vias independentes da mitocôndria, também pode atuar no estabelecimento homeostático celular (BURTÉ *et al.*, 2014; KONDRATSKYI *et al.*, 2015; LA ROVERE *et al.*, 2016; MEHAL; INAYAT; FLAVELL, 2006; MORISHIMA *et al.*, 2002b). Portanto, no caso da ocorrência de alterações induzidas por algum tipo de insulto, essas poderiam ser tamponadas, tanto pela mitocôndria como pelo retículo e, os eventuais efeitos não seriam detectados se a avaliação for feita apenas no *pool* extracelular e no citosol. Estudos futuros, utilizando agentes como o Triton X-100 (detergente), o qual atua no rompimento das membranas presentes em organelas, como a mitocôndria (DE PINTO, V; PREZIOSO; PALMIERI, 1987), poderão ser realizados para avaliar os efeitos observados no presente estudo, de uma forma mais detalhada em relação aos diferentes “pools” de cálcio presentes no tecido.

Sabe-se que, no SNC podemos distinguir dois tipos de canais de cálcio voltagem dependente, CaV-1.2 e CaV-1.3, localizados na membrana pós-sináptica, tanto no corpo celular do neurônio como nos dendritos e terminais do neurônio (PINTO, MAURO CUNHA XAVIER *et al.*, 2015; ZAMPONI *et al.*, 2015). Estes canais, como um dos componentes moduladores do fluxo de cálcio, podem desempenhar um papel crucial na fisiologia celular ou em processos de morte celular, em regiões do SNC (BAKER *et al.*, 1999; KE; GIBSON, 2004; MULHOLLAND, 2006) e, possivelmente, poderiam explicar as diferenças de susceptibilidade dos tecidos aos efeitos de insultos que alteram a homeostase do cálcio.

Dados da literatura, obtidos em cultura de neurônios granulares do cerebelo, mostram alterações nos níveis de canais voltagem dependente do tipo Cav1.2, além do aumento da concentração de cálcio no citosol, em animais que foram submetidos a

deficiência de tiamina (LEE, SHUCHEN *et al.*, 2010; MOREIRA-LOBO *et al.*, 2016). MOREIRA-LOBO *et al.*, 2016.

LEE *et al.*, (2010) mostraram, por qPCR, que a deficiência de tiamina induz baixa expressão de ADAR2 (*adenosine deaminases acting on RNA*), enzimas responsáveis por modificação na subunidade GluR2 (uma das subunidade do receptores AMPA). Esse efeito da deficiência de tiamina descrito por Lee et al., pode ser o resultado de um aumento da permeabilidade, ao íon cálcio, dos receptores AMPA (ISAAC; ASHBY; MCBAIN, 2007; SPAETHLING *et al.*, 2008).

Uma hipótese que poderia ser levantada é que o fluxo do íon cálcio, resultando em um aumento dos níveis citosólicos observados no presente estudo, poderia ativar proteínas cinases dependente de cálcio, como por exemplo CaMkII (proteína cinase II dependente de cálcio / calmodulina) que potencializa processos de apoptose (HARDINGHAM; BADING, 2010; PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013). Esta cinase pode atuar nos receptores AMPA, pela fosforilação dos resíduos Ser831 ou Ser845 da subunidade GluR1, promovendo abertura dos canais AMPA (LEE, HEY-KYOUNG *et al.*, 2000). Em contrapartida, a desfosforilação do resíduo Ser845, pela atividade das proteínas fosfatases 1 ou 2A, promove endocitose dos receptores do tipo AMPA (BARRIA; DERKACH; SODERLING, 1997; FUKUNAGAS; STOPPINIG; MIYAMOTOS, 1993; SONG; HUGANIR, 2002; XIA, JUN *et al.*, 2000).

Atividades das caspases

Outras variáveis dependentes avaliadas no presente estudo, foram as atividades das caspase 3/7, 8 e 9 que podem, dependendo dos níveis de atividades, fornecerem informações sobre a viabilidade celular dos tecidos. Como descrito na seção Resultados, os dados obtidos no CPF, mostraram redução das atividades da caspase-8 e caspase-3/7

no tempo T6 (após período de recuperação/LAM). Duas explicações podem ser levantadas em relação a este resultado. A primeira, considerando a ligação destas duas enzimas no processo de morte programada, apoptose, sendo a caspase-8 iniciadora e a caspase-3 executora desse processo. Após ativação, via receptores de membrana, a caspase-8 catalisa a clivagem da pró-caspase-3, liberando a forma ativa da caspase-3 (HU *et al.*, 2000; KRUIDERING; EVAN, 2000; STRASSER; JOST; NAGATA, 2009). Neste caso um efeito que provoca a diminuição de uma poderia acarretar na diminuição da outra. A segunda explicação seria baseada no papel da caspase-3, não restrito à morte celular. Esta enzima possui outros substratos como, por exemplo, a subunidade Glu1R do receptor AMPA, que, ao ser clivado perde sua atividade e, como consequência, é interiorizado (LI, ZHENG *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2002). Outro substrato da caspase-3, a proteína cinase Akt, que sendo clivada induz o processo de LTD (GLAZNER *et al.*, 2000; JIAO; LI, 2011; MALENKA; BEAR, 2004). Neste caso, a segunda explicação seria fundamentada na hipótese de que uma vez que as atividades das caspases 8 e 3/7 diminuem após o período de recuperação e experiência cognitivas no LAM (T6), essa diminuição de atividade poderia estar relacionada com a obtenção de um balanço entre LTP: LTD, uma vez que o aumento do LTP em detrimento do LTD pode favorecer o processo de aprendizagem e consolidação da memória (WHALLEY, 2007). Mais uma vez, lembrando que existem evidências da participação da CASP3 tanto nos processos de plasticidade, como de morte celular (SNIGDHA *et al.*, 2012).

No **hipocampo**, ao contrário do CPF, a redução das atividades das caspases, principalmente da caspase-8, ocorreu no tempo T2 (14^o dia do episódio de DT). Este dado, somado aos achados sobre viabilidade celular (marcação com o fluoróforo IP), marcador de processo de morte celular por necrose, leva-nos a uma questão sobre um processo denominado necroptose. Termo utilizado para uma via de morte celular

desencadeada por receptores do tipo TNF-R1, dentre outros (DEGTEREV *et al.*, 2005). A inicialização do processo de morte celular por receptores do tipo TNF-R1, gera a formação de um complexo contendo as seguintes proteínas: TRADD (do inglês: *Downstream adapter proteins*), cIAPs (do inglês: *Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins*), TRAF2 (do inglês: *TNF receptor-associated factor 2*) e RIPK1 (do inglês: *receptor-interacting kinase 1*). Pela ubiquitinação do receptor RIPK1, a caspase-8 é agregada ao complexo, que neste momento se torna solúvel no citosol. Quando a atividade de caspase-8 é alta, esta promove apoptose e, como observado no presente estudo, quando a atividade se encontra baixa, como no tempo T2, ocorre uma série de reações que culminam com o recrutamento da proteína MLKL (do inglês: *Mixed lineage kinase domain-like*) formando o necrossoma. A proteína MLKL uma vez fosforilada, transloca do citosol para a membrana, disparando um processo de necroptose (ASHKENAZI; SALVESEN, 2014; FUCHSLOCHER CHICO; SAGGAU; ADAM, 2017; GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2018). Esta via também explica a ausência de modificação da atividade da caspase-3, visto que o processo de morte celular pode ter sido desviado da apoptose para necroptose, ou seja, uma necrose secundária.

A redução da atividade da caspase-9 observada no hipocampo pode ser relacionada com a baixa atividade da caspase-8. Um substrato da caspase-8 é a proteína de 22 kDa (BID) que ao ser clivada expõem resíduos hidrofóbicos favorecendo, por meio de proteínas da família Bcl-2 a liberação de citocromo C da mitocôndria e consequente ativação da caspase-9 (BILLEN; ANDREWS, 2009; ESPOSTI, 2002; KANTARI; WALCZAK, 2011; LI, HONGLIN *et al.*, 1998; WANG, KUN, 1996; YUAN; NAJAFOV; PY, 2016).

No **tálamo**, não foram detectadas alterações significativas das atividades catalíticas das caspases analisadas (8, 9 e 3/7). A ausência de alterações nessa região

poderia ser explicada pelo fato dos processos de morte celular terem ocorrido em uma velocidade maior, quando comparado com o CPF e hipocampo e, no momento da coleta das amostras, após morte celular, as atividades das caspases, no tecido remanescente, já teriam se restabelecido, sem possibilidade de detecção de alterações em relação ao animais controles. Como a atividade enzimática é expressa por mg de tecido, as perdas de tecido, visíveis no tálamo, são corrigidas no momento em que os ensaios são realizados em amostras equivalentes (=1mg) do tecido remanescente. No caso do CPF e hipocampo, as análises das atividades foram realizadas em etapas que correspondem às fases intermediárias dos processos, resultando na detecção das alterações nas atividades das enzimas que participam dos processos que levam à morte celular. Essa hipótese é corroborada pelos achados de MATSUSHIMA; MACMANUS; HAKIM, (1997), que observaram aumento da expressão de c-fos, um marcador de morte programada (SMEYNE *et al.*, 1993), bem como condensação do DNA e marcações pela técnica de TUNEL, dois dias antes do aparecimento dos sinais neurológicos. Como no presente estudo, as amostras foram coletas depois do aparecimento dos sinais neurológicos e após período de recuperação, os processos de morte celular, provavelmente, já teriam sido finalizados.

As alterações das atividades de caspases no tempo T6 (após período de recuperação/LAM) no CPF e no hipocampo, mas não no tálamo, poderia ser explicado como um efeito da experiência cognitiva no LAM, que ocorreria apenas no CPF e hipocampo, que são regiões consideradas relevantes na execução de tarefas cognitivas espaciais (CARRUTHERS, 2013; DUDCHENKO, 2004b; IZQUIERDO, 1989; MRSIC-FLOGEL; TREVES, 2015; O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY; J. O'KEEFE, 1971; O'KEEFE, JOHN, 1976; SWEATT, 2003; VIGIL *et al.*, 2010).

A redução da atividade da caspase-3/7, nos animais controles (grupo CP-T2 vs CP-T6), no tempo T6 em comparação ao T2 ($p= 0,051$), poderia ser considerado um efeito do processo de envelhecimento, visto que a diferença de dias entre o tempo T2 e T6 é igual a 38 dias.

Ensaio de Viabilidade celular – Calceína e Iodeto de Propídio

Como observado na seção Resultados, os dados obtidos no presente estudo sobre os efeitos da DT sobre a viabilidade celular no CPF, não mostraram diferenças significativas entre o grupo DT e CP. Avaliando os dados obtidos com os testes de viabilidade celular pela marcação do fluoróforo IP, observamos apenas uma tendência de efeito da DT [DT $F_{(1,20)}=3,46$, $P=0,077$]. Analisando os dados dos indivíduos que foram submetidos ao episódio de DT, observamos uma alta variabilidade individual e, assim, dedicamos aplicar o teste Grubbs para detecção de *outlier*. Após o teste, um dos dados foi removido da análise ANOVA e a reanálise mostrou efeito da DT ($F_{(1,19)}=4,56$, $P=0,046$), com tendência, detectada no teste *post hoc*, efeito no tempo T2 ($p=0,084$). O aumento da marcação com fluoróforo IP no tempo T2 no CPF, mas ausência de efeito no hipocampo e no tálamo, somado às evidências de que o tálamo é uma das regiões mais susceptíveis à lesão (morte celular), nos leva a inferir que a cinética do processo de morte celular, desencadeado no CPF, poderia ser diferente do observado no hipocampo e tálamo. Ou seja, no tempo T2 (10^o dia do episódio) o tecido talâmico já estaria em estágios mais avançados do processo de morte celular, enquanto o CPF estaria iniciando esse processo, com células apresentando alterações na permeabilidade da membrana plasmática. Esta hipótese está também baseada no fundamento da técnica, na qual o IP é um marcador de morte celular que se liga ao material genético, DNA (HUDSON *et al.*, 1968; SUZUKI *et al.*, 1997). Sendo assim, devido ao tamanho considerável da molécula

de IP, este entra na célula apenas quando há uma alta permeabilidade da membrana, fato observado em estágios que antecedem e, posteriormente, culminam com a morte celular por necrose (CROMPTON *et al.*, 1992; LERMAN, 1961; NEVES; BRINDLE, 2014; SOLÁ, S *et al.*, 2001; SUZUKI *et al.*, 1997).

Outro fato a ser considerado é à grande variabilidade observada nos animais tratados com dieta sem tiamina e, vale ressaltar, que o tamanho da amostra ('n' amostral) foi pequeno, o que poderia comprometer a evidência de possíveis efeitos significativos da DT.

No hipocampo, os dados obtidos não mostraram efeito significativo de nenhum dos fatores avaliados (DT *vs* tempo). No entanto, a título de informação a ser posteriormente checada em estudos futuros, utilizando amostras experimentais maiores (tamanho da amostra maior que a utilizada no presente estudo), vale considerar a porcentagem de marcação com o fluoróforo IP. Amostras do CPF de animais deficientes em tiamina apresentaram valores próximos de 150%, no tempo T2, enquanto no hipocampo, nas sub-regiões CA3 e GD, e no tálamo, foram observados valores equivalentes à 300% e 275%, respectivamente, que representam aproximadamente o dobro daquele obtido no CPF. Se confirmado, a partir destes dados pode-se levantar a hipótese de que o hipocampo e o tálamo possuiriam maior susceptibilidade ao insulto da deficiência de tiamina, quando comparado ao CPF. Se valendo dos mesmo argumentos (variabilidade e tamanho da amostra), e realizando a mesma análise feita para o CPF, podemos observar que quando agrupamos os valores obtidos dos animais dos grupos CPs, gerando um único controle final (CP final), encontramos diferença significativa entre os grupos CP e DT, no tempo T2 para as sub-regiões hipocampais, CA3 ($p=0,003$) e GD ($p= 0,008$). As alterações observadas, induzidas pela DT, desaparecem após

período de recuperação (dados obtidos no tempo T6), como pode ser observado na **Figura 32 Painel B**.

Sabe-se que o tálamo é uma das regiões mais acometidas pela DT, e por volta do 14 dias do episódio de DT (tempo T2) é possível observar, a “olho nu”, espaços vazios no tecido talâmico, decorrentes de morte celular (BOBAL; SAVAGE, 2015; SAVAGE, LISA M.; HALL; RESENDE, 2012; VEDDER *et al.*, 2015).

Como citado anteriormente, o iodeto de propídio se liga ao DNA e, na ausência de material genético, devido à morte celular, essa ligação não ocorre e os índices de fluorescência (do IP) se tornam muito baixos (BOBAL; SAVAGE, 2015; BUTTERWORTH, 2003; KRIL, JILLIAN J.; HARPER, 2012; MAIR *et al.*, 2014; SAVAGE, LISA M. *et al.*, 1997). É pertinente supor que, os níveis relativamente baixos de fluorescência no tálamo possam ser devido ao fato da alta incidência de morte celular nesta região, já no tempo T2, refletindo na ausência de diferença significativa quando se compara CP *vs* DT.

Expressão Gênica

Efeitos da DT e/ou Experiência Cognitiva sobre a expressão gênica

Os resultados obtidos (**Figura 34**) nos experimentos realizados para verificar os efeitos da DT e da “experiência cognitiva” no LAM, indicam que as expressões dos genes aqui estudados, envolvidos em processos de viabilidade celular, não foram afetadas de forma significativa no CPF e nem no hipocampo, em amostras coletadas após um período de recuperação sem (T5) ou com (T6) experiência no LAM. Por outro lado, no tálamo, as análises mostraram interações significativas entre os efeitos da DT e “experiência cognitiva” para *CASP3* (P=0,015) e *CASP8* (P=0,005). Testes *post hoc*

indicaram uma diminuição significativa da expressão da *CASP3* ($p=0,02$) e *CASP8* (apenas tendência, $p=0,09$) nesta região, quando se compara animais controles com e sem “experiência cognitiva” (CP vs CP-LAM) e, também uma diferença significativa e tendência de diferença, entre CP versus DT, para a *CASP3* e *CASP8*, respectivamente. Como o tálamo é uma região mais susceptível aos prejuízos causados pela DT, a ocorrência de interação significativa entre esses fatores nesta região, poderia estar indicando um tipo de efeito protetor da “experiência cognitiva”, intensificando possíveis mecanismos neurobiológicos para evitar a progressão de morte neuronal. Tanto os animais que foram submetidos à deficiência tiamina como os animais submetidos ao LAM apresentaram uma diminuição na expressão de *CASP3* e *CASP8* (tendência). Apesar dos efeitos serem similares (ambos fatores induzem diminuição), provavelmente, os mecanismos devem ser diferentes, de tal forma que os dois fatores associados resultam em interação e restabelecimento da expressão da *CASP3* e *CASP8* para níveis similares ao controle (não existem diferenças entre CP vs DT-LAM, para nenhuma das duas CASPs). A DT, por ser um insulto que induz morte neuronal, pode provocar uma resposta neurobiológica protetora, que diminui a expressão da *CASP3* (uma enzima executora de apoptose) e *CASP8*, cujo produto (enzima), faz parte de uma das vias que regulam a atividade da *CASP3*. Como a *CASP3* exerce outras funções, como participação no metabolismo de BDNF (GUO *et al.*, 2016), Akt (GLAZNER *et al.*, 2000; JIAO; LI, 2011; MALENKA; BEAR, 2004) e receptores AMPA (LI, ZHENG *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2002), podemos hipotetizar que o efeito do LAM sobre a expressão desta enzima, poderia demandar uma ou mais vias, que envolvem componentes subjacentes à processos cognitivos.

Chama atenção o fato de não termos detectado efeito da experiência cognitiva (LAM) sobre a expressão da *CASP3* e *CASP8* no hipocampo, pois, o hipocampo é uma

região chave no processamento de informações espaciais (O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY; J. O'KEEFE, 1971; O'KEEFE, JOHN, 1976; OLTON; SAMUELSON, 1976) e, se a experiência no LAM afeta *CASP3* no tálamo, esperávamos que também afetasse a expressão no hipocampo (IZQUIERDO, 1989; RIBAS, 2007). Verificando os dados obtidos, observamos uma tendência ($p=0,08$) de diminuição da expressão de *CASP3* também no hipocampo, induzida pela experiência cognitiva (LAM). Quando se compara os grupos DT vs DT-LAM, detecta-se um efeito significativo da experiência cognitiva (LAM), com restabelecimento dos valores comparáveis ao controle (CP).

Ainda no tálamo, na mesma direção dos efeitos da DT e LAM sobre as expressões das *CASP3* e *CASP8*, a DT induz uma diminuição significativa da expressão do gene *CACNA1C*, provavelmente, seguindo a mesma logística de proteção contra o insulto da deficiência que pode desencadear morte celular. A interação significativa entre DT e LAM ($P=0,020$) sobre a expressão do canal de cálcio, poderia estar atuando no sentido de reverter a homeostase do cálcio. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que não foi observada diferença significativa entre CP e DT-LAM.

Efeitos da DT e/ou Consumo crônico de etanol (um mês) sobre a expressão gênica no TEMPO T1' (10º dia do episódio de DT).

No 10º dia do episódio de DT foi observado um aumento significativo na expressão dos genes *AMPA1* e *CACNA1C* no CPF, os quais codificam proteínas que funcionam como receptores de glutamato e canal de cálcio sensíveis à voltagem (CaV1.2), respectivamente. Como mencionado anteriormente, os receptores AMPA intermediam o componente rápido da tradução de sinal excitatório nas sinapses

químicas em todas as regiões do cérebro dos mamíferos, incluindo o CPF (GREGER; WATSON; CULL-CANDY, 2017; ISAAC; ASHBY; MCBAIN, 2007; ROGAWSKI, 2011; SONG; HUGANIR, 2002).

Os achados do presente estudo, que mostram um aumento na expressão do gene que expressa o canal de cálcio CaV1.2, estão de acordo com MOREIRA-LOBO *et al.*, (2016), que mostraram, em neurônios granulares cerebelares, um aumento dos níveis proteicos do componente CaV1.2, induzido pela deficiência de tiamina.

Por outro lado, de forma aparentemente contraditória, sabe-se que, animais com deleção do gene que codifica para canais de cálcio do tipo CaV1.2 apresentaram maiores dificuldades no aprendizado de tarefa no LAM (TEMME *et al.*, 2016). As diferenças entre os resultados obtidos no presente estudo e aqueles mostrados por TEMME *et al.*, 2016, podem ser explicadas pelo fato de que a técnica de deleção de genes pode afetar a regulação da transcrição de outros genes e o efeito sobre a cognição espacial ser devido a outros fatores. Estudos futuros, desenhados para verificar a correlação entre os níveis de CaV1.2 em diferentes regiões do SNC, e o desempenho cognitivo espacial, precisam ser realizados para esclarecer essa contradição.

Além disso, a DT afeta a expressão da subunidade GluR2, que juntamente com outras subunidades (GluR1, GluR3 e GluR4) fazem parte da estrutura tetrâmica dos receptores AMPA (DINGLELINE *et al.*, 1999). Portanto, uma hipótese que pode ser levantada para explicar o aumento na expressão dos genes *CACNA1C* e *AMPA1* no CPF, é que o insulto da deficiência de tiamina, desencadeia uma resposta neurobiológica, que resulta em efeitos do tipo compensatórios, com a finalidade de manter funções neurológicas corticais que sejam relevantes para o organismo. Se o episódio é prolongado, esses efeitos desaparecem e se manifestam como disfunções, por

exemplo, cognitivas. Outra possível explicação para esses aumentos nas expressões do *CACNA1C* e *AMPA1*, poderia ser que o aumento nos canais de cálcio sensível à voltagem (pós-sinápticos) e receptores AMPA, podem representar uma etapa inicial do processo neurotóxico, induzidos pela DT, que poderia culminar com a morte celular.

Dados que apontam na mesma direção, foram obtidos por autores estudando a expressão gênica e a concentração proteica de outra isoforma (CaV1.3) do canal de cálcio (THIBAUT; LANDFIELD, 1996; VENG; BROWNING, 2002). Esses autores mostraram que a expressão dos canais CaV1.3 no hipocampo, na sub-região CA1, aumenta com a idade.

No entanto, no presente estudo, diferentemente do observado no CPF, não observamos um aumento da expressão do gene *CACNA1C* (que expressa Cav1.2) no hipocampo e nem no tálamo, mas houve um efeito da deficiência de tiamina, quando associada ao consumo crônico de etanol (grupos ET-DT), no sentido de diminuir a expressão do gene *CACNA1C* (apenas no tálamo) e *AMPA1* (apenas no hipocampo). Esses dados corroboram outros achados sobre os efeitos distintos da DT, que dependem da região do SNC. A diminuição da expressão do gene *AMPA1* no hipocampo pode ser um dos fatores relacionados com os déficits cognitivos observados em animais deficientes de tiamina. Estudos sobre as possíveis relações entre esses fatores se configuram como uma interessante perspectiva desta linha de pesquisa.

Uma alteração que ocorreu apenas no hipocampo, e que consideramos também bastante interessante, pois, também poderia estar relacionada com os déficits cognitivos espaciais, é o fato da DT associada ao consumo crônico de etanol (ET-DT) induzir uma diminuição significativa no gene *AKT1* em estágios antes do aparecimento dos sinais neurológicos. A cinase Akt, produto da expressão do gene *AKT1*, é uma serina/treonina

cinase específica que fosforila o Apaf-1 (fator que ativa a apoptose), inibindo o processo apoptótico (ZHOU et al., 2000). Um déficit neste processo pode ser um dos fatores que desencadeiam o processo de apoptose induzido pela DT. Outro achado que também pode causar uma disfunção importante no hipocampo é a diminuição significativa da expressão do gene *BDNF*. Esse achado está de acordo com resultados recentes obtidos pelo nosso grupo (SENA, 2019, dados ainda não publicados), sobre os efeitos da DT nos níveis de *BDNF* no hipocampo, que diminuem de forma significativa. Uma das consequências da diminuição deste fator neurotrófico pode ser a ativação de “*Dependence Receptors*” (GOLDSCHNEIDER; MEHLEN, 2010), que também intermediam processos de morte celular. Contrapondo esses efeitos, pelo menos no CPF, o sistema parece induzir um aumento da expressão dos genes *CACNA1C* e *AMPA1*. As conexões do CPF com o hipocampo (CHURCHWELL *et al.*, 2010) poderiam de alguma forma também colaborar com a manutenção de funções hipocámpais, mas ao longo do processo e permanência da deficiência até um estágio mais grave, esse “tamponamento” poderia se romper, resultando nos conhecidos prejuízos cognitivos e sinais neurológicos graves induzidos pela DT.

Os efeitos dos tratamentos (DT e/ou ET) na expressão dos genes *CASP8*, *CASP3*, *AKT1*, *AMPA1*, *MAPK8*, *NFKβ1* e *BDNF* no hipocampo, acontecem, na sua grande maioria, de forma significativa apenas quando os dois tratamentos foram associados. As expressões desses genes foram diminuídas, nos animais do grupo ET-DT. No caso do *BDNF*, a diminuição da expressão do gene para essa neurotrofina foi induzida tanto pela DT isolada ou associada com o ET. Como se trata de efeitos detectados durante o episódio de deficiência, enquanto os animais ainda consumiam etanol, a interação dos fatores “etanol crônico e agudo” e “ausência de tiamina” devem ser considerados na interpretação de cada um desses efeitos. A diminuição da expressão

de alguns desses genes (*CASP3*, *CASP8* e *MAPK8*) pode estar acontecendo com o propósito de favorecer a viabilidade celular (PAPA *et al.*, 2004), enquanto a diminuição da expressão dos genes para *BDNF* e *NFK β 1*, desfavorece a viabilidade celular. Fatores como duração do episódio de DT e consumo de etanol e/ou período de recuperação, podem induzir o deslocamento desse “equilíbrio” para um lado ou para outro. No caso da *CASP3*, vale mencionar, os resultados de SNIGDHA *et al.*, (2012), que mostram evidências sobre o papel dessa enzima no ponto de bifurcação de dois sistemas: plasticidade e morte celular.

No tálamo, região mais susceptível aos danos causados pela DT, os efeitos significativos acontecem nos animais dos grupos ET-DT e DT isolada, com aumento da expressão do gene *CASP9* (que neste caso poderia estar agindo sobre outras caspases executoras da apoptose, como a caspase 6 e 7) (PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013; SEOL; BILLIAR, 1999), já que a expressão de *CASP3*, neste estágio (T1’), não foi afetada no tálamo. Nos animais que são submetidos aos dois tratamentos (ET-DT) verifica-se uma diminuição significativa na expressão do *BDNF*, podendo ser considerado um dos importantes fatores responsáveis pela morte celular nesta região (GAO *et al.*, 2010; YOUNG *et al.*, 2005). Como no CPF, a expressão do gene *AMPA1* aumenta de forma significativa, o que poderia representar um ajuste para manter o funcionamento de células remanescentes.

Efeitos da DT e/ou Consumo crônico de etanol (seis meses) sobre a expressão gênica nos TEMPOS T2’ (14d do episódio de DT), T3’(1 dia de recuperação) e T4’ (21 dias de recuperação).

No **CPF**, verificamos efeitos significativos dos tratamentos ET-T, DT-4h sobre a expressão da *CASP3*, no tempo correspondente ao final do episódio de deficiência de tiamina (T2'), momento que os animais do grupo DT-4h estavam deficientes por 14 dias e os animais do grupo ET, estavam consumindo etanol por 6 meses. Os dois tratamentos induziram uma diminuição na expressão do gene *CASP3* e esse efeito pode ser interpretado como uma resposta para diminuir a apoptose, que poderia estar sendo causada via $\text{NF}\kappa\beta$. Essa hipótese é viável, pois, ainda no CPF, observamos efeitos significativos dos tratamentos ET (com ou sem suplementação de tiamina), DT-4h e da associação desses tratamentos (ET-DT) sobre a expressão da *NFKB1*, também no tempo T2', correspondente ao final do episódio de DT. Os tratamentos induziram uma diminuição na expressão do gene *NFKB1* e esse efeito (contraposto pela diminuição da *CASP3*), poderia levar a uma diminuição da viabilidade celular. Como mencionado, os autores PAPA *et al.*, (2004), mostram evidências de que uma diminuição na concentração de $\text{NF}\kappa\beta 1$ representa um mecanismo que leva à apoptose.

Um outro resultado encontrado no CPF, se refere a uma diminuição significativa da expressão da *CASP9* um dia após o final do episódio de DT, ou seja, após 24 horas de recuperação (T3'), causado pelo consumo crônico de etanol. Registramos esse achado, mas até o presente momento, não conseguimos encontrar uma explicação para esse efeito, que não foi verificado nos outros tempos T2' e nem T4'.

No **hipocampo**, de forma similar ao CPF, verificamos efeitos significativos dos tratamentos ET sobre a expressão da *CASP3*, no tempo T2', momento que os animais do grupo ET, estavam consumindo etanol por 6 meses. No entanto, diferentemente do CPF, a DT não afetou a expressão de *CASP3* no hipocampo no tempo T2'. O que se observa é que, no tempo T2' (14d do episódio de DT), esses dois tratamentos, ET e DT diminuíram, de forma significativa, a expressão da *CASP8*, efeito que também pode ser

interpretado como uma resposta para diminuir a apoptose. Outro resultado que foi diferente do CPF, é que nos animais que foram submetidos à DT, após 24h de recuperação apresentaram um aumento significativo na expressão do gene *NFK β 1* e esse efeito, pode ser interpretado como um mecanismo que favorece a viabilidade celular, revertendo possíveis disfunções induzidas pela DT.

Outros achados interessantes no **hipocampo** são os efeitos sobre a expressão dos genes *AMPA1* e *CACNA1C*. Observa-se que a DT, revertida após 4h ou 1h do aparecimento dos sinais neurológicos, pode, respectivamente, afetar ou não, a expressão do gene que codifica para canais de cálcio sensível à voltagem. O observado é um aumento significativo na expressão de *CACNA1C* no T2', que como citado acima, na apresentação dos dados obtidos em amostras do CPF, pode ser um aumento que acontece como uma resposta neurobiológica para evitar déficits cognitivos, favorecendo funções neurais importantes e que dependem da atividade dos tipos de canais codificados por esse gene. Por outro lado, a expressão do gene *AMPA1* no hipocampo, foi significativamente diminuída pela DT. Esse fato, não foi observado nem no CPF (onde ocorreu aumento da expressão) e nem no tálamo, sinalizando uma susceptibilidade diferente entre as regiões do SNC frente aos insultos, DT e/ou ET.

Na região do **Tálamo**, foram observados efeitos significativos do ET e DT, isolados ou também associados (para o caso do efeito sobre o gene *MAPK8*) na diminuição das expressões dos genes *CASP9* e *MAPK8* (proteína JNK), no último dia do episódio de DT, indicando a participação de mecanismos relacionado à manutenção da viabilidade celular, “trabalhando” para a sobrevivência do tecido. Em contrapartida, outros fatores que favorecem a morte neuronal, como a ativação da expressão do gene *CASP8*, estão também agindo na fase T2' e persistem mesmo após períodos de recuperação (T3' e T4'). Considerando que o tálamo é uma das regiões intensamente

afetadas pela DT, com lesões possíveis de serem visualizadas à olho nu, como observado nos animais deficientes do presente estudo, pode-se hipotetizar que os efeitos no aumento da expressão do gene *CASP8* deve preponderar frente aos mecanismos que o contrapõe, como por exemplo, a diminuição das expressões dos genes *CASP9* e *MAPK8*.

Outros efeitos induzidos pela DT e ET, detectados após período de recuperação (T3') foi a diminuição da expressão do gene *CACNA1C* e do *AKT1*, sendo que a diminuição da expressão de *AKT1* foi observada apenas no grupo ET, no tempo T4' (21 dias de recuperação). Esses efeitos tardios podem representar respostas celulares compensatórias, com o intuito de resgatar funções afetadas por esses tratamentos. Os dois efeitos, diminuição dos canais de cálcio do tipo CaV1.2 e da proteína cinase Akt, podem funcionar como parte do restabelecimento da homeostase do cálcio.

8. CONCLUSÕES GERAIS

As conclusões apresentadas abaixo, estão relacionadas com cada uma das quatro hipóteses que foram testadas no presente estudo.

Hipótese 1. Os níveis de tiamina e suas formas fosforiladas são afetados de forma diferente (i) ao longo da evolução de um processo induzido pela deficiência de tiamina, ou seja, quando se comparam as fases: durante e final de um episódio de DT e após período de recuperação e (ii) dependente da região do SNC (CPF, H e T).

Resultados: Hipótese corroborada para o item (i) pela observação das reduções nas concentrações das formas fosforiladas (TMP, TDP) em todos os tecidos analisados (CPF, H e T), em tempos correspondentes a estágios clínicos diferentes do processo neurodegenerativo, induzido pela deficiência de tiamina. Também ocorreu diferença significativa nos níveis de TTP de maneira dependente do tecido. Até o presente momento, os resultados obtidos, referentes ao item (ii) ainda não foram analisados usando modelo estatístico. No entanto, uma observação não sistemática dos dados indica a existência de efeitos distintos da deficiência de tiamina, quando se consideram tecidos diferentes, no caso CPF, hipocampo e tálamo.

Conclusão 1: as funções da tiamina e/ou suas formas fosforiladas são diferentes nos tecidos cerebrais, e uma deficiência desta vitamina resulta em comprometimentos distintos em cada uma das regiões do SNC, CPF (hipocampo e tálamo).

Hipótese 2. A deficiência de tiamina induz déficits cognitivos em aprendizado e memória espacial operacional e alterações em componentes envolvidos em processos de morte celular (atividade de caspases e níveis de cálcio).

Resultados: Hipótese corroborada, visto que observamos déficit de memória espacial operacional nos animais do grupo DT, bem como alterações significativas das atividades das caspases 8 e 3 e dos níveis de cálcio livre no CPF.

Conclusão 2: A tiamina é importante na manutenção da homeostase neuronal e a sua deficiência induz disfunções neurobiológicas em região cerebral responsável por funções cognitivas operacionais, que foram afetadas pela falta desta vitamina.

Hipótese 3. Animais deficientes em tiamina e submetidos a uma experiência cognitiva apresentam alterações na expressão de genes envolvidos no processo de morte neuronal.

Resultados: Hipótese corroborada, pois observamos alterações na expressão dos genes *CASP3*, *CASP8* e *CACNA1C* envolvidos com processos de morte neuronal, como também efeitos da experiência cognitiva sobre a expressão gênica.

Conclusão 3. A tiamina e/ou derivados fosforilados da tiamina são importantes em processos relacionados à expressão de genes que produzem componentes que participam de sistemas relacionados com a manutenção da viabilidade celular.

Hipótese 4. A deficiência de tiamina associada ou não ao consumo crônico de etanol altera a expressão de genes envolvidos no processo de morte neuronal.

Resultados: Hipótese corroborada pela observação de alterações significativas, causadas pela DT e/ou ET crônico, na expressão de genes envolvidos em processos de morte e viabilidade celular (redução da expressão dos genes *CASP3*, *CASP8*, *AKT1*, *MAPK8*, *AMPA1*, *NFKB1*) em todos os tecidos (CPF, H e T). As alterações ocorreram principalmente no hipocampo, induzidas pela DT e pelo consumo crônico de etanol, sendo mais evidentes aquelas causadas pela associação entre essas duas condições.

Conclusão 4. O hipocampo é mais susceptível aos efeitos do consumo crônico de etanol, quando este ocorre em indivíduos deficientes em tiamina e vice-versa. O etanol interfere em processos neurobiológicos, nos quais a tiamina e/ou derivados fosforilados da tiamina são importantes, como aqueles que regulam a expressão de genes envolvidos na manutenção da viabilidade celular.

13. REFERÊNCIAS

- AKBAR, Mohammed *et al.* Medications for alcohol use disorders : An overview. v. 185, n. December 2017, p. 64–85, 2018.
- ALAVIAN, Kambiz N. *et al.* Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1 FO ATP synthase. *Physiology & behavior*, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2012.
- ALOE, Luigi; TIRASSA, Paola. The Effect of Long-Term Alcohol Intake on Brain NGF-Target Cells of Aged Rats. *Alcohol*, v. 9, p. 299–304, 1992.
- ANDERSEN, Birgitte Bo. Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics. v. i, p. 10–18, 2004.
- ANDREYEV, A; FISKUM, G. Calcium induced release of mitochondrial cytochrome c by different mechanisms selective for brain versus liver. *Cell death and differentiation*, v. 6, n. 9, p. 825–32, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510464>>.
- ARUMUGAN, Shanmugiah. Thiamine deficiency in alcoholics with normal body mass index. *J NTR Univ Health Sci*, v. 8, p. 59–61, 2019.
- ASHKENAZI, Avi; SALVESEN, Guy. Regulated Cell Death : Signaling and Mechanisms. *The Annual Review of cell and developmental biology*, p. 337–56, 2014.
- Bâ, Abdoulaye. Alcohol and thiamine deficiency trigger differential mitochondrial transition pore opening mediating cellular death. *Apoptosis*, v. 22, n. 6, p. 741–752, 2017.
- BADDELEY, Alan. WORKING MEMORY : LOOKING BACK AND LOOKING FORWARD. *Nature reviews*, v. 4, n. October, 2003.
- BAJWA, Ekta; POINTER, Caitlin B.; KLEGERIS, Andis. The role of mitochondrial damage-associated molecular patterns in chronic neuroinflammation. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, 2019.
- BAKER, K. G. *et al.* Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. *Neuroscience*, v. 91, n. 2, p. 429–438, 1999.
- BALLARD, Clive *et al.* Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, 2011.
- BANO, Daniele *et al.* The plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger is cleaved by distinct protease families in neuronal cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1099, p. 451–455, 2007.
- BARNES, C A. Memory Deficits Associated With Senescence : A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. *Journal of comparative and Physiological Psychology*, v. 93, n. 1, p. 74–104, 1979.
- BARRIA, Andres; DERKACH, Victor; SODERLING, Thomas. Phosphorylation Site in the Glutamate Receptor *. p. 32727–32731, 1997.
- BATHORI., Gyorgy *et al.* Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 25, p. 17347–17358, 2006.
- BEAR, Mark F; MALENKA, Robert C. Synaptic plasticity : LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology*, p. 389–399, 1994.

- BENKE, Tim A. *et al.* Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*, v. 393, n. June, p. 793–797, 1998.
- BERGER, Stefan M.; BARTSCH, Dusan. The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell and Tissue Research*, v. 357, n. 2, p. 463–476, 2014.
- BERGHE, T. Vanden *et al.* Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death and Differentiation*, v. 17, n. 6, p. 922–930, 2010.
- BERRIDGE*, Michael V. *et al.* Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Anticancer Research*, v. 11, n. 5, p. 2195–2202, 2005.
- BERROW, Nick S *et al.* Antisense depletion of α_1 -subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. p. 481–491, 1995.
- BETTENDORF, L.; KOLB, H. A.; SCHOFFENIELS, E. Thiamine Triphosphate Activates an Anion Channel of Large Unit Conductance in Neuroblastoma Cells. *Journal Membrane Biol.*, v. 288, p. 281–288, 1993.
- BETTENDORFF, L. *et al.* Determination of thiamin and its phosphate esters in cultured neurons and astrocytes using an ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatographic method. *Analytical Biochemistry*, v. 198, n. 1, p. 52–59, 1991.
- BETTENDORFF, L. *et al.* Thiamin and derivatives as modulators of rat brain chloride channels. *Neuroscience*, v. 52, n. 4, p. 1009–1017, 1993.
- BETTENDORFF, L. Determination of Thiamin and Its Phosphate Esters in Cultured Neurons and Astrocytes Using an Ion-Pair Liquid Chromatographic Method. *Analytical Biochemistry*, v. 198, p. 52–59, 1991.
- BETTENDORFF, L *et al.* Metabolism of thiamine triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. *Journal of neurochemistry*, v. 60, n. 2, p. 423–434, 1993.
- BETTENDORFF, Lucien *et al.* Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nature Chemical Biology*, v. 3, n. 4, p. 211–212, 2007.
- BETTENDORFF, Lucien. Thiamine in excitable tissues: Reflections on a non-cofactor role. *Metabolic Brain Disease*, v. 9, n. 3, p. 183–209, 1994.
- BETTENDORFF, Lucien; WINS, Pierre. Thiamin diphosphate in biological chemistry: New aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. *FEBS Journal*, v. 276, n. 11, p. 2917–2925, 2009.
- BETTENDORFF, Lucien; WINS, Pierre; LESOURD, Monique. Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. *BBA - Molecular Cell Research*, v. 1222, n. 1, p. 1–6, 1994.
- BETTENDORFF, Lucien; WINS, Pierre; SCHOFFENIELS, Ernest. Thiamine triphosphatase from electrophorus electric organ is anion-dependent and irreversibly inhibited by 4.4 diisothiocyanostilbene 2.2 disulfonic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n. 3, p. 942–947, 1988.
- BICHET, Delphine *et al.* The I-II Loop of the Ca^{2+} Channel α_1 Subunit Contains an Endoplasmic Reticulum Retention Signal Antagonized by the β_1 Subunit. v. 25, n. Vdccc, p. 177–190, 2000.
- BIGOS, Kristin L *et al.* Genetic variation in CACNA1C affects brain circuitries related to

- mental illness. *Arch Gen Psychiatry*, v. 67, n. 9, p. 939–945, 2010.
- BILLEN, L P; ANDREWS, D W. Bid : a Bax-like BH3 protein. v. 27, n. S1, p. S93–S104, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.47>>.
- BOBAL, M. G.; SAVAGE, L. M. The role of ventral midline thalamus in cholinergic-based recovery in the amnesic rat. *Neuroscience*, v. 285, p. 260–268, 2015.
- BONTHIUS, Daniel J *et al.* NeuroToxicology The protective effect of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) against alcohol toxicity depends upon the NO-cGMP-PKG pathway and NF-k B. v. 29, p. 1080–1091, 2008.
- BRANDEIS, Rachel; BRANDYS, Yaacov; YEHUDA, Shlomo. The Use of the Morris Water Maze in the Study of Memory and Learning. *International Journal of Neuroscience*, v. 48, n. 1–2, p. 29–69, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/00207458909002151>>.
- BRATCH, Alexander *et al.* Working Memory Systems in the Rat. *Current Biology*, v. 26, n. 3, p. 351–355, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982215015614>>.
- BRESLOW, Ronald. On the Mechanism of Thiamine Action. IV.1 Evidence from Studies on Model Systems. v. 149, n. 6, 1958.
- BUENO, K.O. *et al.* Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke–Korsakoff syndrome are related to changes in thalamic VDAC protein concentrations. *Neuroscience*, v. 294, p. 29–37, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215002122>>.
- BUENO, Kenia De Oliveira. Déficit cognitivo espacial está relacionado com alteração na concentração do Canal Aniônico Dependente de Voltagem no tálamo de ratos deficientes em tiamina. 2015.
- BURAEI, Zafir; YANG, Jian. The Beta Subunit of Voltage-Gated Calcium Channels. *Physiological reviews*, v. 90, p. 1461–1506, 2010.
- BURNS, Malcolm J *et al.* Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnology*, v. 13, p. 1–13, 2005.
- BURTÉ, Florence *et al.* Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, v. 11, n. 1, p. 11–24, 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneuro.2014.228>>.
- BUTTERWORTH, Roger F. Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutrition research reviews*, v. 16, n. 2, p. 277–284, 2003.
- CADETE-LEITE, A. *et al.* NERVE GROWTH FACTOR PREVENTS CELL DEATH AND INDUCES HYPERTROPHY OF BASAL FOREBRAIN CHOLINERGIC NEURONS IN RATS WITHDRAWN FROM PROLONGED ETHANOL INTAKE. *Neuroscience*, v. 119, p. 1055–1069, 2003.
- CAMPOS-BEDOLLA, Patricia; WALTER, Fruzsina R; VESZELKA, Szilvia. Role of the Blood e Brain Barrier in the Nutrition of the Central Nervous System. *Archives of Medical Research*, v. 45, p. 610–638, 2014.
- CARRUTHERS, Peter. Evolution of working memory. *PNAS*, v. 110, p. 10371–10378, 2013.
- CATTERALL, William A *et al.* International Union of Pharmacology . XLVIII . Nomenclature

and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacological reviews*, v. 57, n. 4, p. 411–425, 2005.

CATTERALL, William A. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 16, n. 1, p. 521–555, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521>>.

CAVALCANTE, Giovanna C. *et al.* A cell's fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 17, p. 1–20, 2019.

CHANAS, G *et al.* NEURONAL LOCALIZATION OF THE 25-kDa SPECIFIC THIAMINE TRIPHOSPHATASE IN RODENT BRAIN. v. 125, p. 833–840, 2004.

CHANG, David W. *et al.* C-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO Journal*, v. 21, n. 14, p. 3704–3714, 2002.

CHAUDHRY, Shafqat Rasul *et al.* Role of damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) in aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 7, 2018.

CHURCHWELL, John C *et al.* Neurobiology of Learning and Memory Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 93, n. 3, p. 415–421, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.008>>.

CICCIA, Rosanne M; LANGLAIS, Philip 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. v. 24, n. 5, p. 622–634, 2000.

CLARK, N C *et al.* NEUROLOGICAL PHENOTYPE AND SYNAPTIC FUNCTION IN MICE LACKING THE Ca_v1.3 α_1 SUBUNIT OF NEURONAL L-TYPE VOLTAGE-DEPENDENT Ca²⁺ CHANNELS. *Neuroscience*, v. 120, p. 435–442, 2003.

COHEN, N J; SQUIRE, L R. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: Dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, cited By 1362, v. 210, n. 4466, p. 207–210, 1980. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0019163156&doi=10.1126%2Fscience.7414331&partnerID=40&md5=0d1fb8761655a5d9663a8e7209e3f890>>.

COOPER, Jack R.; PINCUS, Jonathan H. THE ROLE OF THIAMINE IN NERVOUS TISSUE. *Neurochemical Research*, v. 239, n. 4, p. 223–239, 1979.

COWAN, Nelson. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res*, v. 6123, n. 07, p. 323–338, 2009.

CROMPTON, Tessa *et al.* Propidium iodide staining correlates with the extent of DNA degradation in isolated nuclei. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. M, n. 2, p. 532–537, 1992.

CROSBY, John; STONE, Richard; LIENHARD, Gustav E. Mechanisms of thiamine-catalyzed reactions. Decarboxylation of 2-(1-carboxy-1-hydroxyethyl)-3,4-dimethylthiazolium chloride. *Journal of the American Chemical Society*, v. 92, n. 9, p. 2891–2900, 1 maio 1970. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja00712a048>>.

CSERNE SZAPPANOS, Henrietta; VIOLA, Helena; HOOL, Livia C. L-type calcium channel: Clarifying the “oxygen sensing hypothesis”. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 86, p. 32–36, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.03.010>>.

CUEVAS, Javier. *Neurotransmission*. v. 1662, n. 2004, p. 2007, 2007.

CZABOTAR, Peter E *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 1, p. 49–63, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrm3722>>.

D'HOOGE, Rudi; DE DEYN, Peter P. *Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory*. [S.l: s.n.], 2001. v. 36.

DAHLIN, Amber *et al.* Expression Profiling of the Solute Carrier Gene Family in the Mouse Brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 329, p. 558–570, 2009.

DAO, David T. *et al.* Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biological Psychiatry*, v. 68, n. 9, p. 801–810, 2010.

DE FÁTIMA OLIVEIRA-SILVA, Ieda *et al.* Mild Thiamine Deficiency and Chronic Ethanol Consumption Modulate Acetylcholinesterase Activity Change and Spatial Memory Performance in a Water Maze Task. *Journal of molecular neuroscience : MN*, p. 217–226, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770900>>.

DE PAULA, Vanessa J.R.; GUIMARÃES, Fabiana M.; FORLENZA, Orestes V. Papel da proteína Tau na fisiopatologia da demência frontotemporal. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 36, n. 5, p. 212–217, 2009.

DE PINTO, V; PREZIOSO, G; PALMIERI, F. A simple and rapid method for the purification of the mitochondrial porin from mammalian tissues. *Biochimica et biophysica acta*, v. 905, n. 2, p. 499–502, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2825789>>.

DEGTEREV, Alexei *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, v. 1, n. 2, p. 112–119, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nchembio711>>.

DELVAUX, David *et al.* Biochimica et Biophysica Acta Structural determinants of specificity and catalytic mechanism in mammalian 25-kDa thiamine triphosphatase. *BBA - General Subjects*, v. 1830, n. 10, p. 4513–4523, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.014>>.

DEWSON, Grant; KLUCK, Ruth M. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of cell science*, v. 16, p. 2801–2807, 2009.

DHIR, Shibani *et al.* Neurological, psychiatric, and biochemical aspects of thiamine deficiency in children and adults. *Frontiers in Psychiatry*, v. 10, n. APR, p. 1–15, 2019.

DI MARCO, Salvatore *et al.* Wernicke-Korsakoff syndrome complicated by subacute beriberi neuropathy in an alcoholic patient. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 164, n. September 2017, p. 1–4, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2017.11.006>>.

DINGLELINE, Raymond *et al.* The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological reviews*, v. 51, n. 1, 1999.

DOREMUS-FITZWATER, Tamara L *et al.* Physiology & Behavior Male adolescent rats display blunted cytokine responses in the CNS after acute ethanol or lipopolysaccharide exposure ☆. *Physiology & Behavior*, v. 148, p. 131–144, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.032>>.

- DRUKARCH, Benjamin *et al.* Progress in Neurobiology Thinking about the nerve impulse : A critical analysis of the electricity- centered conception of nerve excitability. *Progress in Neurobiology*, v. 169, n. April, p. 172–185, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.009>>.
- DUDCHENKO, Paul A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 28, n. 7, p. 699–709, 2004a.
- DUDCHENKO, Paul A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. v. 28, p. 699–709, 2004b.
- ESPOSTI, M Degli. The roles of Bid. v. 7, n. 5, p. 433–440, 2002.
- FERRARO, Elisabetta *et al.* Apoptosome Structure and Regulation. In: CECCONI, FRANCESCO; D'AMELIO, MARCELLO (Org.). . *Apoptosome: An up-and-coming therapeutical tool*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 27–39. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3415-1_2>.
- FERREIRA-VIEIRA, Talita Hélen *et al.* Perinatal thiamine restriction affects central GABA and glutamate concentrations and motor behavior of adult rat offspring. *Neuroscience Letters*, v. 617, p. 182–187, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.060>>.
- FOY, M. R. Long-term Depression (Hippocampus). *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*, p. 9074–9078, 2000.
- FREZZA, Christian *et al.* OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell*, v. 126, n. 1, p. 177–189, 2006.
- FUCHSLOCHER CHICO, Johaiber; SAGGAU, Carina; ADAM, Dieter. Proteolytic control of regulated necrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1864, n. 11, p. 2147–2161, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.025>>.
- FUJIKAWA, Denson G. The Role of Excitotoxic Programmed Necrosis in Acute Brain Injury. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 13, p. 212–221, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.004>>.
- FUKUNAGAS, Kohji; STOPPINIG, Luc; MIYAMOTOS, Eishichi. Long-term Potentiation Is Associated with an Increased Activity of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase 11". p. 7863–7867, 1993.
- FUNAHASHI, Shintaro. Working memory in the prefrontal cortex. *Brain Sciences*, v. 7, n. 5, 2017.
- GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.
- GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 2018.
- GANGOLF, Marjorie *et al.* Thiamine triphosphate synthesis in rat brain occurs in mitochondria and is coupled to the respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 1, p. 583–594, 2010.
- GAO, Xiao Qing *et al.* Ginsenoside Rb1 regulates the expressions of brain-derived neurotrophic factor and caspase-3 and induces neurogenesis in rats with experimental cerebral ischemia. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 132, n. 2, p. 393–399, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.033>>.

- GIBSON, Gary E *et al.* Vitamin B1 (thiamine) and dementia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1, p. 21–30, 2016.
- GIGLIOBIANCO, Tiziana *et al.* Adenylate kinase-independent thiamine triphosphate accumulation under severe energy stress in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, v. 6, p. 4–9, 2008.
- GIGLIOBIANCO, Tiziana *et al.* An alternative role of F_oF₁-ATP synthase in *Escherichia coli* : synthesis of thiamine triphosphate. *Scientific Reports*, v. 1, 2013.
- GILOT, David *et al.* A role for caspase-8 and c-FLIPL in proliferation and cell-cycle progression of primary hepatocytes. *Carcinogenesis*, v. 26, n. 12, p. 2086–2094, 2005.
- GIRARD, Murielle *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor Serum Levels Alcohol Withdrawal. v. 35, n. 11, p. 1966–1973, 2011.
- GLAZNER, Gordon W *et al.* Caspase-Mediated Degradation of AMPA Receptor Subunits : A Mechanism for Preventing Excitotoxic Necrosis and Ensuring Apoptosis. v. 20, n. 10, p. 3641–3649, 2000.
- GOLDSCHNEIDER, D.; MEHLEN, P. Dependence receptors: A new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene*, v. 29, n. 13, p. 1865–1882, 2010.
- GREEN, D. R.; OGUIN, T. H.; MARTINEZ, J. The clearance of dying cells: Table for two. *Cell Death and Differentiation*, v. 23, n. 6, p. 915–926, 2016.
- GREGGER, Ingo H; WATSON, Jake F; CULL-CANDY, Stuart G. Review Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron*, v. 94, n. 4, p. 713–730, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.009>>.
- GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; DA ROCHA, Adriana Brondani. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancrologia*, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf>.
- GRUBBS, Frank E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics*, v. 11, n. 1, p. 1–21, 1969.
- GUISE, Kevin G.; SHAPIRO, Matthew L. Medial Prefrontal Cortex Reduces Memory Interference by Modifying Hippocampal Encoding. *Neuron*, v. 94, n. 1, p. 183–192.e8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.011>>.
- GUO, J. *et al.* BDNF pro-peptide regulates dendritic spines via caspase-3. *Cell Death and Disease*, 2016.
- HAJIEVA, Parvana *et al.* Neuroscience Letters Impaired calcium homeostasis in aged hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, v. 451, p. 119–123, 2009.
- HAMPEL, Harald *et al.* Biomarkers for Alzheimer’s disease therapeutic trials. *Progress in Neurobiology*, v. 95, n. 4, p. 579–593, 2011.
- HARA, Taichi *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, v. 441, n. 7095, p. 885–889, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature04724>>.
- HARDINGHAM, Giles E; BADING, Hilmar. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. v. 11, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn2911>>.

HARPER, Clive. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol and Alcoholism*, v. 44, n. 2, p. 136–140, 2009a.

HARPER, Clive. The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage. v. 44, n. 2, p. 136–140, 2009b.

HARPER, Clive. The Neuropathology of Alcohol-specific Brain Damage, or Does Alcohol Damage the Brain? *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 57, p. 101–110, 1998.

HARPER, Clive; MATSUMOTO, Izuru. Ethanol and brain damage. 1997.

HASHITANI, Yoshito; COOPER, Jack R. The partial purification of thiamin triphosphatase from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 247, n. 7, p. 2117–2119, 1972.

HAVEN, New. Cellular Basis of Working Memory Review. *Neuron*, v. 14, p. 477–485, 1995.

HAZELL, Alan S. Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy. *Neurochemistry International*, v. 55, n. 1–3, p. 129–135, 2009.

HAZELL, Alan S.; BUTTERWORTH, Roger F. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: Focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol and Alcoholism*, v. 44, n. 2, p. 141–147, 2009.

HAZELL, Alan S *et al.* Selective down-regulation of the astrocyte glutamate transporters GLT-1 and GLAST within the medial thalamus in experimental Wernicke's encephalopathy. p. 560–568, 2001.

HAZELL, Alan S; BUTTERWORTH, Roger F; HAKIM, Antoine M. Cerebral Vulnerability Is Associated with Selective Increase in Extracellular Glutamate Concentration in Experimental Thiamine Deficiency. *Journal of Neurochemistry*, v. 61, n. 3, p. 1155–1158, 1993. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03635.x>>.

HELL, Johannes W *et al.* Identification and Differential Subcellular Localization of the Neuronal Class C and Class D L-Type Calcium Channel α 1 Subunits. v. 123, n. 4, p. 949–962, 1993.

HÉROUX, Maryse; BUTTERWORTH, Roger F. Reversible Alterations of Cerebral γ -Aminobutyric Acid in Pyridoxamine-Treated Rats: Implications for the Pathogenesis of Wernicke's Encephalopathy. *Journal of Neurochemistry*, v. 51, n. 4, p. 1221–1226, 1988. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.1988.tb03090.x>>.

HIRSCH, Joseph A.; PARROTT, James. New considerations on the neuromodulatory role of thiamine. *Pharmacology*, v. 89, n. 1–2, p. 111–116, 2012.

HIRTZ, Jan J *et al.* α 1.3 Calcium Channels Are Required for Normal Development of the Auditory Brainstem. *The Journal of neuroscience*, v. 31, n. 22, p. 8280–8294, 2011.

HOLZER, H *et al.* ACTIVE FORMS OF ACETALDEHYDE, PYRUVATE, AND GLYCOLIC ALDEHYDE*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 98, n. 2, p. 453–465, 1962. Disponível em: <<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1962.tb30566.x>>.

HOOVER, Davenport. Plans and the structure of behavior. By George A. Miller, Eugene Galanter and Karl H. Pribram 1960. Henry Holt and company, New York. 226 pp. *Journal of Comparative Neurology*, v. 115, n. 2, p. 217, 1960. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cne.901150208>>.

- HORMUZDI, Sheriar G. *et al.* Electrical synapses: A dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1662, n. 1–2, p. 113–137, 2004.
- HORT, Jakub *et al.* Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 10, p. 4042–4047, 2007.
- HOUZEN, H; KANNO, M. Thiamine and its derivatives inhibit delayed rectifier potassium channels of rat cultured cortical neurons. *Neuropharmacology*, v. 37, n. 3, p. 313–322, 1998.
- HU, Wen-hui *et al.* Activation of NF- κ B by FADD, Casper, and Caspase-8*. v. 275, n. 15, p. 10838–10844, 2000.
- HUDSON, Bruce *et al.* The use of an ethidium analogue in the dye-buoyant density procedure for the isolation of closed circular DNA: The variation of the superhelix density of mitochondrial DNA. p. 813–820, 1968.
- HUI, Kwokyin; FENG, Zhong-ping. Efficient experimental design and analysis of real-time PCR assays. *Landes Bioscience*, p. 160–170, 2013.
- INABA, Hiroyoshi *et al.* Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke–Korsakoff syndrome. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 80, n. 12, p. 2425–2436, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2016.1224639>>.
- ISAAC, John T R; ASHBY, Michael C; MCBAIN, Chris J. Review The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. p. 859–871, 2007.
- IZQUIERDO, Ivan. Memórias. p. 203, 1989.
- JANG, Mi-hyeon *et al.* Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via bax-dependent caspase-3 activation. v. 449, p. 39–45, 2002.
- JANKOWSKA-KULAWY, Agnieszka *et al.* Acetyl-CoA deficit in brain mitochondria in experimental thiamine deficiency encephalopathy. *Neurochemistry International*, v. 57, p. 851–856, 2010.
- JHALA, Shivraj S.; HAZELL, Alan S. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: Consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochemistry International*, v. 58, n. 3, p. 248–260, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2010.11.019>>.
- JIAO, Song; LI, Zheng. Article Nonapoptotic Function of BAD and BAX in Long-Term Depression of Synaptic Transmission. *Neuron*, v. 70, n. 4, p. 758–772, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.004>>.
- JOHNSEN-SORIANO, Siv *et al.* Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: Protective effects of an antioxidant. v. 100, n. 13, p. 7919–7924, 2003.
- JOYCE, Eileen M.; ROBBINS, Trevor W. Frontal lobe function in Korsakoff and non-Korsakoff alcoholics: Planning and spatial working memory. *Neuropsychologia*, v. 29, n. 8, p. 709–723, 1991.
- JURKOVICOVA-TARABOVÁ, Bohumila *et al.* Repertoire of high voltage-activated Ca²⁺ channels in the lateral superior. *Journal Neurophysiological*, p. 365–379, 2012.

- KANDEL, Eric R. *THE MOLECULAR BIOLOGY OF MEMORY STORAGE* : . [S.l: s.n.], 2000.
- KANDEL, Eric R. Biology and the future of Psychoanalysis: A New Intellectual Framework for Psychiatry Revisited. *Am J. Psychiatry*, n. April, p. 505–524, 1999.
- KANDEL, Eric R. *IN SEARCH OF The Emergence of a New Science of Mind*. [S.l: s.n.], 2006.
- KANDEL, Eric R. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2001. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/294/5544/1030>>.
- KANTARI, Chahrazade; WALCZAK, Henning. Biochimica et Biophysica Acta Caspase-8 and Bid : Caught in the act between death receptors and mitochondria ☆. *BBA - Molecular Cell Research*, v. 1813, n. 4, p. 558–563, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.026>>.
- KASSE, Eunice *et al.* Subtle object location perception deficits in Korsakoff's syndrome. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, v. 41, n. 9, p. 881–887, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13803395.2019.1640864>>.
- KE, Zun Ji; GIBSON, Gary E. Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochemistry International*, v. 45, n. 2–3, p. 361–369, 2004.
- KERNER, Janos *et al.* VDAC proteomics: Post-translation modifications. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1818, n. 6, p. 1520–1525, 2012.
- KESIDOU, Evangelia *et al.* Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regeneration Research*, v. 8, n. 24, p. 2275–2283, 2013.
- KESSELS, Roy P C *et al.* Varieties of human spatial memory: A meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews*, v. 35, n. 3, p. 295–303, 2001.
- KOIKE, M; KOIKE, K. Structure, assembly and function of mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *Advances in biophysics*, p. 187—227, 1976. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/797242>>.
- KOMATSU, Masaaki *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, v. 441, n. 7095, p. 880–884, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature04723>>.
- KONDRATSKYI, Artem *et al.* Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1848, n. 10, p. 2532–2546, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25450339%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273614003654>>.
- KRAMPITZ, L O; SUZUKI, I; GREULL, G. MECHANISM OF ACTION OF THIAMINE DIPHOSPHATE IN ENZYMIC REACTIONS*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 98, n. 2, p. 466–478, 1962. Disponível em: <<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1962.tb30567.x>>.
- KRIL, J J *et al.* THE CEREBRAL CORTEX IS DAMAGED IN CHRONIC ALCOHOLICS. v. 79, n. 4, p. 983–998, 2006.
- KRIL, Jillian J.; HARPER, Clive G. Neuroanatomy and neuropathology associated with Korsakoff's syndrome. *Neuropsychology Review*, v. 22, n. 2, p. 72–80, 2012.
- KRISTIANSEN, M; HAM, J. Programmed cell death during neuronal development: the

- sympathetic neuron model. *Cell death and differentiation*, v. 21, n. 7, p. 1025–35, 2014.
Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4207485&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.
- KRUIDERING, Marieke; EVAN, Gerard I. Caspase-8 in Apoptosis : The Beginning of “ The End ”? n. August, p. 85–90, 2000.
- KUIDA, Keisuke. Caspase-9. v. 32, p. 121–124, 2000.
- KUMAR, Ashwini *et al.* Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer’s disease. *Journal of the Formosan Medical Association*, p. 1–8, 2015. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929664615001497>>.
- LA ROVERE, Rita M.L. *et al.* Intracellular Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. 2016.
- LACIONVA, L. Voltage-Dependent Calcium Channels. *Gen Physiol Biophys*, v. 24, p. 1–78, 2005.
- LANGLAIS, Philip J.; SAVAGE, Lisa M. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. *Behavioural Brain Research*, v. 68, n. 1, p. 75–89, 1995.
- LANGLAIS, Philip J.; ZHANG, Shu Xing; SAVAGE, Lisa M. Neuropathology of thiamine deficiency: An update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metabolic Brain Disease*, v. 11, n. 1, p. 19–37, 1996.
- LANGLAIS, Philip J *et al.* Long-Lasting Changes in Regional Brain Amino Acids and Monoamines in Recovered Pyridoxine Treated Rats. v. 13, n. 12, p. 1199–1206, 1988.
- LANGWIESER, Nicole *et al.* Homeostatic Switch in Hebbian Plasticity and Fear Learning after Sustained Loss of Ca^v1.2 Calcium Channels. *The Journal of neuroscience*, v. 30, n. 25, p. 8367–8375, 2010.
- LEE, Hey-kyoung *et al.* Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*, v. 405, n. June, p. 955–959, 2000.
- LEE, Shuchen *et al.* ADAR2-dependent RNA editing of GluR2 is involved in thiamine deficiency-induced alteration of calcium dynamics. p. 1–13, 2010.
- LERMAN, L S. Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridinest. *Journal of Molecular Biology*, v. 3, n. 1, p. 18–30, IN13-IN14, 1961. Disponível em:
<[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80004-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80004-1)>.
- LEVY, Aharon *et al.* Nimodipine Improves Spatial Working Memory and Elevates Hippocampal Acetylcholine in Young Rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 39, p. 781–786, 1991.
- LI, Honglin *et al.* Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell Press*, v. 94, p. 491–501, 1998.
- LI, Peng *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, v. 91, n. 4, p. 479–489, 1997.
- LI, Ping *et al.* Caspase-9 : structure , mechanisms and clinical application. v. 8, n. 14, p. 23996–24008, 2017.

- LI, Zheng *et al.* Caspase-3 Activation via Mitochondria Is Required for Long-Term Depression and AMPA Receptor Internalization. *Cell*, v. 141, n. 5, p. 859–871, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.053>>.
- LI, Zheng; SHENG, Morgan. Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain*, v. 5, n. 1, p. 15, 2012. Disponível em: <<http://www.molecularbrain.com/content/5/1/15>>.
- LINDQVIST, Ylva; SCHNEIDER, Gunter. Thiamin diphosphate dependent enzymes: transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Current Biology*, p. 896–901, 1993.
- LINKERMANN, Andreas; GREEN, Douglas R. Necroptosis. *New England Journal of Medicine*, v. 370, n. 5, p. 455–465, 2014. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1310050>>.
- LIU, Dexiang; KE, Zunji; LUO, Jia. Thiamine Deficiency and Neurodegeneration: the Interplay Among Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy. *Molecular Neurobiology*, v. 54, n. 7, p. 5440–5448, 2017.
- LIVAK, Kenneth J; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. v. 408, p. 402–408, 2001.
- LOCKMAN, P R; MUMPER, R J; ALLEN, D D. Evaluation of blood – brain barrier thiamine efflux using the in situ rat brain perfusion method. *Journal of Neurochemistry*, p. 627–634, 2003.
- LOMBROSO, Paul. Aprendizagem e memória Learning and memory. v. 26, n. 3, p. 207–210, 2004.
- LONSDALE, Derrick. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 3, n. 1, p. 49–59, 2006.
- LOURENÇO, FC *et al.* Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-β production. *Cell Death Differ*, v. 16, n. 1, p. 665–663, 2009.
- LU, Chengbiao *et al.* Direct Cleavage of AMPA Receptor Subunit GluR1 and Suppression of AMPA Currents by Caspase-3 Implications for Synaptic Plasticity and Excitotoxic Neuronal Death. v. 1, 2002.
- MAIR, Robert G. *et al.* The neurobiology of thalamic amnesia: Contributions of medial thalamus and prefrontal cortex to delayed conditional discrimination. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 54, p. 161–174, 2014.
- MAKARCHIKOV, Alexander F. *et al.* Adenylate kinase 1 knockout mice have normal thiamine triphosphate levels. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1592, p. 117–121, 2002.
- MAKARCHIKOV, Alexander F; CHERNIKEVICH, Ivan P. Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain. v. 1117, p. 326–332, 1992.
- MALENKA, Robert C; BEAR, Mark F. LTP and LTD : An Embarrassment of Riches. v. 44, p. 5–21, 2004.
- MARIÑO, Guillermo; MADEO, Frank; KROEMER, Guido. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Current Opinion in Cell Biology*, Cell regulation, v. 23, n. 2, p. 198–206, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067410001729>>.
- MARK, Melanie D *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications Keeping Our

- Calcium in Balance to Maintain Our Balance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 483, n. 4, p. 1040–1050, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.020>>.
- MATSUDA, Toshio *et al.* Membranae-associated thiamine triphosphatase in rat skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry*, v. 23, n. 10, p. 1111–1114, 1991.
- MATSUSHIMA, Kazushi; MACMANUS, John P.; HAKIM, Antoine M. Apoptosis is restricted to the thalamus in thiamine-deficient rats. *Neuroreport*, v. 8, p. 867–870, 1997.
- MAYER, Mark L; CRUNELL, Vincenzo; KEMP, John A. Lithium ions increase action potential duration of mammalian neurons. *Brain Research*, v. 293, p. 173–177, 1984.
- MARTHUR, Kate; KILE, Benjamin T. Apoptotic Caspases : Multiple or Mistaken Identities ? *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 6, p. 475–493, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.003>>.
- MCCANDLESS, David W. Thiamine Deficiency and Cerebral Energy Metabolism. In: MCCANDLESS, DAVID W (Org.). *Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy*. Boston, MA: Springer US, 1985. p. 335–351. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1209-3_14>.
- MCCORMICK, Laurie M. *et al.* Beyond alcoholism: Wernicke-korsakoff syndrome in patients with psychiatric disorders. *Cognitive and Behavioral Neurology*, v. 24, n. 4, p. 209–216, 2011.
- MCKINNEY, Brandon C *et al.* L-type voltage-gated calcium channels in conditioned fear : A genetic and pharmacological analysis. *Learning & Memory*, p. 326–334, 2008.
- MCKINNEY, Brandon C; MURPHY, Geoffrey G. The L-Type voltage-gated calcium channel Ca v 1 . 3 mediates consolidation , but not extinction , of contextually conditioned fear in mice. *Learning & Memory*, n. 734, p. 584–589, 2006.
- MEHAL, Wajahat Z; INAYAT, Irteza; FLAVELL, Richard a. Mitochondrial Events of Apoptosis. n. February, p. 847–851, 2006.
- MENEZES, Elizabete Wenzel De; NEVES, Silvânia M. P.; FILHO, Jorge Mancini. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP. *Usp*, p. 234 p., 2013.
- MICHAYLOVA, V; ILKOVA, P. Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Ann. Chim Acta*, v. 53, p. 194–195, 1971.
- MICHAYLOVA, V; KOULEVA, N. SPECTROPHOTOMETRIC STUDY OF THE REACTIONS OF ARSENAZO III WITH METALS Absorptioti spectra This is explained by the inductive effect of the two conjugated systems of the reagent . ‘*’* i2 chromic shift in alkaline medium . Figure 2 shows the spectra of the . v. 21, p. 523–532, 1974.
- MILJANICH, G P; RAMACHANDRAN, J. Antagonists of Neuronal Calcium Channels: Structure, Function, and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 35, n. 1, p. 707–734, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.003423>>.
- MIYOSHI, Kazuo *et al.* Evidence for In Vivo Synthesis of Thiamin Triphosphate by Cytosolic Adenylate Kinase in Chicken Skeletal Muscle. *The Journal of Biochemistry*, v. 108, n. 2, p. 267–270, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123192>>.
- MIZUSHIMA, Noboru; OHSUMI, Yoshinori; YOSHIMORI, Tamotsu. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Structure and Function*, v. 27, n. 6, p. 421–429, 2002.

- MOCHIDA, Sumiko. Presynaptic calcium channels. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 9, p. 1–19, 2019.
- MOMENI, Hamid Reza. Role of calpain in apoptosis. *Cell Journal*, v. 13, n. 2, p. 65–72, 2011.
- MONACO, Giovanni *et al.* The BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-XL, but not that of the related Bcl-2, limits the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated transfer of pro-apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 14, p. 9150–9161, 2015.
- MOOSMANG, Sven *et al.* Role of Hippocampal Ca^v1.2 Ca²⁺ Channels in NMDA Receptor-Independent Synaptic Plasticity and Spatial Memory. v. 25, n. 43, p. 9883–9892, 2005.
- MOREIRA-LOBO, Daniel C. *et al.* Thiamine Deficiency Increases Ca²⁺ Current and CaV1.2 L-type Ca²⁺ Channel Levels in Cerebellum Granular Neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10571-016-0378-8>>.
- MORISHIMA, Nobuhiro *et al.* An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 37, p. 34287–34294, 2002a.
- MORISHIMA, Nobuhiro *et al.* An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 37, p. 34287–34294, 2002b.
- MORRIS, G M. Spatial Localization Does Not Require Local Cues the Presence of. *Learning and Motivation*, v. 12, p. 239–260, 1981.
- MRSIC-FLOGEL, Thomas; TREVES, Alessandro. Editorial overview: Circuit plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 35, n. since 2003, p. v–vii, 2015.
- MULHOLLAND, Patrick J. Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. *Cerebellum (London, England)*, v. 5, n. 1, p. 55–63, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16527765>>.
- NAGATA, Shigekazu; TANAKA, Masato. Programmed cell death and the immune system. *Nature Rev Immunol*, v. 17, n. 5, p. 333–340, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri.2016.153>>.
- NAGY, Adam *et al.* Mitochondrial energy metabolism and apoptosis regulation in glioblastoma. *Brain Research*, v. 1595, p. 127–142, 2015.
- NAKADA, H. I.; SUND, L. P. Glyoxylic acid oxidation by rat liver. *The Journal of biological chemistry*, v. 233, n. 1, p. 8–13, 1958.
- NASERI, Nima N. *et al.* The complexity of tau in Alzheimer’s disease. *Neuroscience Letters*, v. 705, n. April, p. 183–194, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.022>>.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *GUIDE for the care and use of LABORATORY ANIMALS*. [S.l: s.n.], 2011. v. 46. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595115>>.
- NAVARRO, Darren *et al.* Brain Lactate Synthesis in Thiamine Deficiency : A Re-evaluation Using 1 H- 13 C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Neuroscience Research*, v. 41, p. 33–41, 2005.
- NEVES, A; BRINDLE, Kevin M. Imaging Cell Death ´. *Focus on molecular imaging*, p. 1–5, 2014.

- NEWTON, Kim *et al.* Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis. *Nature*, v. 574, n. 7778, p. 428–431, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1548-x>>.
- NIJHAWAN, D; HONARPOUR, N; WANG, X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci*, v. 23, n. May 2006, p. 73–87, 2000.
- NOMURA, Motonari *et al.* Accumulation of cytosolic calcium induces necroptotic cell death in human neuroblastoma. *Cancer Research*, v. 74, n. 4, p. 1056–1066, 2014.
- NORRIS, Christopher M; KOROL, Donna L; FOSTER, Thomas C. Increased Susceptibility to Induction of Long-Term Depression and Long-Term Potentiation Reversal during Aging. v. 16, n. 17, p. 5382–5392, 1996.
- NOWAK, L *et al.* Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, v. 307, n. 5950, p. 462–465, 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/307462a0>>.
- NUNES, Polliana Toledo; VEDDER, Lindsey C; *et al.* A Pivotal Role for Thiamine Deficiency in the Expression of Neuroinflammation Markers in Models of Alcohol-Related Brain Damage. p. 1–14, 2018a.
- NUNES, Polliana Toledo; VEDDER, Lindsey C; *et al.* A Pivotal Role for Thiamine Deficiency in the Expression of Neuroinflammation Markers in Models of Alcohol-Related Brain Damage. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, p. 1–14, 2018b.
- NUNES, Polliana Toledo; GÓMEZ-MENDOZA, Diana Paola; *et al.* Thalamic Proteome Changes and Behavioral Impairments in Thiamine-deficient Rats. *Neuroscience*, v. 385, p. 181–197, 2018.
- NUNES, Polliana Toledo *et al.* Validation of a HPLC Method for Quantification of Thiamine and Its Phosphate Esters in Rat Brain Tissue. *Journal of Behavioral and Brain Science*, v. 07, n. 02, p. 79–93, 2017. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbbs.2017.72009>>.
- O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J.; J. O'KEEFE, J. Dostrovsky. Short Communications The hippocampus as a spatial map . Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, v. 34, n. 1, p. 171–175, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915>>.
- O'KEEFE, John. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, v. 51, n. 1, p. 78–109, 1976.
- OBERST, Andrew. Death in the fast lane: what's next for necroptosis? *FEBS Journal*, v. 283, p. 2616–2625, 2016.
- OLENDZKI, Tatielli *et al.* Efeito Neuroprotetor Do Suco De Uva Branco Sobre a Viabilidade Celular Do Córtex Cerebral De Ratos. n. 2, p. 176–184, 2013.
- OLIVEIRA, Fernando Augusto *et al.* Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K⁺ channels. *Brain Research*, v. 1134, n. 1, p. 79–86, 2007.
- OLTON, David S. The Radial Arm Maze as a Tool in Behavioral Pharmacology. *Physiology & Behavior*, v. 40, p. 793–797, 1987.
- OLTON, David S; SAMUELSON, Robert J. Remembrance of Places Passed : Spatial Memory in Rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, v. 2, n. 2, 1976.

- OSCAR-BERMAN, Marlene; MARINKOVIC, Ksenija. *Alcohol: Effects on Neurobehavioral Functions and the Brain Marlene*. [S.l.: s.n.], 2014. v. 17.
- OSIEZAGHA, Kenneth *et al.* Thiamine deficiency and delirium. *Innovations in Clinical Neuroscience*, v. 10, n. 4, p. 26–32, 2013.
- PANNUNZIO, Pierre *et al.* Thiamine Deficiency Results in Metabolic Acidosis and Energy Failure in Cerebellar Granule Cells : An In Vitro Model for the Study of Cell Death Mechanisms in Wernicke ' s Encephalopathy. v. 292, n. February, p. 286–292, 2000.
- PAOLETTI, Pierre; BELLONE, Camilla; ZHOU, Qiang. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties , synaptic plasticity and disease. *Nature reviews*, v. 14, n. June, p. 384–400, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3504>>.
- PAPA, Salvatore *et al.* Linking JNK signaling to NF- κ B : a key to survival. *journal of cell science*, v. 117, p. 5197–5208, 2004.
- PARRISH, Amanda B; FREEL, Christopher D; KORNBLUTH, Sally. Activation and Function. 2013.
- PASCAL, Rue Blake; CEDEX, Strashourg. Ethanol-Induced Cell Death in Cultured Rat Astroglia. v. 1, n. 2, p. 141–146, 1997.
- PATHWAY, A N Apaf--independent Intrinsic *et al.* Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 24, p. 21836–21842, 2002.
- PAULUS, Frieder M. *et al.* Association of rs1006737 in CACNA1C With Alterations in Prefrontal Activation and Fronto-Hippocampal Connectivity. *Human Brain Mapping*, v. 35, p. 1190–1200, 2014.
- PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press, Inc.*, p. 439, 1986.
- PENTNEY, Roberta J *et al.* The total numbers of cerebellar granule neurons in young and aged Fischer 344 and Wistar-Kyoto rats do not change as a result of lengthy ethanol treatment. p. 79–89, 2002.
- PEREIRA, Silvia R.C. *et al.* Chronic ethanol consumption impairs spatial remote memory in rats but does not affect cortical cholinergic parameters. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 60, n. 2, p. 305–311, 1998.
- PERES, L. a. B. *et al.* Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. *J. Bras. Nefrol.*, v. 30, n. 1, p. 48–53, 2008.
- PICKETT, Eleanor K. *et al.* Amyloid Beta and Tau Cooperate to Cause Reversible Behavioral and Transcriptional Deficits in a Model of Alzheimer ' s Disease. *Cell Reports*, v. 29, n. 11, p. 3592–3604.e5, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.044>>.
- PINTO, M C *et al.* Calcium signaling and cell proliferation. *Cell Signal*, v. 27, n. 11, p. 2139–2149, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26275497>.
- PINTO, Mauro Cunha Xavier *et al.* Calcium signaling and cell proliferation. *Cellular signalling*, v. 27, n. 11, p. 2139–49, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656815002375>>.

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

PIRES, Rita G.W. *et al.* The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 70, n. 2–3, p. 227–235, 2001.

PIRES, Rita G W *et al.* Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: A study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Behavioural Brain Research*, v. 162, n. 1, p. 11–21, 2005.

PÓVOA, Raner Miguel Ferreira. *ESTUDO COMPARATIVO DOS COMPORTAMENTOS EXPLORATÓRIOS, PREDATÓRIOS E AGONÍSTICOS DE RATOS WISTAR, SELVAGENS (Rattus norvegicus sp) E Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas MSc. Raner Miguel Ferreira Póvoa Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenb. 2007. 219 f. 2007.*

QUADROS, Elton. A questão da memória em Aristóteles e Agostinho: uma leitura a partir de Paul Ricoeur. *Scintilla*, v. 13, n. 2, p. 47–62, 2016.

QUARTERMAIN, David; GARCIA, Victoria; KWAN, Alice. Calcium Channel Antagonists Enhance Retention of Passive Avoidance and Maze Learning in Mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 75, p. 77–90, 2001.

RAPIZZI, Elena *et al.* Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *Journal of Cell Biology*, v. 159, n. 4, p. 613–624, 2002.

RESENDE, Letícia de Souza. PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA GRAVE DE TIAMINA. *Tese de doutorado*, p. 123, 2012.

RIBAS, Guilherme Carvalhal. As bases neuroanatômicas do comportamento: históricas e contribuições recentes. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 29, p. 63–71, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462007000100017&nrm=iso>.

RIEDL, Stefan J; SALVESEN, Guy S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Rev Immunol*, v. 8, n. May, p. 405–413, 2007.

RISS, Terry L *et al.* Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*, v. 114, n. 8, p. 785–796, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>>.

ROGAWSKI, Michael A. Revisiting AMPA Receptors as an Antiepileptic Drug Target. *Epilepsy Currents*, v. 11, n. 8, p. 56–63, 2011.

RONG, Yiping; DISTELHORST, Clark W. Bcl-2 Protein Family Members: Versatile Regulators of Calcium Signaling in Cell Survival and Apoptosis. *Annual Review of Physiology*, v. 70, n. 1, p. 73–91, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.021507.105852>>.

RUBINSZTEIN, David C. *et al.* Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*, v. 1, n. 1, p. 11–22, 2005.

RUBINSZTEIN, David C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in

neurodegeneration. *Nature*, v. 443, n. 7113, p. 780–786, 2006.

SAIKUMAR, Pothana *et al.* Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American journal of medicine*, v. 107, n. 5, p. 489–506, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934399002594>>.

SAMSON, Rachel D; BARNES, Carol A. Impact of aging brain circuits on cognition. *European Journal of Neuroscience*, v. 37, n. February, p. 1903–1915, 2013.

SAVAGE, L. M. Diencephalic Damage Decreases Hippocampal Acetylcholine Release During Spontaneous Alternation Testing. *Learning & Memory*, v. 10, n. 4, p. 242–246, 2003. Disponível em: <<http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.60003>>.

SAVAGE, Lisa M. *et al.* The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rat. *Behavioural Brain Research*, v. 82, n. 2, p. 133–147, 1997.

SAVAGE, Lisa M.; BUZZETTI, Robert A.; RAMIREZ, Donna R. The effects of hippocampal lesions on learning, memory, and reward expectancies. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 82, n. 2, p. 109–119, 2004.

SAVAGE, Lisa M.; HALL, Joseph M.; RESENDE, Letícia de Souza. Translational Rodent Models of Korsakoff Syndrome Reveal the Critical Neuroanatomical Substrates of Memory Dysfunction and Recovery. v. 22, n. 2, p. 195–209, 2012.

SAVAGE, Lisa M. Sustaining high acetylcholine levels in the frontal cortex, but not retrosplenial cortex, recovers spatial memory performance in a rodent model of diencephalic amnesia. *Behavioral neuroscience*, v. 126, n. 2, p. 226–36, 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3315061&tool=pmcentrez&render_type=abstract>.

SAVAGE, Lisa M; HALL, Joseph M; VETRENO, Ryan P. Anterior thalamic lesions alter both hippocampal-dependent behavior and hippocampal acetylcholine release in the rat. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, v. 18, n. 12, p. 751–8, 2011. Disponível em: <http://apps.webofknowledge.com.ezproxy.utu.fi:2048/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=5&SID=W2ED1QsHF5WWTLYkydC&page=1&doc=3>.

SECHI, Gianpietro; SERRA, Alessandro. Wernicke ' s encephalopathy : new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. *Lancet Neurol*, v. 6, n. May, p. 442–455, 2007.

SENA, Isabela Cristina. *Efeitos da deficiência de tiamina e do processo de aprendizagem espacial sobre parâmetros neuroquímicos e imunológicos do hipocampo e tálamo de camundongos Swiss*. 2019. 1-170 f. 2019.

SEOL, Dai-wu; BILLIAR, Timothy R. A Caspase-9 Variant Missing the Catalytic Site Is an Endogenous Inhibitor of Apoptosis *. v. 274, n. 4, p. 2072–2076, 1999.

SHAMAS-DIN, Aisha *et al.* BH3-only proteins : Orchestrators of apoptosis. *BBA - Molecular Cell Research*, v. 1813, n. 4, p. 508–520, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.024>>.

SHOSHAN-BARMATZ, Varda *et al.* Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1787, n. 5, p. 421–430, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.11.009>>.

SHOSHAN-BARMATZ, Varda *et al.* VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 31, n. 3, p. 227–285, 2010.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>>.

SHOSHAN-BARMATZ, Varda; BEN-HAIL, Danya. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion*, v. 12, n. 1, p. 24–34, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724911001826>>.

SINGLETON., Charles K.; MARTIN, Peter R. Molecular Mechanisms of Thiamine Utilization. *Current Molecular Medicine*, v. 1, n. 2, p. 197–207, 2001.

SINNEGGER-BRAUNS, Martina J *et al.* Expression and 1, 4-Dihydropyridine-Binding Properties of Brain L-Type Calcium Channel Isoforms. *Molecular Pharmacology*, v. 75, n. 2, p. 407–414, 2009.

SMEYNE, Richard J *et al.* Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*, v. 363, n. 6425, p. 166–169, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/363166a0>>.

SMOLKA, Ana Luiza Bustamante. A memória em questão: uma perspectiva histórico-cultural. *Educação & Sociedade*, v. 21, n. 71, p. 166–193, 2000.

SNIGDHA, Shikha *et al.* Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. v. 28, n. 1, p. 14–24, 2012.

SOLÁ, S *et al.* Conceitos gerais Necrose ou apoptose : quando e porquê ? 2001.

SOLÁ, Susana; MORGADO, Ana L.; RODRIGUES, Cecília M P. Death receptors and mitochondria: Two prime triggers of neural apoptosis and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1830, n. 1, p. 2160–2166, 2013.

SONG, Insuk; HUGANIR, Richard L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, v. 25, n. 11, p. 578–588, 2002.

SOUZA, Cheylla Fabricia M *et al.* A doença de Parkinson e o processo de envelhecimento motor: Uma revisão de literatura. *Rev. Neurociencia*, v. 19, n. 4, p. 718–723, 2011.

SPAETHLING, Jennifer M *et al.* Calcium-Permeable AMPA Receptors Appear in Cortical Neurons after Traumatic Mechanical Injury and Contribute to Neuronal Fate. v. 1216, n. October, p. 1207–1216, 2008.

SPELLMAN, Timothy *et al.* Hippocampal–prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature*, v. 522, n. 7556, p. 309–314, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature14445>>.

SQUIRE, Larry R; KNOWLTON, Barbara J. Memory, hippocampus, and brain systems. *The cognitive neurosciences*. Cambridge, MA, US: The MIT Press, 1995. p. 825–837.

SQUIRE, Larry R; ZOLA, Stuart M. Episodic Memory , Semantic Memory , and Amnesia. *hi*, v. 211, n. March, p. 205–211, 1998.

STRASSER, Andreas; JOST, Philipp J; NAGATA, Shigekazu. Review The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity*, v. 30, n. 2, p. 180–192, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.001>>.

STRIESSNIG, J *et al.* Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. *Biochemistry society transactions*, v. 34, p. 903–909, 2006.

SULLIVAN, Edith V.; PFEFFERBAUM, Adolf. Neuroimaging of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol and Alcoholism*, v. 44, n. 2, p. 155–165, 2009.

- SUZUKI, Takeshi *et al.* DNA Staining for Fluorescence and Laser Confocal Microscopy. *The Journal of Histochemistry & cytochemistry*, v. 45, n. 1, p. 49–53, 1997.
- SVEINBJORNSDOTTIR, Sigurlaug. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 139, p. 318–324, 2016.
- SWEATT, David. *Mechanism fo Memory*. [S.l: s.n.], 2003.
- TAIT, Stephen W G; GREEN, Douglas R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrm2952>>.
- TAN, Wenzhi; COLOMBINI, Marco. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1768, n. 10, p. 2510–2515, 2007.
- TAO, Xu *et al.* Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, v. 20, n. 4, p. 709–726, 1998.
- TEIXEIRA, Livia Clemente Motta. *Exercício físico , neurogênese e memória Exercise , neurogenesis and memory*. . [S.l: s.n.], 2013.
- TEMME, Stephanie J *et al.* Deletion of the Mouse Homolog of CACNA1C Disrupts Discrete Forms of Hippocampal- Dependent Memory and Neurogenesis within the Dentate Gyrus. v. 3, n. December, 2016.
- TERRY, Alvin V. Chapter 13 - Spatial navigation (water maze) tasks. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. [S.l: s.n.], 2009. p. 1–10.
- THIBAUT, Olivier; LANDFIELD, Philip W. Increase in Single L-Type Calcium Channels in Hippocampal Neurons During Aging. *Science*, v. 272, n. 5264, p. 1017–1020, 1996. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/272/5264/1017>>.
- THIES, William; BLEILER, Laura. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, v. 7, n. 2, p. 208–244, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2011.02.004>>.
- TODT, Franziska *et al.* Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *The EMBO Journal*, v. 34, n. 1, p. 67–80, 2015.
- TOOZE, Sharon A; YOSHIMORI, Tamotsu. The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology*, v. 12, n. 9, p. 831–835, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncb0910-831>>.
- TRETTNER, L; DAM-VIZI, V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 36, p. 7771–7778, 2004. Disponível em: <isi:000223779200001>.
- TSANOV, Marian *et al.* DIFFERENTIAL REGULATION OF SYNAPTIC PLASTICITY OF THE HIPPOCAMPAL AND THE HYPOTHALAMIC INPUTS TO THE ANTERIOR THALAMUS. *Hippocampus*, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2011.
- TSIEN, R W *et al.* Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends in Neurosciences*, v. 11, n. 10, p. 431–438, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166223688901944>>.
- TSIEN, Richard W; ELLINOR, Patrick T; HORNE, William A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 12, p. 349–354, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016561479190595J>>.

- TULVING, Endel. 1972 - Tulving - Episodic and semantic memory.pdf. *Organization of Memory*. [S.l: s.n.], 1972. .
- TURRIGIANO, Gina G.; NELSON, Sacha B. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 10, n. 3, p. 358–364, 2000.
- UPADHYAYA, Purna; SETH, Vikas; AHMAD, Mushtaq. Therapy of Alzheimer ' s disease : An update. v. 4, n. June, p. 408–421, 2010.
- VAN PRAAG, H; KEMPERMANN, G; GAGE, F H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, v. 2, n. 3, p. 266–270, 1999.
Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195220%255Cnhttp://www.nature.com/neuro/journal/v2/n3/pdf/nn0399_266.pdf>.
- VEDDER, Lindsey C. *et al.* Interactions Between Chronic Ethanol Consumption and Thiamine Deficiency on Neural Plasticity, Spatial Memory, and Cognitive Flexibility. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 39, n. 11, p. 2143–2153, 2015.
- VEDDER, Lindsey C; SAVAGE, Lisa M. BDNF regains function in hippocampal long-term potentiation deficits caused by diencephalic damage. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, v. 24, n. 2, p. 81–85, 2017.
- VELAITHAN, Rathiga *et al.* The small GTPase Rac1 is a novel binding partner of Bcl-2 and stabilizes its antiapoptotic activity. *Blood*, v. 117, n. 23, p. 6214–6226, 2011.
- VENG, Lone M; BROWNING, Michael D. Regionally selective alterations in expression of the $\alpha 1D$ subunit ($Ca_v1.3$) of L-type calcium channels in the hippocampus of aged rats. *Molecular Brain Research*, v. 107, p. 120–127, 2002.
- VIGIL, Fabio Ant?nio Borges *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.
- VILAR, Aline; NILS, Machado. *Treinamento em memória operacional espacial em ratos idosos: efeitos na ansiedade, habituação e densidade de células no hipocampo*. 2015. 88 f. 2015.
- VILLAS-BOAS, Cyrus Antônio. Avaliação comportamental e eletrofisiológica da atividade do córtex pré-frontal em processos de tomada de decisões em ratos rats. p. 161, 2014.
- VILLUNGER, Andreas *et al.* p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. *Science*, v. 302, n. 5647, p. 1036–1038, 2003. Disponível em:
<<https://science.sciencemag.org/content/302/5647/1036>>.
- VORHEES, Charles V; WILLIAMS, Michael T. Morris water maze: procedrues for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protocols*, v. 1, n. 2, p. 848–858, 2006a.
- VORHEES, Charles V; WILLIAMS, Michael T. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of Learning and Memory. *Nat Protocols*, v. 1, n. 2, p. 848–858, 2006b.
- WALLACH, David; KANG, Tae-bong; KOVALENKO, Andrew. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *NATURE REVIEWS / IMMUNOLOGY*, 2014.
- WANG, Kun. BID : a novel BH3 domain-only death agonist. p. 2859–2869, 1996.
- WANG, Lai; DU, Fenghe; WANG, Xiaodong. TNF- α Induces Two Distinct Caspase-8

- Activation Pathways. *Cell*, v. 133, n. 4, p. 693–703, 2008.
- WARD, Roberta J; WITTE, Philippe De. Biochemical and Neurotransmitter Changes Implicated in Alcohol-Induced Brain Damage in Chronic or ‘ Binge Drinking ’ Alcohol Abuse. v. 44, n. 2, p. 128–135, 2009.
- WEISS, Norbert; ZAMPONI, Gerald W. Trafficking of neuronal calcium channels. v. 0, p. 1–16, 2017.
- WHALLEY, Katherine. Balancing LTP and LTD. *Nature Reviews Neurology*, v. 8, n. April, p. 2123, 2007.
- WHITE, Jessica A *et al.* Conditional forebrain deletion of the L-type calcium channel Ca V 1 . 2 disrupts remote spatial memories in mice. p. 1–5, 2008.
- WILKINS, Heather M. *et al.* Mitochondria-derived damage-associated molecular patterns in neurodegeneration. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. APR, p. 1–12, 2017.
- WONGWITDECHA, Noppamars; MARSDEN, Charles Alexander. Effects of social isolation rearing on learning in the Morris water maze. *Brain Research*, v. 715, n. 1–2, p. 119–124, 1996.
- WU, J. *et al.* Mitochondria and calpains mediate caspase-dependent apoptosis induced by doxycycline in HeLa cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, n. 7–8, p. 949–957, 2006.
- XIA, Jun *et al.* Cerebellar Long-Term Depression Requires PKC-Regulated Interactions between GluR2 / 3 and PDZ Domain – Containing Proteins. v. 28, p. 499–510, 2000.
- XIA, Mi *et al.* Information transmission in HPC-PFC network for spatial working memory in rat. *Behavioural Brain Research*, v. 356, n. August 2018, p. 170–178, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.024>>.
- YAHIA, Marzougui *et al.* Wernicke’s encephalopathy: A rare complication of hyperemesis gravidarum. *Anaesth Crit. Care Pain Med*, v. 34, n. 1, p. 173–177, 2015.
- YAN, Xiaodong *et al.* CaMKII-Mediated CREB phosphorylation is involved in Ca²⁺-Induced BDNF mRNA transcription and neurite outgrowth promoted by electrical stimulation. *PLoS ONE*, v. 11, n. 9, p. 1–22, 2016.
- YEAMAN, Stephen J. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes : recent advances. *Biochem. J.*, v. 257, p. 625–632, 1989.
- YOUNG, Chainllie *et al.* Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, v. 20, n. 2, p. 608–614, 2005.
- YUAN, Junying; NAJAFOV, Ayaz; PY, Benedicte F. Roles of Caspases in Necrotic Cell Death. *Cell*, v. 167, p. 1693–1704, 2016.
- ZAHR, Natalie M *et al.* Associations between in vivo neuroimaging and postmortem brain cytokine markers in a rodent model of Wernicke ’ s encephalopathy. *Experimental Neurology*, v. 261, p. 109–119, 2014.
- ZAMPONI, Gerald W *et al.* The Physiology , Pathology , and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacological reviews*, v. 67, p. 821–870, 2015.
- ZHANG, Ling *et al.* Calcium-related signaling pathways contributed to dopamine-induced cortical neuron apoptosis. *Neurochemistry International*, v. 58, n. 3, p. 281–294, 2011.

ZHANG, Qiumei *et al.* The Effects of CACNA1C Gene Polymorphism on Spatial Working Memory in Both Healthy Controls and Patients with Schizophrenia or Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, p. 677–684, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2011.242>>.

ZHANG, Shu X *et al.* Excitotoxic Cytopathology, Progression, and Reversibility of Thiamine Deficiency-induced Diencephalic Lesions. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 54, n. 2, p. 255–267, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/00005072-199503000-00012>>.

ZHANG, Yi *et al.* Mutations in High-Voltage-Activated Calcium Channel Genes Stimulate Low-Voltage-Activated Currents in Mouse Thalamic Relay Neurons. v. 22, n. 15, p. 6362–6371, 2002.

ZHAO, Yan *et al.* Architecture and subunit arrangement of native AMPA receptors elucidated by cryo-EM. *Science*, v. 364, n. 6438, p. 355–362, 2019. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/364/6438/355>>.

ZHIVOTOVSKY, Boris *et al.* Caspases : their intracellular localization and translocation during apoptosis. p. 644–651, 1999.

ZIPFEL, GREGORY J *et al.* Neuronal Apoptosis After CNS Injury: The Roles of Glutamate and Calcium. *Journal of Neurotrauma*, v. 17, n. 10, p. 857–869, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/neu.2000.17.857>>.

ZUBARAN, C; FERNANDES, JG; RODNIGHT, R. Wernicke-Korsakoff syndrome. *The Fellowship of Postgraduate Medicine*, v. 73, n. 1, p. 27–31, 1997.

ZUBARAN, Carlos *et al.* Aspectos clínicos e neuropatológicos da síndrome de Wernicke-Korsakoff Clinical and neuropathological aspects of Wernicke-Korsakoff syndrome. *Rev. Saúde Pública*, v. 5, n. 306, p. 602–8, 1995.

13. ANEXOS

12.1. Certificado do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos da deficiência de tiamina sobre os níveis de suas isoformas fosforiladas e sobre o metabolismo de cálcio no cérebro de ratos Wistar e as relações desses fatores com a viabilidade celular e aspectos cognitivos", protocolo do CEUA: 288/2016 sob a responsabilidade de Angela Maria Ribeiro que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/05/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	14/11/2016 a 28/02/2019
*Espécie/linhagem	Rato isogênico581
Nº de animais	15
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato isogênico582
Nº de animais	15
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Considerações posteriores:

08/05/2017	Aprovado na reunião do dia 08/05/2017. Validade: 08/05/2017 à 07/05/2022
------------	--

Belo Horizonte, 12/05/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

13.2. Tabelas (I, II e III) com composição dos nutrientes da ração sem tiamina

Tabela I: Composição dos nutrientes da ração sem tiamina

Nutrientes	% / kg
Amido de Milho	45,05
Polvilho Azedo	22,52
Caseína*	19,99
Óleo de Soja	5,00
Mistura de Sais**	5,00
Mistura de Vitaminas***	1,00
Celulose	1,00
Colina-HCl	0,40
Tocoferol (vitamina E)	0,04
BHT (conservante)	0,01

*A Caseína utilizada foi autoclavada, seca e triturada antes do uso.

** Mistura de Sais conforme Tabela II.

*** Mistura de Vitaminas conforme Tabela III.

Tabela II: Composição da Mistura de sais minerais

Sais minerais	% por mistura
NaCl	13,93
KI	0,08
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,73
CaCO ₃	38,14
MnSO ₄ .H ₂ O	0,40
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,70
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02
KH ₂ PO ₄	38,90

Tabela III: Composição da Mistura de vitaminas, sem tiamina:

Vitaminas	% por mistura
Acetato de Retinol	0,4000
Colecalciferol	0,0600
Menadiona	0,0500
i-Inositol	1,0000
Niacina	0,4000
Pantotenato de Cálcio	0,4000
Riboflavina	0,0800
Tiamina-HCl*	-
Piridoxina-HCl	0,0500
Ácido fólico	0,0200
Biotina	0,0040
Vitamina B12	0,0003
Sacarose	97,4900

* Não adicionada à ração

13.3. Composição ração comercial sem tiamina (Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, IN), Estados Unidos.

Teklad Custom Diet

TD.81029

Thiamin Deficient Diet

++++
ENVIGO

Formula	g/Kg
Casein, "Vitamin-Free" Test	191.2
DL-Methionine	3.0
Sucrose	518.6068
Corn Starch	150.0
Corn Oil	50.0
Cellulose	50.0
Mineral Mix, AIN-76 (170915)	35.0
Choline Bitartrate	2.0
Riboflavin	0.006
Pyridoxine HCl	0.007
Niacin	0.03
Calcium Pantothenate	0.016
Folic Acid	0.002
Biotin	0.0002
Vitamin B ₁₂ (0.1% in mannitol)	0.01
Vitamin A Palmitate (500,000 IU/g)	0.008
Vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500 IU/g)	0.1
Vitamin K, MSB complex	0.0015
Vitamin D ₃ , cholecalciferol (400,000 IU/g in sucrose)	0.0025
Ethoxyquin, antioxidant	0.01

*Free
1/18/19*

Key Features

- + Purified Diet
- + Thiamin
- + Alcohol-Extracted Casein
- + Rodent

Key Planning Information

- + Products are made fresh to order
- + Store product at 4°C or lower
- + Use within 6 months (applicable to most diets)
- + Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- + Replace diet at minimum once per week
 - More frequent replacement may be advised
- + Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- + 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- + Minimum order 3 Kg
- + Irradiation not advised
 - Contact a nutritionist for recommendations

Footnote

This formula is a modification of AIN-76A. Vitamin-Free Test Casein (alcohol-extracted) is used to further limit vitamin contribution from the protein source. Background thiamin levels are below the limit of detection (<0.5 ppm).

Options (fees will apply)

- + Rush order (pending availability)
- + Irradiation (see Product Specific Information)
- + Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	17.5	18.5
Carbohydrate	65.8	69.6
Fat	5.0	11.9
Kcal/g	3.8	

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Contact Us

Obtain pricing · Check order status

- + teklad@envigo.com
- + (800) 483-5523



Speak With A Nutritionist

- + (800) 483-5523
- + askanutritionist@envigo.com

Teklad diets are designed & manufactured for research purposes only.

International Inquiry (outside USA or Canada)

- + askanutritionist@envigo.com

Place Your Order (USA & Canada)

Please Choose One

- + envigo.com/teklad-orders
- + tekladorders@envigo.com
- + (800) 483-5523
- + (608) 277-2066 facsimile

13.4. Variáveis analisadas através de ANOVA – one way: simulações realizadas com o propósito de obter mais informações, a serem posteriormente avaliadas (Discussão).

Como mencionado nas **Notas I e II**, apresentadas na seção de “Resultados”, os dados obtidos no Exp. VI, da “Expressão gênica” de componentes relacionados à morte celular foram analisados utilizando ANOVA-*one way*. Com a finalidade de também discutir os dados obtidos sobre (i) níveis de cálcio livre e (ii) viabilidade celular- IP-Calceína, usando uma análise ANOVA *one way*, decidimos também avaliar esses dados através deste modelo estatístico. Os resultados estão apresentados abaixo na seguinte ordem:

- (i) níveis de cálcio
- (ii) viabilidade celular- calceína e IP

(i) Níveis de cálcio livre

O processamento das amostras (Exps. I, II e III) envolveu a utilização do agente desnaturante TCA a 10 % e, sabe-se que o uso deste reagente químico libera e solubiliza os íons cálcio associados às proteínas, possibilitando sua quantificação na solução aquosa. O conhecimento dos efeitos da DT sobre os níveis desse íon nos diferentes tecidos (CPF, H e T) pode contribuir para o entendimento dos mecanismos relacionados aos efeitos distintos da deficiência nesses tecidos. Essa ideia foi sustentada por conhecimentos prévios sobre o envolvimento do cálcio em uma das vias de morte celular.

Os dados das concentrações de cálcio livre em amostras do CPF, H e T, foram analisados por método multicomparativo, ANOVA-*one way*, em animais dos grupos DT e CP.

CPF: ANOVA mostrou efeito significativo dos tratamentos ($F_{(3,36)}=8,63$ $P=0,0002$). Testes *post hoc* (Fisher), comparando os grupos com o grupo controle pareado, CP (0,2456 +/- 0,04) ug/mg tecido), tem-se: versus DT (T1) (0,498 +/- 0,11), $p=0,043$; versus DT (T2) (0,640 +/- 0,014), $p=0,0002$ e versus DT- (T6) (0,190 +/- 0,013), $p=0,50$. Esses resultados indicam que a DT aumentam de forma significativa os níveis de cálcio nos estágios intermediário (10^o dia do episódio de DT, ~200%) e no estágio grave, sem período de recuperação (14^o dia do episódio de DT, 262%). Por outro lado, após período de recuperação (T6), não se observa efeito da DT sobre os níveis de cálcio no CPF. **(Figura 39 – Painel A).**

Hipocampo: ANOVA mostrou efeito significativo dos tratamentos ($F_{(3,30)}=3,30$ $P=0,033$). Testes *post hoc* (Fisher), comparando os grupos com o grupo controle pareado, CP (0,14 +/- 0,02) ug/mg tecido), tem-se: versus DT (T1) (0,13 +/- 0,02), $p=0,89$; versus DT (T2)(0,17 +/- 0,03), $p=0,75$ e versus DT (T6) (0,34 +/- 0,09), $p=0,006$. Esses resultados indicam que a DT não afeta de forma significativa os níveis de cálcio nos estágios intermediário e grave da deficiência. No entanto, os animais que foram submetidos à tarefa cognitiva (T6) apresentaram um aumento significativo de 230% em relação ao grupo CP. **(Figura 39 – Painel B).**

Tálamo: ANOVA mostrou efeito significativo dos tratamentos ($F_{(3,30)}=3,63$ $P=0,024$). Testes *post hoc* (Fisher), comparando os grupos com o grupo controle pareado, CP (0,47 +/- 0,10) ug/mg tecido), tem-se: versus DT (T1) (0,13 +/- 0,08), $p=0,56$; versus DT (T2) (0,31 +/- 0,06), $p=0,73$ e versus DT (T6) (1,75 +/- 0,73), $p=0,009$. Esses resultados indicam que a DT, de forma similar ao encontrado no hipocampo, não afeta de forma significativa os níveis de cálcio nos estágios

intermediário e grave da deficiência. No entanto, os animais que foram submetidos à tarefa cognitiva (T6) apresentaram um aumento significativo de 360% em relação ao grupo CP. (Figura 39 – Painel C).

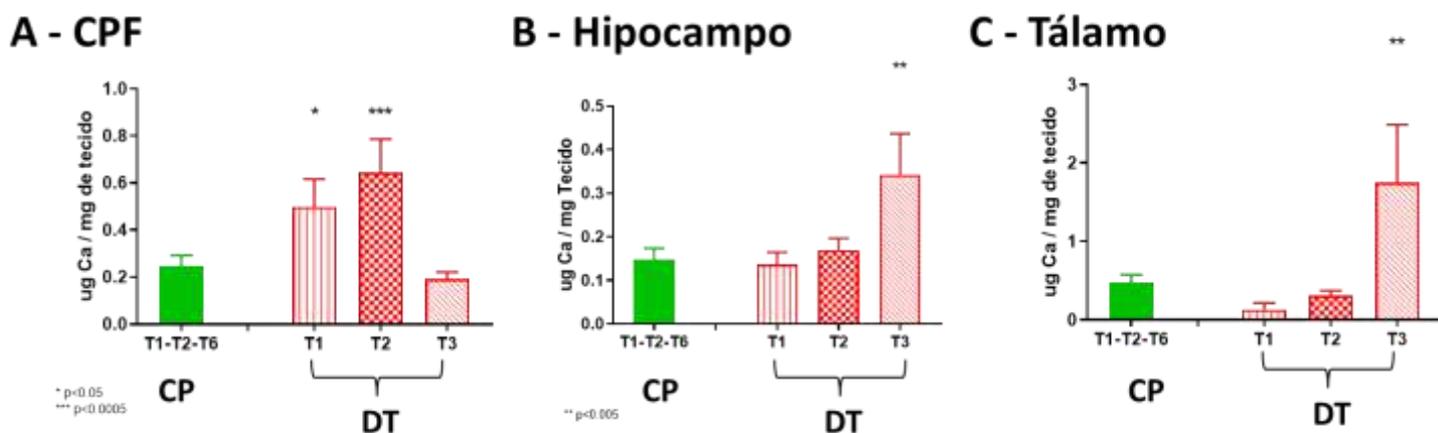


Figura 39: Níveis de cálcio livre (Média +/- SEM, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) no meio extracelular + citosol, em amostras do CPF, Hipocampo e Tálamo.

As amostras foram obtidas em dois estágios clínicos distintos: DT (T1) e DT (T2) 4h após o aparecimento dos sinais neurológicos, submetido ao LAM (DT tempo T6) e nos animais do grupo controle pareado (CP).

Grupo CP: CPF, n=15, Hipocampo, n=15; e Tálamo, n=15.

DT tempo T1: CPF, n=4, Hipocampo, n=4; e Tálamo, n=4;

DT tempo T2: CPF, n=7, Hipocampo, n=7; e Tálamo, n=7;

DT tempo T6: CPF, n=14, Hipocampo, n=8; e Tálamo, n=8.

(ii) Ensaio de Viabilidade celular – Calceína e Iodeto de Propídio

A viabilidade celular, avaliada através do método de marcação com fluoróforo (Calceína-Am e Iodeto de Propídio - IP) foi realizada em amostras do CPF, H e T, obtidas dos animais dos grupos CP e DT coletados nos tempos T2 (**ultimo dia do episódio de DT**) e T6 (**período de recuperação/LAM**). Os dados foram analisados por método multicomparativo, ANOVA-one way, em animais dos grupos CP-T2, CP-T6, DT-T2 e DT-T6.

CPF: ANOVA *one way* mostrou efeito significativo dos tratamentos [$F_{(2,27)}=3,432$ $P=0,0470$]. Testes *post hoc* (Fisher), comparando os grupos com o grupo controle pareado, CP (97,23% +/- 7,4), tem-se: versus DT no tempo T2 (158,7% +/- 20,95), $p=0,0323$; versus DT no tempo T6 (149,4% +/- 34,17), $p=0,0551$. Esses resultados indicam que a DT aumenta de forma significativa a marcação com o fluoróforo IP no estágio graves (14^o dia do episódio de DT, ~60%) e apresenta uma tendência no estágio grave após período de recuperação e LAM (52^o dia do tratamento, 50%). Uma análise mais cuidadosa dos dados indica uma distribuição homogênea entre os indivíduos do grupo CP. Enquanto os animais dos grupos DTs foram observados uma variabilidade em torno da média. Tais dados reforçam a variabilidade individual já observada em outros estudos com deficiência de tiamina (**Figura 40**).

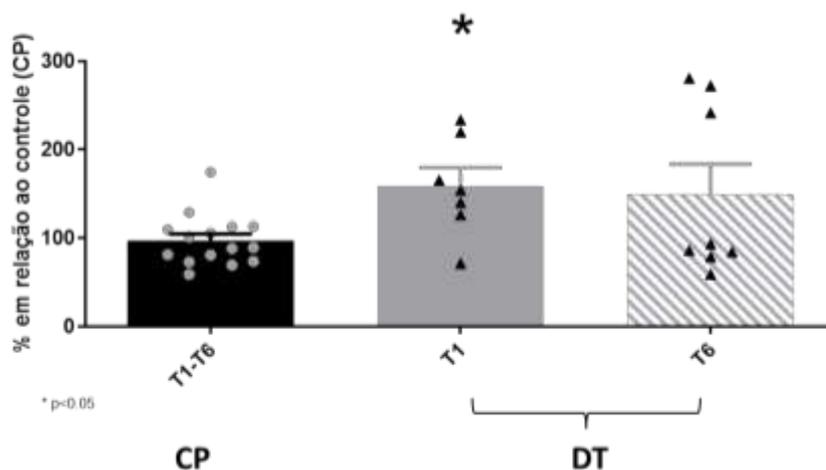


Figura 40: Dados quantitativos dos resultados obtidos com a marcação com IP e Calceína, em amostras do CPF dos animais dos grupos DT e CP (Controle Pareado). Percentual (Média +/- SEM) da intensidade de pixels da marcação com IP e Calceína em relação ao grupo controle CP=100%. Barra cinza= DT, estágio T2 e Barra com listras diagonais= DT, estágio T6. Círculos cinza indicam valores de indivíduos do grupo CP e triângulos pretos indivíduos dos grupos DTs. Tamanho das amostras: CP, n=15; DT (T2), n=7 e DT (T6), n=8.

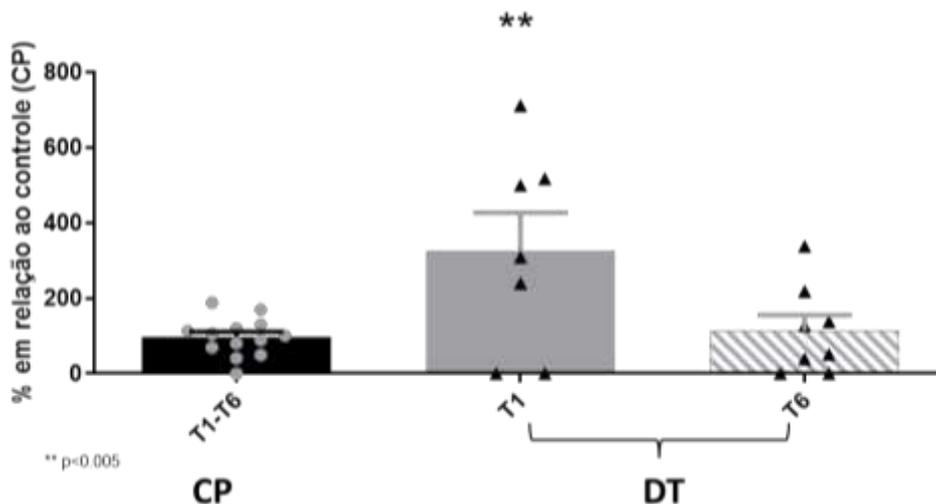
Hipocampo:

CA3: ANOVA mostrou efeito significativo dos tratamentos $F_{(2,25)}=5,763$ $P=0,0087$. Testes *post hoc* (Fisher), comparando os grupos com o grupo controle pareado, CP (96,83% +/- 14,21), tem-se: versus DT no tempo T2 (325,20 +/- 101,8), $p=0,0033$; versus DT no tempo T6 (113,9% +/- 41,66), $p=0,803$. Esses resultados indicam que a DT afeta de forma significativa a marcação com o fluoróforo IP no estágio grave da deficiência (14º dia do episódio de DT) retornando às porcentagens compatíveis com o grupo CP após 4 semanas de recuperação e LAM.

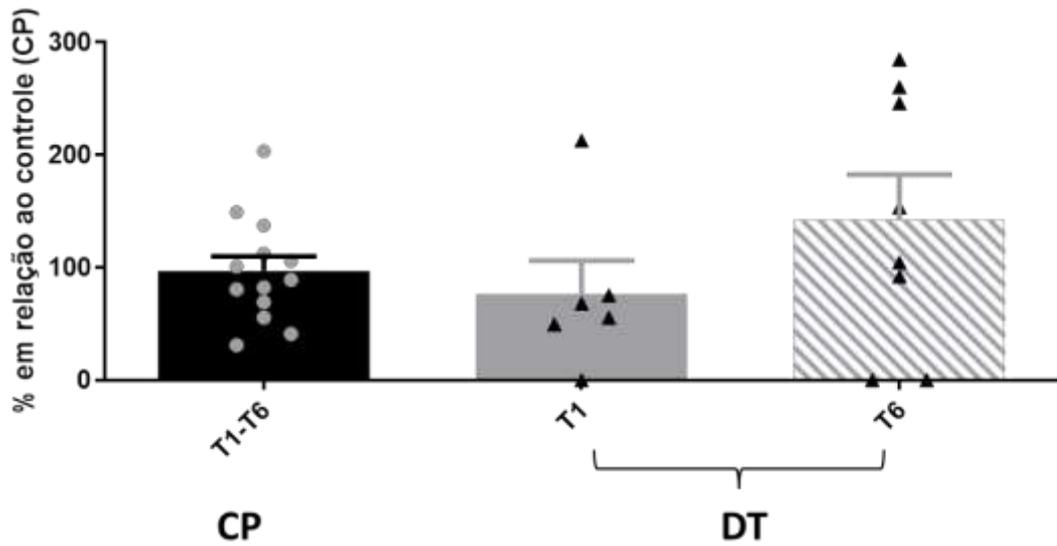
CA1: ANOVA não mostrou efeito significativo dos tratamentos $F_{(2,23)}=2,622$ $P=0,0942$.

GD: ANOVA mostrou efeito significativo dos tratamentos $F_{(2,25)}=4,592$ $P=0,0200$. Testes *post hoc* (Fisher), comparando os grupos com o grupo controle pareado, CP (97,03% +/- 12,60), tem-se: versus DT no tempo T2 (275,10 +/- 102,0), $p=0,0076$; versus DT no tempo T6 (105,0% +/- 30,86), ($p=0,8873$). Esses resultados indicam que a DT afeta de forma significativa a marcação com o fluoróforo IP no estágio grave da deficiência (14º dia do episódio de DT) a sub-região GD retornando às porcentagens compatíveis com o grupo CP após 4 semanas de recuperação e LAM. (**Figura 41**).

CA3



CA1



GD

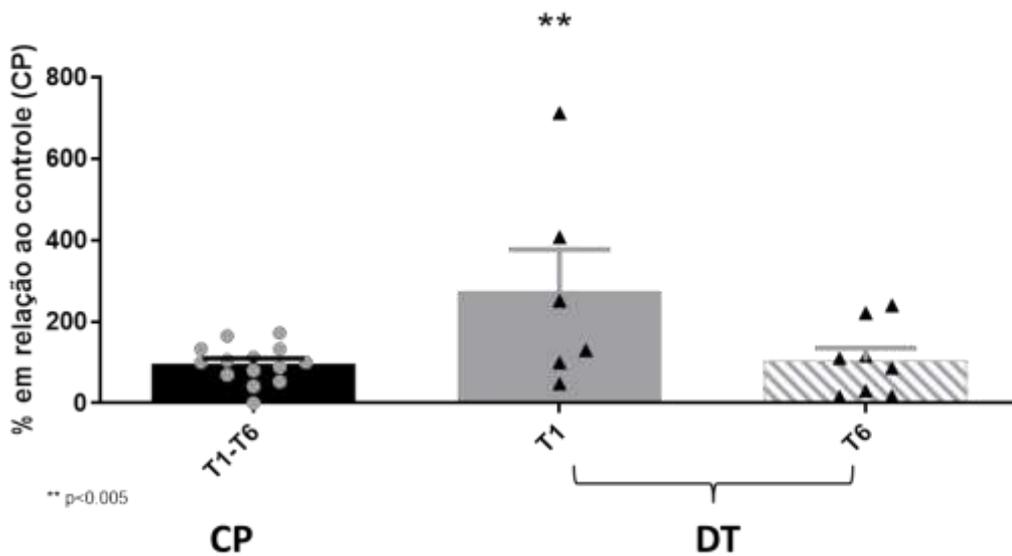


Figura 41: Dados quantitativos dos resultados obtidos com a marcação com IP e Calceína, em amostras do Hipocampo dos animais dos grupos DT e CP (Controle Pareado).

Percentual (Média +/- SEM) da intensidade de pixels da marcação com IP e Calceína em relação ao grupo controle CP=100%. Barra cinza= DT, estágio T2 e Barra com listras diagonais= DT, estágio T6. Círculos cinza indicam valores de indivíduos do grupo CP e triângulos pretos indivíduos dos grupos DTs.

CA3 [n=13 (CP); n=7 (DT - T2); n=8 (DT - T6), ** p=0,0033 (*Post hoc* Fisher);

CA1 [n=13 (CP); n=5 (DT - T2); n=8 (DT - T6)];

GD [n=14 (CP); n=6 (DT - T2); n=8 (DT - T6)] ** p=0,0076 (*Post hoc* Fisher).

Tálamo: ANOVA não mostrou efeito significativo dos tratamentos ($F_{(2,27)}=1,306$ $P=0,2875$), mesmo com aumento de 35% e 39% respectivamente para os grupos DT nos tempos T2 e T6. Contudo devemos levar em consideração a variabilidade dos indivíduos para esta região já característica pelos efeitos do tratamento da deficiência de tiamina (**Figura 42**).

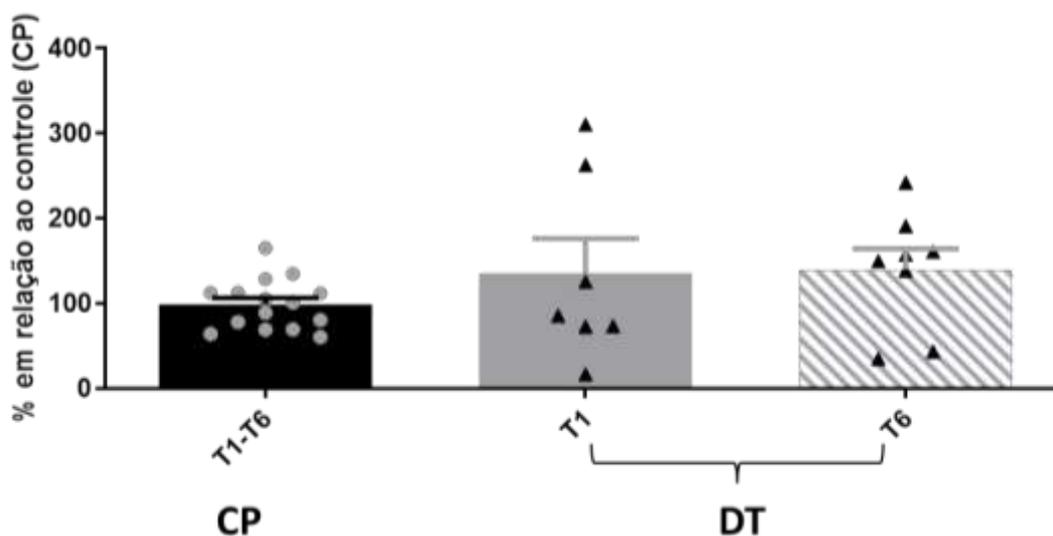


Figura 42: Dados quantitativos dos resultados obtidos com a marcação com IP e Calceína, em amostras do Tálamo dos animais dos grupos DT e CP (Controle Pareado).

Percentual (Média +/- SEM) da intensidade de pixels da marcação com IP e Calceína em relação ao grupo controle CP=100%. Barra cinza= DT, estágio T2 e Barra com listras diagonais= DT, estágio T6. Círculos cinza indicam valores de indivíduos do grupo CP e triângulos pretos indivíduos dos grupos. [n=15 (CP); n=7 DT (T2); n=8 DT (T6)].

13.5. Curvas de Aprendizagem e Memória Espacial Operacional e de Referência, dos animais dos grupos CP linhagem *Wistar* e *Sprague Dawley*.

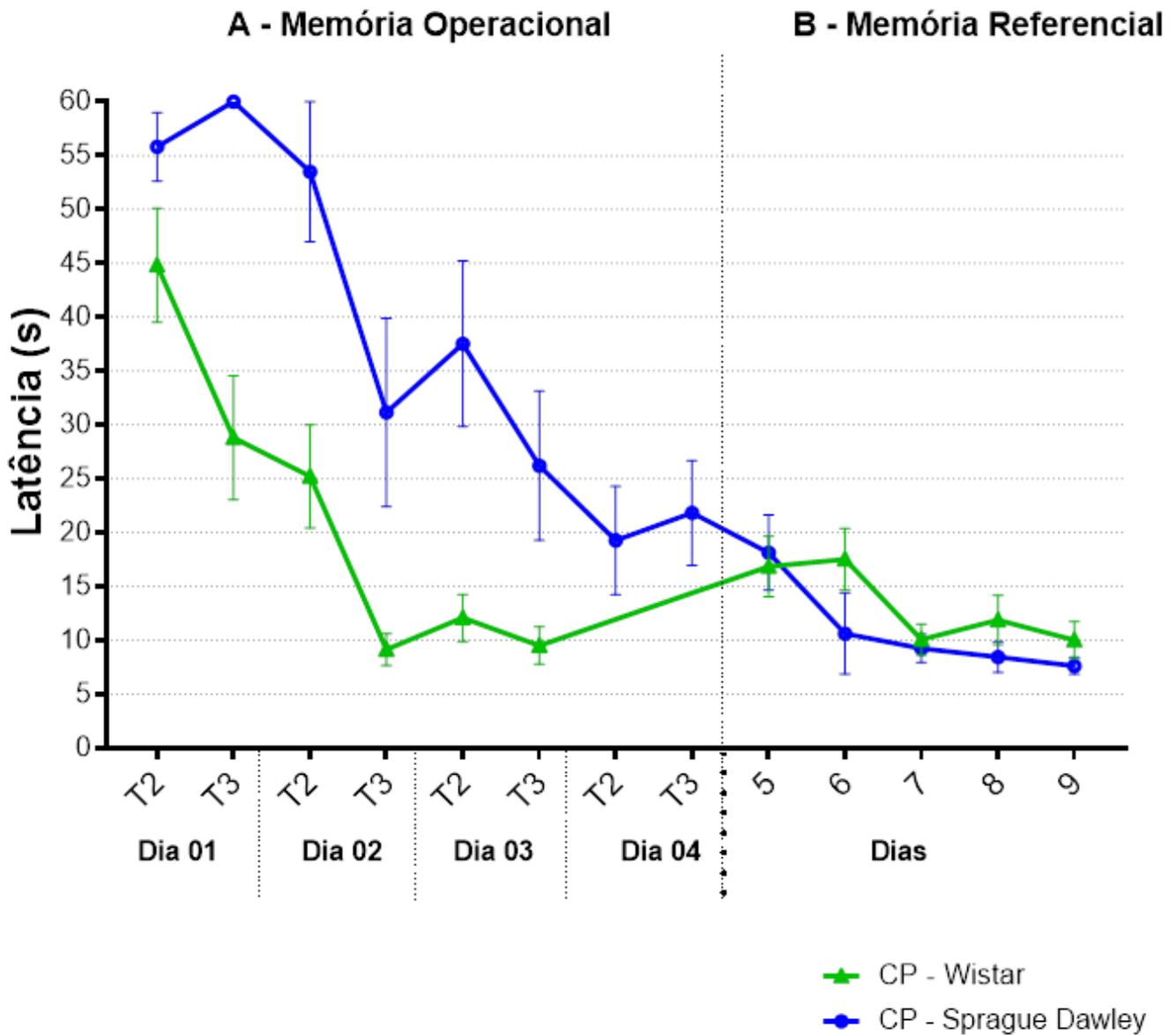


Figura 43: Curvas de Aprendizagem e Memória Espacial Operacional e de Referência, expressos como latência para encontrar a plataforma.

Aprendizado e Memória operacional: 3 dias (*Wistar*) e 4 dias (*Sprague Dawley*), sendo expressos apenas as tentativas (T2 e T3) por sessão. A 1ª tentativa referente ao aprendizado da nova posição da plataforma em cada sessão não foi mostrada.

Aprendizado e Memória de Referência: 5º dia até o 9º dia. O desempenho é expresso como a mediana de 4 tentativas por sessão.