

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Larissa M. G. Cassiano

**NEUROINFLAMAÇÃO, METABOLISMO ENERGÉTICO E REPROGRAMAÇÃO
EPIGENÉTICA NA NEURORREGENERAÇÃO HIPOCAMPAL EM MODELO *EX*
VIVO DE DEFICIÊNCIA DE TIAMINA**

Belo Horizonte
2020

Larissa M. G. Cassiano

**NEUROINFLAMAÇÃO, METABOLISMO ENERGÉTICO E REPROGRAMAÇÃO
EPIGENÉTICA NA NEURORREGENERAÇÃO HIPOCAMPAL EM MODELO *EX*
VIVO DE DEFICIÊNCIA DE TIAMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Orientação: Dr. Roney Santos Coimbra

Belo Horizonte

2020

043

Cassiano, Larissa Marcely Gomes.

Neuroinflamação, metabolismo energético e reprogramação epigenética na neuroregeneração hipocampal em modelo *ex vivo* de deficiência de tiamina [manuscrito] / Larissa Marcely Gomes Cassiano. - 2020.

109 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Roney Santos Coimbra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Deficiência de Tiamina. 3. Hipocampo. 4. Neurogênese. I. Coimbra, Roney Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Neuroinflamação, metabolismo energético e reprogramação epigenética na neuroregeneração hipocampal em modelo ex vivo de deficiência de tiamina

LARISSA MARCELY GOMES CASSIANO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

Aprovada em 25 de setembro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

UFOP

Prof(a). Vinicius de Toledo Ribas

UFMG

Prof(a). Roney Santos Coimbra - - Orientador

Fundação Oswaldo Cruz- René Rachou

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, Usuário Externo**, em 25/09/2020, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius de Toledo Ribas, Professor do Magistério Superior**, em 25/09/2020, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roney Santos Coimbra, Usuário Externo**, em 29/09/2020, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno Machado Dias, Secretário(a)**, em 06/10/2020, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0211372** e o código CRC **9659047C**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA

LARISSA MARCELY GOMES CASSIANO

Realizou-se, no dia 25 de setembro de 2020, às 14:00 horas, Google Meet (meet.google.com/yzd-bpix-fjc), da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Neuroinflamação, metabolismo energético e reprogramação epigenética na neuroregeneração hipocampal em modelo ex vivo de deficiência de tiamina*, apresentada por LARISSA MARCELY GOMES CASSIANO, número de registro 2019717969, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Roney Santos Coimbra - Orientador (Fundação Oswaldo Cruz- René Rachou), Prof(a). Vinicius de Toledo Ribas (UFMG), Prof(a). Rodrigo Cunha Alvim de Menezes (Universidade Federal de Ouro Preto).

A Comissão considerou a dissertação: Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão. Belo Horizonte, 25 de setembro de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)

Prof(a). Roney Santos Coimbra (Doutor)

Prof(a). Vinicius de Toledo Ribas (Doutor)

Prof(a). Rodrigo Cunha Alvim de Menezes (Doutor)



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, Usuário Externo**, em 25/09/2020, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius de Toledo Ribas, Professor do Magistério Superior**, em 25/09/2020, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roney Santos Coimbra, Usuário Externo**, em 29/09/2020, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno Machado Dias, Secretário(a)**, em 06/10/2020, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0211033** e o código CRC **D3942630**.

COLABORADORES

Plataforma de sequenciamento NGS (*Next Generation Sequencing*) (P01-007),
Instituto René Rachou;

Plataforma de Bioinformática (P08-002), Instituto René Rachou;

Plataforma de Microscopia e Microanálise de Imagens (P05-008), Instituto René
Rachou;

Plataforma de PCR em Tempo Real (P04-006), Instituto René Rachou.

Para todas as meninas que desejam conquistar o mundo;

Para todas as mulheres sensacionais que me inspiram a batalhar incansavelmente por dias melhores;

E finalmente, para a Larissa de 13 anos atrás... você está conseguindo, garota!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Dr. Roney Coimbra, pela confiança, apoio e por toda sua sapiência, que me inspira diariamente a evoluir como profissional;

Aos meus colegas de equipe, Marina Oliveira e Daniel Guerra, pelo companheirismo e suporte;

À Professora Ângela Ribeiro, que nos incentivou a iniciarmos este projeto na Fiocruz Minas;

Aos meus pais e familiares, por me proporcionarem o privilégio de ser a primeira mulher da família a cursar uma pós-graduação;

Aos meus amigos (e irmãos), Leonardo e Edilson, pelo apoio incondicional e por serem meu porto seguro nos momentos mais difíceis;

À Fiocruz Minas, em especial aos profissionais das Plataformas Tecnológicas: Anna Salim, Fabiano Pais, Gabriel Fernandes, Camila Carvalho e Viviane Cristina; também aos membros do grupo de Imunopatologia, por todo conhecimento e experiência compartilhados;

Aos membros da banca pelo aceite do convite de participação, e pelas sugestões e críticas.

Muito obrigada!

RESUMO

Introdução: A tiamina (vitamina B1) é cofator de enzimas do metabolismo energético central e sua deficiência (DT) compromete a fosforilação oxidativa, aumenta o estresse oxidativo e ativa processos inflamatórios que podem levar à neurodegeneração. A síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK) é uma manifestação da DT crônica, que leva à uma extensiva morte neuronal, e está associada a distúrbios neuropatológicos, incluindo déficits cognitivos e amnésia. O hipocampo é uma das áreas cerebrais mais afetadas pela SWK. A reposição de tiamina pode não ser suficiente para prevenir o déficit cognitivo irreversível associado à SWK.

Materiais e métodos: Foi desenvolvido um modelo de cultura organotípica de fatias de hipocampo (COH) para investigar os mecanismos moleculares subjacentes ao desequilíbrio entre morte neuronal e neurogênese associadas à DT. Os principais efeitos da privação de tiamina nas COHs foram avaliados por imunofluorescência e microscopia confocal e análise do transcriptoma.

Resultados: Nas COHs cultivadas sem tiamina, foi observada uma redução significativa na densidade neuronal após cinco dias e, no sétimo dia, as marcas epigenéticas associadas à modulação do estado da cromatina, H3K4me3 e H3K9me3, apresentavam-se alteradas em neurônios maduros, favorecendo a transcrição gênica. Surpreendentemente, entre o sétimo e o décimo quarto dia de cultivo sem tiamina, foi observado um pulso de neurogênese seguido de nova perda massiva de neurônios. O contraste entre os transcriptomas de COHs cultivadas com ou sem tiamina por nove dias revelou 89 genes diferencialmente expressos. Análises de enriquecimento funcional evidenciaram o aumento da expressão de genes das vias KEGG do metabolismo de triptofano e degradação de lisina e de genes com anotações *Gene Ontology* (GO) relacionadas à organização da matriz extracelular, adesão celular e regulação positiva da transmissão sináptica. Vários genes das vias de sinalização de TNF e FoxO e genes com anotações GO relacionadas à resposta inflamatória estavam inibidos. A ativação de *Nsd1*, cujo produto metila a histona H3 na lisina 36, também foi observada no grupo DT. O aumento de H3K36me3 em neurônios foi confirmado por imunofluorescência. Finalmente, o tratamento das COHs em privação de tiamina com anti-inflamatório foi eficaz para a antecipação do pulso de neurogênese, demonstrando o papel

fundamental da resposta imune na regulação da neurogênese hipocampal durante a DT.

Conclusão: A regulação positiva de genes das vias relacionadas à síntese de acetil-CoA a partir de aminoácidos sugere uma adaptação metabólica capaz de permitir que células progenitoras neurais utilizem a fosforilação oxidativa como fonte de energia para a neurogênese. O conjunto de genes diferencialmente expressos no nono dia de privação de tiamina aponta para uma programação genética favorável à maturação dos neurônios e a regulação negativa da neurogênese mediada pela marca H3K36me3 em neurônios já diferenciados. Sobretudo, a redução da expressão de genes inflamatórios antes do repovoamento das COHs com novos neurônios sugere uma relação causal, que é apoiada por estudos anteriores relatando a inflamação como um fator supressor da neurogênese. Portanto, a neuroinflamação parece ser crucial na neurodegeneração associada à DT, podendo ter um papel também na fisiopatologia da SWK.

Palavras-chave: Deficiência de Tiamina. Cultura Organotípica de Hipocampo. Neurogênese. Neuroinflamação. Neurodegeneração. Neurorregeneração.

ABSTRACT

Introduction: Thiamine (vitamin B1) is a cofactor for enzymes of central energy metabolism and its deficiency (TD) impairs oxidative phosphorylation, increases oxidative stress, and activates inflammatory processes that can lead to neurodegeneration. Wernicke-Korsakoff syndrome (SWK) is a consequence of chronic TD, which leads to extensive neuronal death, and is associated with neuropathological disorders, including cognitive deficits and amnesia. The hippocampus is one of the brain areas most affected by SWK. B1 replacement may not be enough to prevent the irreversible cognitive deficit associated with SWK.

Materials and methods: An organotypic hippocampal slice culture (OHC) model was developed to investigate the molecular mechanisms underlying the imbalance between neuronal death and neurogenesis associated with TD. The main effects of B1 deprivation on OHCs were assessed by immunofluorescence and confocal microscopy and transcriptome analysis.

Results: In OHCs cultured without B1, a significant reduction in neuronal density was observed after five days and, on the seventh day, the epigenetic marks H3K4me3 and H3K9me3, capable of modulating the chromatin state, were altered in mature neurons favoring gene transcription. Surprisingly, between the seventh and the fourteenth day of B1 deprivation, a pulse of neurogenesis was observed followed by a further massive neuron loss. The contrast between the transcriptomes of OHCs cultured with or without B1 for nine days revealed 89 differentially expressed genes. Functional enrichment analyzes showed increased expression of genes in the KEGG pathways of tryptophan metabolism and lysine degradation, and genes with Gene Ontology (GO) annotations related to the organization of the extracellular matrix, cell adhesion, and positive regulation of synaptic transmission. Several genes of the TNF and FoxO signaling pathways and genes with GO terms related to the inflammatory response were inhibited. The activation of *Nsd1*, whose product methylates histone H3 at lysine 36, was also observed in the TD group. Increased H3K36me3 in neurons was confirmed by immunofluorescence. Finally, the treatment of COHCs in B1 deprivation with anti-inflammatory was effective in anticipating the pulse of neurogenesis, demonstrating the fundamental role of the immune response in the regulation of hippocampal neurogenesis during TD.

Conclusion: The positive regulation of genes from pathways related to the synthesis of acetyl-CoA from amino acids suggests a metabolic adaptation capable of allowing neural progenitor cells to use oxidative phosphorylation as energy source for neurogenesis. The set of genes differentially expressed at the ninth day of B1 deprivation points to a genetic programming favorable to the maturation of neurons and the negative regulation of neurogenesis mediated by the H3K36me3 mark in already differentiated neurons. Above all, the reduction in the expression of inflammatory genes before repopulation of OHCs with new neurons suggests a causal relationship, which is supported by previous studies reporting neuroinflammation as a suppressive factor in neurogenesis. Therefore, neuroinflammation seems to be crucial in neurodegeneration associated with TD, and may also have a role in the pathophysiology of SWK.

Keywords: Thiamine Deficiency. Organotypic Hippocampal Culture. Neurogenesis. Inflammation. Neurodegeneration. Neuroregeneration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema das principais vias metabólicas e enzimas (vermelho) que utilizam a tiamina como cofator	29
FIGURA 2: Cascata de eventos bioquímicos induzidos pela DT.....	32
FIGURA 3: Principais causas e consequências da deficiência de tiamina.....	36
FIGURA 4: Estágios da neurogênese hipocampal pós nascimento	38
FIGURA 5: Modificações epigenéticas.....	43
FIGURA 6: Preparação de culturas organotípicas de fatias do hipocampo e linha temporal de cultivo	52
FIGURA 7: Fluxograma de estratégias metodológicas utilizadas no estudo	53
FIGURA 8: A DT causa morte por apoptose de neurônios hipocampais maduros....	58
FIGURA 9: Efeitos da privação de tiamina em marcas epigenéticas de metilação da histona H3 em COHs cultivadas durante 4, 7 e 10 dias.	61
FIGURA 10: Dendrograma e mapa de calor representando o agrupamento hierárquico e níveis de expressão dos 89 genes diferencialmente expressos no grupo DT em comparação ao controle.	63
FIGURA 11: Modulação epigenética após pulso neurogênico nas COHs em DT.	67
FIGURA 12: Avaliação de efeitos fenotípicos do tratamento com 5 μ M, 50 μ M ou 100 μ M de RSV por 3 dias a partir do quarto dia de cultivo com ou sem tiamina.	68
FIGURA 13: Esquema dos principais resultados e hipótese do mecanismo de neuroregeneração da COHs cultivadas por nove dias em DT.	79

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Análise temporal da densidade de neurônios maduros durante 14 dias de cultivo com ou sem tiamina.	59
GRÁFICO 2: Análise temporal da variação da área (mm ²) das COHs durante 14 dias de cultivo com ou sem tiamina.	60
GRÁFICO 3: Quantificação relativa da expressão de uma seleção de genes relacionados à inflamação, metabolismo energético e neurogênese em COHs cultivadas por 4, 7 e 9 dias em DT.	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de <i>Fold Change</i> e <i>P</i> dos genes selecionados alterados pela DT em COHs cultivadas por 9 dias.	66
TABELA 2: Coeficientes de correlação de Pearson entre o nível de expressão dos genes selecionados alterados pela DT nas COHs.	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μM	Micrometro
5mC	5-Metilcitosina
A.U.	Unidade arbitrária (<i>Arbitrary unit</i>)
Adj-<i>P</i> value	Valor de <i>P</i> ajustado para teste de múltiplas comparações
AKT ou PKB	Proteína quinase B (<i>Protein kinase B</i>)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
APP	Proteína precursora de amiloide (<i>Amyloid precursor protein</i>)
AThTP	Trifosfato de adenosina-tiamina (<i>Adenosine thiamine triphosphate</i>)
Aβ	Peptídeo beta-amilóide
BBB	Barreira Hematoencefálica (<i>Blood-brain barrier</i>)
BCKDC	Desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (<i>Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex</i>)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
bHLH	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i>
BMP4	Proteína morfogenética óssea 4 (<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>)
C3	Complemento C3 (<i>Complement C3</i>)
CA	Corno de Ammon
Ca²⁺	Íon Cálcio
CCLs	Ligantes de quimiocina C-C (<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>complementary DNA</i>)
CG	Camada granular
CH₃	Grupo metil

CM	Camada molecular
CO₂	Dióxido de Carbono
CoA	Coenzima A
COH	Cultura Organotípica de Hipocampo
Col11a2	Cadeia de colágeno alfa-2, tipo XI (<i>Collagen type XI alpha 2 chain</i>)
Col8a2	Cadeia de colágeno alfa-2, tipo VIII (<i>Collagen type VIII alpha 2 chain</i>)
Colgalt2	Colágeno Beta (1-O) Galactosiltransferase 2 (<i>Collagen beta(1-O) galactosyltransferase 2</i>)
CpG	Citosina – fosfato – Guanina
CPNs	Células Progenitoras Neurais
CREB1	Proteína de ligação ao elemento responsivo cíclico-AMP 1 (<i>cyclic-AMP responsive element binding protein 1</i>)
CT	Com Tiamina (Controle)
CXCLs	Ligantes de quimiocina C-X-C (<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>)
Cy3	Cianina 3 (<i>Cyanine 3</i>)
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol (<i>4',6'-diamidino-2-phenylindole</i>)
DAVID	Database for Annotation, <i>Visualization and Integrated Discovery</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNMTs	DNA Metiltransferases
Domínio SET	<i>Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax -domain</i>
DRP1	Proteína do tipo dinamina-1 (<i>Dynamin related protein 1</i>)
DT	Deficiência de Tiamina
EAAT	Transportadores de glutamato (<i>Excitatory amino acid transporter</i>)

ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
ED1	Antígeno citoplasmático de micróglia/ macrófagos (<i>Ectodermal dysplasia protein</i>)
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
EW	Encefalite de Wernicke
FAD	Dinucleótido de flavina-adenina
FADH₂	Dinucleótido de flavina-adenina (hidroquinona)
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FGF-1	Fator de crescimento fibroblástico (<i>Acidic fibroblast growth factor</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FoxO	<i>Forkhead box class O</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico (<i>Gamma-aminobutyric acid</i>)
Gadd45	Genes de parada de crescimento e dano ao DNA (<i>Growth Arrest and DNA Damage</i>)
GD	Giro Denteado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GLUT3	Transportador 3 da glicose (<i>Glucose transporter 3</i>)
GO	<i>Gene Ontology</i>
G-para-K	Oxidação de carboidratos ou lactato para corpos cetônicos
H⁺	Hidrogênio (próton)
H₂O	Água
H3K27	Histona 3 na Lisina 27
H3K36me3	Trimetilação da Histona 3 na Lisina 36
H3K4me3	Trimetilação da Histona 3 na Lisina 4
H3K9me3	Trimetilação da Histona 3 na Lisina 9

HAT	Histona acetiltransferase (<i>Histone acetyltransferase</i>)
HDAC	Histona deacetilase (<i>Histone deacetylase</i>)
HDM	Histona desmetilase (<i>Histone demethylase</i>)
HMT	Histona metiltransferase (<i>Histone methyltransferase</i>)
HP1	Proteína de heterocromatina 1 (<i>Heterochromatin protein 1</i>)
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IF	Intensidade de fluorescência
IFN	<i>Interferon</i>
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
JAK	Janus quinase (<i>Janus kinases</i>)
JmjC	<i>Jumonji C domain-containing</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KGDHC	Alfa-cetoglutarato desidrogenase (<i>Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex</i>)
L	Litro
LCN2	Lipocalina 2 (<i>Lipocalin 2</i>)
LDH	Lactato Desidrogenase
lncRNA	RNA longo não-codificante (<i>Long non-coding RNA</i>)
MCT4	Transportador de monocarboxilato 4 (<i>Monocarboxylate transporter 4</i>)
MEM	Meio Mínimo de Eagle (<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>)
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitro
MLL1	Linhagem mista 1 de leukemia (<i>Mixed lineage leukemia protein-1</i>)
mm²	Milímetros cúbicos

mmol	Milimol
MMPs	Metaloproteinases da matriz
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (<i>mammalian Target of Rapamycin</i>)
n	Tamanho amostral
Na⁺/ K⁺ ATPase	Bomba sódio potássio
NAD⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (oxidado)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (reduzido)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NeuN	Proteína de núcleo neuronal (<i>Neuronal nuclei protein</i>)
NEUROD1	Fator de diferenciação neuronal 1 (<i>Neuronal differentiation 1</i>)
Nfkbia	Inibidor alfa do fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor-kappa-B-inhibitor alpha</i>)
NFκB	Fator nuclear Kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
ng	Nanogramas
NGF	Fator de crescimento nervoso (<i>Nerve growth factor</i>)
NGN2	Neurogenina 2 (<i>Neurogenin 2</i>)
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)
nmol	Nanomol
NO	Óxido Nítrico
NRF2	Fator 2 relacionado ao fator nuclear do eritróide 2 (<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
NSD1	Proteína 1 do domínio SET de ligação ao receptor nuclear (<i>Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1</i>)
OGDH	<i>Oxoglutarato desidrogenase / alfa-cetoglutarato (Oxoglutarate dehydrogenase / alpha-ketoglutarate)</i>

PBS	<i>Tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered saline)</i>
PDHC	<i>Piruvato desidrogenase (Pyruvate dehydrogenase complex)</i>
PFK-1	<i>Fosfofrutocinase-1 (Phosphofructokinase-1)</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Grupo fosfato inorgânico
PI3K	<i>Fosfoinosítido 3-quinase (Phosphatidylinositol 3-kinase)</i>
PK	Psicose de Korsakoff
<i>Ppia</i>	<i>Peptidilprolil isomerase A (Peptidylprolyl isomerase A)</i>
PRC1	<i>Proteína reguladora da citocinese 1 (Protein Regulator of cytokinesis 1)</i>
PTD	<i>Deficiência de tiamina induzida por piritiamina (Pyriothiamine-induced thiamine deficiency)</i>
q-PCR	<i>Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa em Tempo Real (Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time)</i>
RASSF10	<i>Membro da família do domínio de associação Ras 10 (Ras association domain family member 10)</i>
Receptor NMDA	<i>Receptor N-metil D-Aspartato (N-methyl-D-aspartate receptor)</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid)</i>
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
ROI	<i>Interest Region Manager</i>
ROS	<i>Espécie Reativa de Oxigênio (Reactive oxygen species)</i>
RPKM	<i>Kilobase de transcrito por milhão de reads mapeadas (Reads per kilo base per million mapped reads)</i>
RSV	Resveratrol
RTK	<i>Receptor tirosina quinase (Receptor tyrosine kinases)</i>
RTq-PCR	<i>Transcrição reversa em Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa em Tempo Real (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time)</i>

SLC19A	Carreadores de soluto, família 19 (<i>Solute Carrier Family 19</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOX2	Região Y determinante do sexo – box 2 (<i>Sex determining region Y, box 2</i>)
STAR	<i>Spliced Transcripts Alignment to a Reference</i>
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição (<i>Signal transducers and activators of transcription</i>)
SWK	Síndrome de Wernicke Korsakoff
TACE	Enzima conversora do fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>)
TET	Translocação de dez-onze, metilcitosina dioxigenase (<i>Ten-eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase</i>)
TGFB1	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
THTR	Transportadores de tiamina (<i>Thiamine transporters</i>)
TK	Transcetolase (<i>Transketolase</i>)
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i> (<i>Toll-like receptors</i>)
TMP	Tiamina monofosfato (<i>Thiamin monophosphate</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TPP	Tiamina pirofosfato (<i>Thiamine pyrophosphate</i>)
TTP	Tiamina trifosfato (<i>Thiamine triphosphate</i>)
TUNEL	Marcação de "nicks" por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>)
uHPLC-MS	Cromatografia Líquida ultra sensível acoplada à Espectrometria de Massas (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>)
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas (<i>Unfolded protein response</i>)
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

α KG

Alfa-cetoglutarato

μ L

Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. Aspectos gerais sobre a tiamina	26
1.2. Deficiência de Tiamina	29
1.2.1. Fisiopatologia da DT	30
1.2.1.1. Neuroinflamação na DT	33
1.2.2. Neuropatia e desdobramentos clínicos	34
1.3. Hipocampo	37
1.3.1. Neurogênese hipocampal	38
1.3.2. Modificações epigenéticas no hipocampo	40
1.3.3. Metabolismo energético no hipocampo	44
1.4. Modelos utilizados para avaliação da DT e SWK	47
2. OBJETIVOS	50
2.1. Objetivo Geral	50
2.2. Objetivos Específicos	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1. Animais	51
3.2. Cultura organotípica de fatias de hipocampo (COH)	51
3.3. Imunofluorescência	53
3.4. Microscopia confocal à laser	54
3.5. RNA-Seq	55
3.6. Análises de Bioinformática	55
3.7. PCR quantitativa em Tempo Real	56
3.8. Intervenção com fármaco anti-inflamatório	56
3.9. Análises estatísticas	57
4. RESULTADOS	58
4.1. Alterações fenotípicas associadas à DT em COHs	58
4.2. Perfil Transcricional das COHs	62
4.3. Análise em série temporal de genes selecionados a partir da análise do transcriptoma relacionados à inflamação, ao metabolismo energético e à neurogênese	64
4.4. Avaliação da marca epigenética H3K36me3 relacionada ao controle da neurogênese	67
4.5. Intervenção com fármaco anti-inflamatório	68

5.	DISCUSSÃO	70
5.1.	Dinâmica de neurodegeneração/ neurorregeneração nas COHs submetidas à DT	70
5.2.1.	Redução da neuroinflamação	72
5.2.2.	Adaptação metabólica	73
5.2.3.	Maturação dos novos neurônios	74
5.2.4.	Regulação da neurogênese	75
5.3.	Resveratrol estimula neurorregeneração nas COHs durante a DT	76
6.	CONCLUSÃO	78
7.	PERSPECTIVAS.....	80
7.1.	Avaliação da proliferação neuronal entre o sétimo e décimo dia de cultivo com ou sem tiamina, através da incorporação de BrdU (Bromodesoxiuridina).	80
7.2.	Avaliação dos níveis de metilação global do DNA de COHs cultivadas por 4, 7 e 10 dias com ou sem tiamina, através da imunocoloração contra 5mC.	80
7.3.	Intervenção farmacológica com doxicilina (DOX)	81
7.4.	Análise das concentrações dos metabólitos que participam do ciclo de Krebs por Cromatografia Líquida ultra sensível acoplada à Espectrometria de Massas (uHPLC-MS).....	81
	REFERÊNCIAS.....	82
	APÊNDICES.....	100
	APÊNDICE A: <i>Pipeline</i> utilizado para processamento, mapeamento e análise das reads obtidas através do RNA-Seq de COHs cultivadas por 9 dias em DT.....	100
	APÊNDICE B: <i>Pipeline</i> utilizado para análise de contraste dos perfis transcricionais das COHs cultivadas por 9 dias em DT em relação ao grupo controle.....	101
	APÊNDICE C: Genes diferencialmente expressos nas COHs cultivadas por 9 dias em DT em relação ao grupo controle	103
	APÊNDICE D: Análise de enriquecimento funcional com o <i>software</i> DAVID dos 89 genes diferencialmente expressos	108
	APÊNDICE E: Análise de enriquecimento funcional no <i>software</i> IPA dos 89 genes diferencialmente expressos encontrados.	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre a tiamina

Em 1911, foi identificada pelo bioquímico polonês Casimir Funk uma amina capaz de melhorar uma polineuropatia chamada beribéri, um “fator anti-beribéri”. Devido ao seu caráter essencial à vida e ao fato de ser uma amina, o químico a denominou “*vital amin*”, ou, em abreviação, vitamina (FUNK, 1912; FUNK; DUBIN, 1922). Após mais de um século de pesquisas na área, atualmente, as vitaminas são reconhecidas como um grupo de compostos orgânicos essenciais, indispensáveis para o bom funcionamento fisiológico. Dentre elas têm-se as vitaminas do complexo B, sendo: tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), ácido pantotênico (vitamina B5), piridoxina (vitamina B6), biotina (vitamina B7), folato (vitamina B9) e cobalamina (vitamina B12) (FUNK, 1912; FUNK; DUBIN, 1922).

A vitamina B1, anteriormente conhecida como aneurina ou fator anti-neurítico, foi a primeira vitamina a ter sua estrutura química determinada. Ela envolve a ligação por um metileno, de um anel tiazol e uma molécula de pirimidina substituída (Revisado em: RUBERT; ENGEL; ROHLFES; MARQUARDT *et al.*, 2017; VANNUCCHI; CUNHA, 2009). Esta vitamina hidrossolúvel não é sintetizada pelo corpo humano, devendo, portanto, ser adquirida através da alimentação. Ela é encontrada em diversos alimentos, como hortaliças, ovos, carnes e frutas, mas é mais abundante em leveduras, farelo de trigo, castanhas e cereais integrais (Revisado em: FRANÇA; CHAGAS; PESSOA; PINHO *et al.*, 2017). Segundo a Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 269, de 22 de setembro de 2005, publicada pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), a ingestão diária recomendada de tiamina para adultos é de 1,2 mg (BRASIL, 2005).

A absorção da tiamina ocorre no sistema gastrointestinal, principalmente no duodeno e jejuno. Quando em concentrações baixas (<2 µM), sua absorção se dá de forma ativa, mediada pelas proteínas transportadoras THTR1 (*Thiamine transporter 1*) e THTR2 (*Thiamine transporter 2*), e quando em concentrações elevadas ocorre por difusão passiva (GERALD F. COMBS; MCCLUNG, 2017; INSTITUTE OF MEDICINE (US) STANDING COMMITTEE ON THE SCIENTIFIC EVALUATION OF DIETARY REFERENCE INTAKES AND ITS PANEL ON FOLATE, 1998). Os transportadores de tiamina fazem parte da família de carreadores de

soluto SLC19A e são expressos de forma ubíqua em tecidos de mamíferos (BETTENDORFF; WINS, 2009). Na barreira hematoencefálica (BBB), o transporte ocorre através de mecanismos ativos e passivos (SECHI, GIANPIETRO; SERRA, ALESSANDRO, 2007).

A biodisponibilidade de tiamina e sua absorção podem ser alteradas, por exemplo, a depender do tipo de preparo do alimento ou por interação com outras substâncias. A vitamina é sensível à presença de sulfitos, polifenóis, flavonóides e outros micronutrientes e à oxidação por espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por irradiação com luz ultravioleta ou radiação ionizante. Além disso, a tiamina pode ser degradada com o aquecimento, principalmente em condições de pH não-ácido, ou por interação com tiaminases. Algumas substâncias podem, ainda, agir como análogos da tiamina. Destaca-se, com ampla aplicação na pesquisa científica, a piritiamina, que, no meio intracelular, inibe competitivamente a conversão de tiamina em tiamina pirofosfato (TPP), aumentando sua excreção (COMBS JR; MCCLUNG, 2016; SINGLETON; MARTIN, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

Na corrente sanguínea, a tiamina pode circular em hemácias ou no plasma, ligada de forma não específica a proteínas. Seu armazenamento ocorre em diversos órgãos como fígado, músculos esqueléticos, coração e cérebro e em fluidos como plasma e líquido. Estima-se um estoque corporal em humanos de 30-50 mg (GERALD F. COMBS; MCCLUNG, 2017) com extinção em aproximadamente 18 dias (SECHI, GIANPIETRO; SERRA, ALESSANDRO, 2007). Nos tecidos, a tiamina pode ser fosforilada para formar tiamina monofosfato (TMP), TPP, tiamina trifosfato (TTP) ou trifosfato de adenosina-tiamina (AThTP) (BETTENDORFF; WINS, 2009; BETTENDORFF; WIRTZFELD; MAKARCHIKOV; MAZZUCHELLI *et al.*, 2007). O composto difosforilado, TPP, é sua principal forma ativa, representando 70 a 90% da tiamina encontrada no citosol. Desta, cerca de 30% entra na mitocôndria (BETTENDORFF; WINS, 2009; GERALD F. COMBS; MCCLUNG, 2017).

Nas células, a TPP é encontrada frequentemente associada a algumas enzimas e complexos enzimáticos essenciais ao metabolismo energético. De fato, sua atuação como cofator dessas enzimas é crucial para a obtenção de energia pelas células. Destacam-se os complexos enzimáticos da piruvato desidrogenase (PDHC)

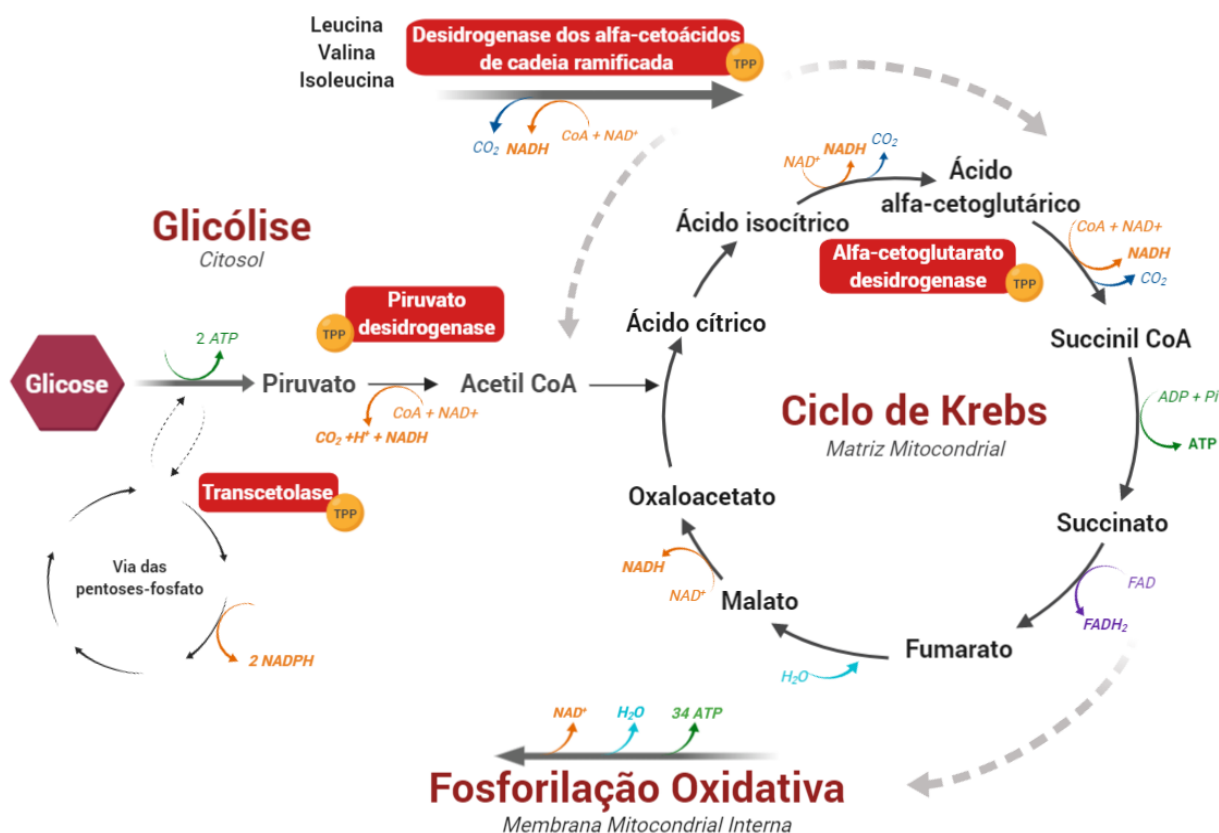
e da alfa-cetoglutarato desidrogenase (KGDHC) e a enzima transcetolase (TK) (BUBBER; KE; GIBSON, 2004) (Figura 1).

O PDHC e o KGDHC atuam nas principais vias de fornecimento energético celular e partilham similaridades reacionais e homologia estrutural. O PDHC permite a conversão de piruvato, CoA e NAD⁺ a acetil-CoA, CO₂ e NADH, atuando na interface entre a glicólise e o ciclo de Krebs. Este complexo é formado por três enzimas e a TPP atua como grupo prostético de uma delas, a componente piruvato desidrogenase (E₁), responsável pela etapa de descarboxilação oxidativa do piruvato. Dois mecanismos importantes de regulação desta enzima são: sua inativação reversível por fosforilação, pela ação de quinases e fosfatases específicas, e sua inibição alostérica, quando há alta concentração de produtos como acetil-CoA e NADH (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004; GERALD F. COMBS; MCCLUNG, 2017; TYLICKI; ŁOTOWSKI; SIEMIENIUK; RATKIEWICZ, 2018).

Uma vez formado o acetil-CoA, este pode seguir para o ciclo de Krebs. Uma das etapas cruciais neste ciclo envolve o KGDHC para conversão de alfa-cetoglutarato (também conhecido como 2-oxoglutarato), NAD⁺ e CoA em succinil-CoA, CO₂ e NADH. Finalmente, a enzima TK atua na via das pentoses-fosfato que garante o fornecimento de pentoses e NADPH para processos celulares e possibilita a produção de metabólitos da via glicolítica (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004; GERALD F. COMBS; MCCLUNG, 2017; TYLICKI; ŁOTOWSKI; SIEMIENIUK; RATKIEWICZ, 2018).

A tiamina também atua como cofator do complexo da desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (BCKDC), que atua em uma das etapas de conversão de alfa-cetoácidos de cadeia ramificada para a produção de propionil-CoA e acetil-CoA (Figura 1). A tiamina está implicada, ainda, na defesa contra o estresse oxidativo e em outros processos como a biossíntese de lipídios, mielina, ácidos nucleicos, aminoácidos de cadeia ramificada e de alguns neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), o glutamato e a acetilcolina (COMBS JR; MCCLUNG, 2016; MARTIN; SINGLETON; HILLER-STURMHÖFEL, 2003; NUNES; GÓMEZ-MENDOZA; REZENDE; FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

FIGURA 1: Esquema das principais vias metabólicas e enzimas (vermelho) que utilizam a tiamina como cofator.



FONTE: Elaborado pelo autor. Baseado em (KRAFT; ANGERT, 2017)

LEGENDA: ATP = Adenosina trifosfato, NAD⁺ = Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado), NADH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido), NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, H⁺ = Hidrogênio (próton), CoA = Coenzima A, TPP = Tiamina pirofosfato, Pi = Grupo fosfato inorgânico, CO₂ = Dióxido de carbono, H₂O = Água, FAD = Dinucleotídeo de flavina-adenina, FADH₂ = Dinucleotídeo de flavina-adenina (forma de hidroquinona).

1.2. Deficiência de Tiamina

Como mencionado anteriormente, a tiamina age como cofator específico de complexos enzimáticos que envolvem a descarboxilação e a transcetolação. Assim, sua biodisponibilidade é um pré-requisito para a função celular normal, sobretudo no sistema nervoso central, tão sensível à disponibilidade energética (COOPER; ROTH; KINI, 1963; WITT, 1985). Alterações nos níveis de tiamina podem resultar em déficits neurológicos graves, sendo a causa mais comum desse problema a má absorção ou ingestão insuficiente da vitamina, podendo ser agravada com o consumo abusivo crônico de álcool (BALAGHI; NEAL, 1977; HÖLLER; SCHALLER; WERTH, 1975; THOMSON; BAKER; LEEVY, 1970).

1.2.1. Fisiopatologia da DT

A fisiopatologia da DT é bastante complexa e envolve mecanismos celulares e moleculares que interagem de forma contínua e interdependente, podendo variar de acordo com o componente cerebral afetado (Revisado em: (ABDOU; HAZELL, 2015); BUBBER; KE; GIBSON, 2004; FOURNIER; BUTTERWORTH, 1990). Os primeiros estudos de Peters, na década de 1930, indicaram que a deficiência de tiamina em pombos resulta no acúmulo de lactato no tronco encefálico, e que a reposição da vitamina leva à normalização dos níveis deste metabólito. Esta descoberta cunhou o conceito de “lesão bioquímica” da DT (KINNERSLEY; PETERS, 1930; PETERS, 1936).

A privação prolongada de tiamina é acompanhada por reduções das atividades de KGDHC, PDHC e TK, (Figura 2). Entretanto, estas reduções se dão em diferentes níveis dependendo da enzima e da estrutura cerebral afetada (DHIR; TARASENKO; NAPOLI; GIULIVI, 2019; TODD, K.; BUTTERWORTH, R. F., 1999). Alterações na atividade de outras enzimas não dependentes de tiamina no cérebro de ratos com DT, como succinato desidrogenase, succinato tioquinase e malato desidrogenase, que compõem o ciclo de Krebs, também já foram relatadas devido a escassez de substrato (BUBBER; KE; GIBSON, 2004).

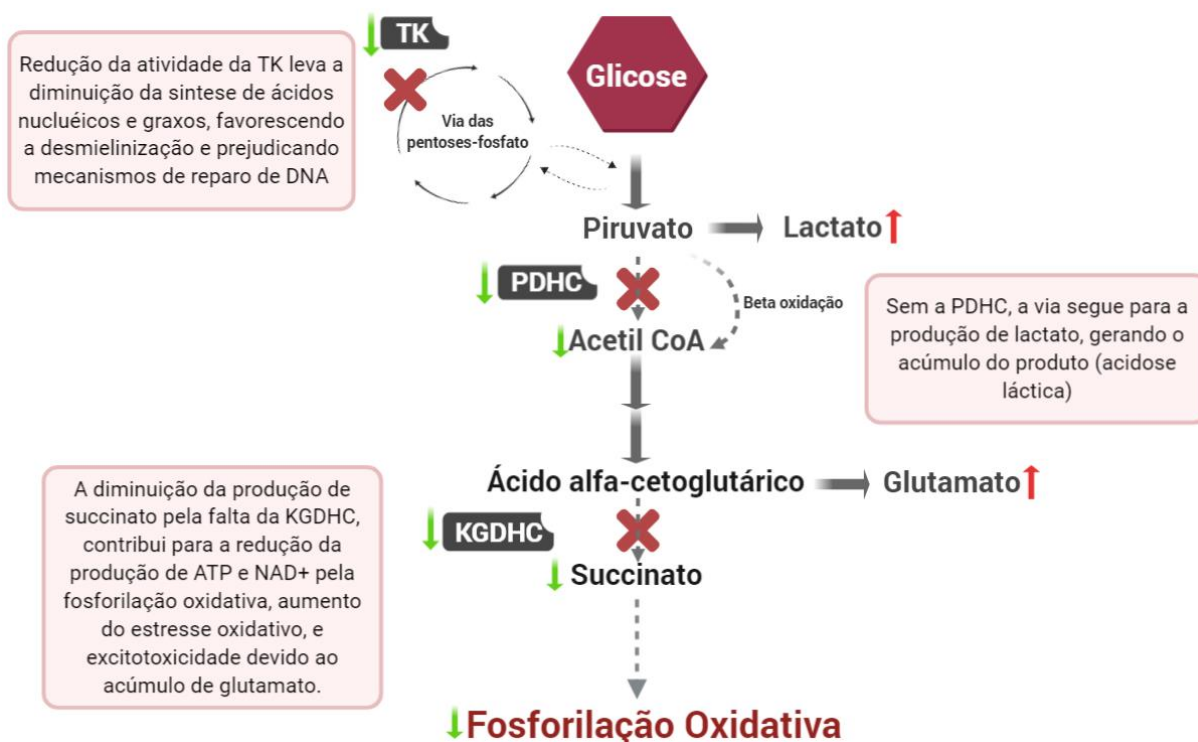
Durante a DT, a descarboxilação oxidativa da alfa-cetoglutarato é inibida, resultando em déficits de energia devido ao comprometimento do ciclo de Krebs, diminuindo a atividade de Na⁺/ K⁺ ATPase e favorecendo condições excitotóxicas que podem levar à morte celular (Revisado em: (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009)). A diminuição da função do KGDHC também resulta no desenvolvimento de acidose láctica em resposta à atividade prejudicada do ciclo de Krebs, contribuindo para a excitotoxicidade local (KINNERSLEY; PETERS, 1930). A acidose láctica induzida pela DT é caracterizada como do tipo B, ou seja, acidose na presença de boa perfusão e oxigenação do tecido. A acidose láctica com pH 7 e lactato sanguíneo abaixo de 15 mmol /L geralmente não responde à alcalinização (CHADDA; RAYNARD; ANTOUN; THYRAULT *et al.*, 2002). A menos que a tiamina seja rapidamente repostada, pode ocorrer acidose refratária à alcalinização evoluindo para óbito em 24 horas ((CDC), 1989). As áreas de acidose láctica aumentada do cérebro desenvolvem lesões histológicas e, provavelmente, têm um papel relevante na fisiopatologia DT (HAKIM, 1984; MUNUJOS; VENDRELL; FERRER, 1993). Além

disso, a redução da atividade de KGDHC resulta na diminuição da utilização de glicose, que, junto com a estimulação compensatória da acidose láctica, leva a alterações no fluxo sanguíneo cerebral (JHALA; HAZELL, 2011). Concomitantemente, a função mitocondrial prejudicada pela redução da atividade do KGDHC leva ao aumento da produção de ROS contribuindo para o estresse oxidativo, aumento da produção de APP (*Amyloid precursor protein*), formação de peptídeo amilóide- β ($A\beta$), aumento da síntese de MMP9 (*Matrix Metalloproteinase 9*) e regulação positiva de eNOS (*Endothelial nitric oxide synthase*) (CALINGASAN; GANDY; BAKER; SHEU *et al.*, 1995; KARUPPAGOUNDER; XU; PECHMAN; CHEN *et al.*, 2008; KARUPPAGOUNDER; XU; SHI; CHEN *et al.*, 2009; WANG; XU; FRANK; KE *et al.*, 2017; ZHANG; YANG; LI; FAN *et al.*, 2011). Essa cascata bioquímica desencadeia processos inflamatórios, contribui para a disfunção e morte neuronal, além da ruptura da BBB (CALINGASAN; PARK; GANDY; GIBSON, 1998; KARUPPAGOUNDER; XU; PECHMAN; CHEN *et al.*, 2008; QIN; CREWS, 2014; WANG; HAZELL, 2010).

Embora PDHC e KGDHC sejam semelhantes em muitos aspectos, as atividades PDHC não sofrem alterações significativas durante a DT a curto prazo. A atividade total da enzima durante a supressão de tiamina permaneceu próxima aos níveis dos controle quando avaliada em várias regiões do cérebro em modelos animais (BUBBER; KE; GIBSON, 2004; BUTTERWORTH, 1986; ELNAGEH; GAITONDE, 1988). Isso é explicado pela relação reversível entre o complexo multienzimático e a TPP e pela sua estrutura constituída por dois resíduos de ácido lipóico, tornando-o menos suscetível à inativação por radicais livres (HUMPHRIES; SZWEDA, 1998). De acordo com esses achados, embora as atividades de PDHC não tenham sido afetadas pela DT antes do início do quadro de sintomas neurológicos, a taxa de oxidação do piruvato no tecido cerebral de animais sintomáticos estava consistentemente diminuída (GUBLER, 1961; GUBLER; PETERSON; TURPIN; CRANE *et al.*, 1974).

Em relação a TK, a redução de sua atividade resulta na diminuição da síntese de ácidos graxos, que pode levar à desmielinização e diminuição da síntese de ácidos nucleicos. Estudos em modelo *ex vivo* também relacionam a diminuição da TK com o comprometimento da proliferação de células progenitoras hipocampais (ZHAO; PAN; ZHAO; WANG *et al.*, 2009; ZHAO; WU; HU; CAI *et al.*, 2014).

FIGURA 2: Cascata de eventos bioquímicos induzidos pela DT.



FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: As alterações bioquímicas causadas pela DT envolvem principalmente a diminuição das atividades das enzimas TK, PDHC e KGDHC, o que resulta no aumento do estresse oxidativo, excitotoxicidade e inflamação, levando à neurodegeneração, ruptura da barreira hematoencefálica (BBB), e, dependendo da severidade do quadro, ao edema vasogênico.

A tiamina e seus derivados também são cruciais na estabilização do potencial de membrana em repouso (FOX; DUPPEL, 1975; ITOKAWA; COOPER, 1970). Em condições normais, os mecanismos de captação de glutamato operam predominantemente em astrócitos por meio dos transportadores de glutamato EAAT1 (*Excitatory amino acid transporter 1*) e EAAT2 (*Excitatory amino acid transporter 2*), removendo com eficiência o este aminoácido excitatório do espaço extracelular. Entretanto, diante do comprometimento do metabolismo energético mitocondrial e da conseqüente redução na atividade de Na⁺/ K⁺ ATPase, a despolarização da membrana celular é favorecida, levando à ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem e aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular (COOPER; ROTH; KINI, 1963; HAZELL; ITZHAK; LIU; NORENBURG, 1997). Essa perturbação neurofisiológica contribui para o aumento da liberação sináptica de glutamato e ativação de receptores NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*), que são

condições excitotóxicas associadas à neurodegeneração (AZARIAS; PERRETEN; LENGACHER; POBURKO *et al.*, 2011; HAZELL; BUTTERWORTH, 2009)

1.2.1.1. Neuroinflamação na DT

Embora o dano neuronal seja uma característica intrínseca da DT, os elementos da glia também são profundamente afetados (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009; KE; DEGIORGIO; VOLPE; GIBSON, 2003; TODD, K.; BUTTERWORTH, R. F., 1999). Na década de 1960, alterações na morfologia das células gliais durante a DT, incluindo evidência de inchaço e o aparecimento de vacúolos fagocíticos, foram relatadas pela primeira vez (COLLINS, 1967; ROBERTSON; MANZ; HAAS; MEYERS, 1975). Esses achados são consistentes com as alterações patológicas que podem ser atribuídas à presença de um processo inflamatório.

No cérebro, a neuroinflamação é governada principalmente pela microglia, que representa por volta de 20% das células cerebrais (LANDRETH, 2009; PUNTAMBEKAR; DOOSE; CARSON, 2008). A microglia ativada produz citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, aminoácidos excitatórios, ácido quinolínico, proteínas do complemento, ROS e NO (*nitric oxide*) (ROTHWELL; RELTON, 1993). Essas substâncias podem aumentar o estresse oxidativo e ativar as vias de morte celular, que promovem neurodegeneração (MONJE; TODA; PALMER, 2003; QIN; CREWS, 2014; TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F., 1999; WANG; HAZELL, 2010).

Estudos anteriores identificaram a ativação microglial como uma resposta celular precoce e crucial na fisiopatologia da DT (TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F., 1999), em que os níveis de CD11b/c (*Integrin $\alpha M / \alpha X$*) e CD68 (*Cluster of Differentiation 68*), expressos predominantemente pela micróglia, estão aumentados nos estágios iniciais da doença, antes do desenvolvimento de morte celular neuronal e em áreas de vulnerabilidade cerebral focal, sugerindo que esta resposta celular pode contribuir para a disfunção neurológica e subsequente formação de lesões. Além disso, ativação da micróglia durante a DT induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 (*Interleukin 6*), IL-18 (*Interleukin 18*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*), IFNs (*Interferons*), proteínas induzidas por IFN e quimiocinas (CXCL1 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*), CCL2 (*Chemokine (C-C motif) ligand 2*), CCL3 (*Chemokine (C-C motif) ligand 3*) e CCL4 (*Chemokine (C-C motif) ligand 4*)) (TODD, K.; BUTTERWORTH, R. F., 1999; WANG; HAZELL, 2010).

Experimentos *in vitro* demonstram que a microglia ativada também medeia a lesão de células neuronais via NO, potente inibidor da citocromo c oxidase mitocondrial (complexo IV) (CHAO; HU; MOLITOR; SHASKAN *et al.*, 1992). Ademais, a produção de IL-6 promove o aumento de ROS no cérebro (BEHRENS; ALI; DUGAN, 2008), contribuindo para outros mecanismos indutores de ROS ativados durante a inflamação. Sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido na ativação da microglia, e a ativação crônica da microglia parece exacerbar o estresse oxidativo (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009; WANG; HAZELL, 2010), no entanto, a relação causal desses mecanismos ainda não é clara.

1.2.2. Neuropatia e desdobramentos clínicos

O diagnóstico da DT em sua forma subclínica é dificultado pela sintomatologia inespecífica, que pode incluir fadiga, irritabilidade, dor de cabeça e desconforto intestinal (SECHI, GIANPIETRO; SERRA, ALESSANDRO, 2007). Uma pesquisa realizada por Júnior *et al.* (2011), com adolescentes entre 14-18 anos, na cidade de São Paulo (Brasil), revelou uma inadequação da ingestão de tiamina na dieta de 15% entre as meninas e de 2% entre os meninos. Assim, o cuidado com as deficiências nutricionais na população se mostra uma questão atual e relevante.

Historicamente, a DT tem sido motivo de especial preocupação em algumas partes do sudeste da Ásia, principalmente durante os séculos XIX e XX. O elevado consumo de arroz polido por essas comunidades, bem como de alimentos com fatores que prejudicam a absorção de tiamina parece ter contribuído para a alta incidência e taxa de mortalidade pela DT nesses períodos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). O problema ainda persiste em algumas regiões, tal como demonstrado por um estudo recente, realizado por Whitfield (2017), no Camboja, que identificou como deficientes em tiamina (TPP eritrocitário < 120 nmol/L) 27% das mulheres e 15% das crianças de 6-69 meses, sendo observada uma prevalência de 38% entre os bebês de 6-12 meses.

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento da DT incluem: envelhecimento, distúrbios alimentares, alimentação parenteral, obesidade, doenças que afetam o sistema gastrointestinal e cirurgia bariátrica (AASHEIM, 2008; DHIR; TARASENKO; NAPOLI; GIULIVI, 2019; KERNS; ARUNDEL; CHAWLA, 2015; RENTHAL; MARIN-VALENCIA; EVANS, 2014; THAUVIN-ROBINET; FAIVRE; BARBIER; CHEVRET *et*

al., 2004). O consumo abusivo e crônico de álcool também é um importante fator de risco. Ele está associado a prejuízos na absorção de tiamina pelo sistema gastrointestinal, na sua posterior conversão à TPP, utilização pela célula e armazenamento no fígado. Ademais, etilistas crônicos podem apresentar uma ingestão nutricional inadequada (MARTIN; SINGLETON; HILLER-STURMHÖFEL, 2003).

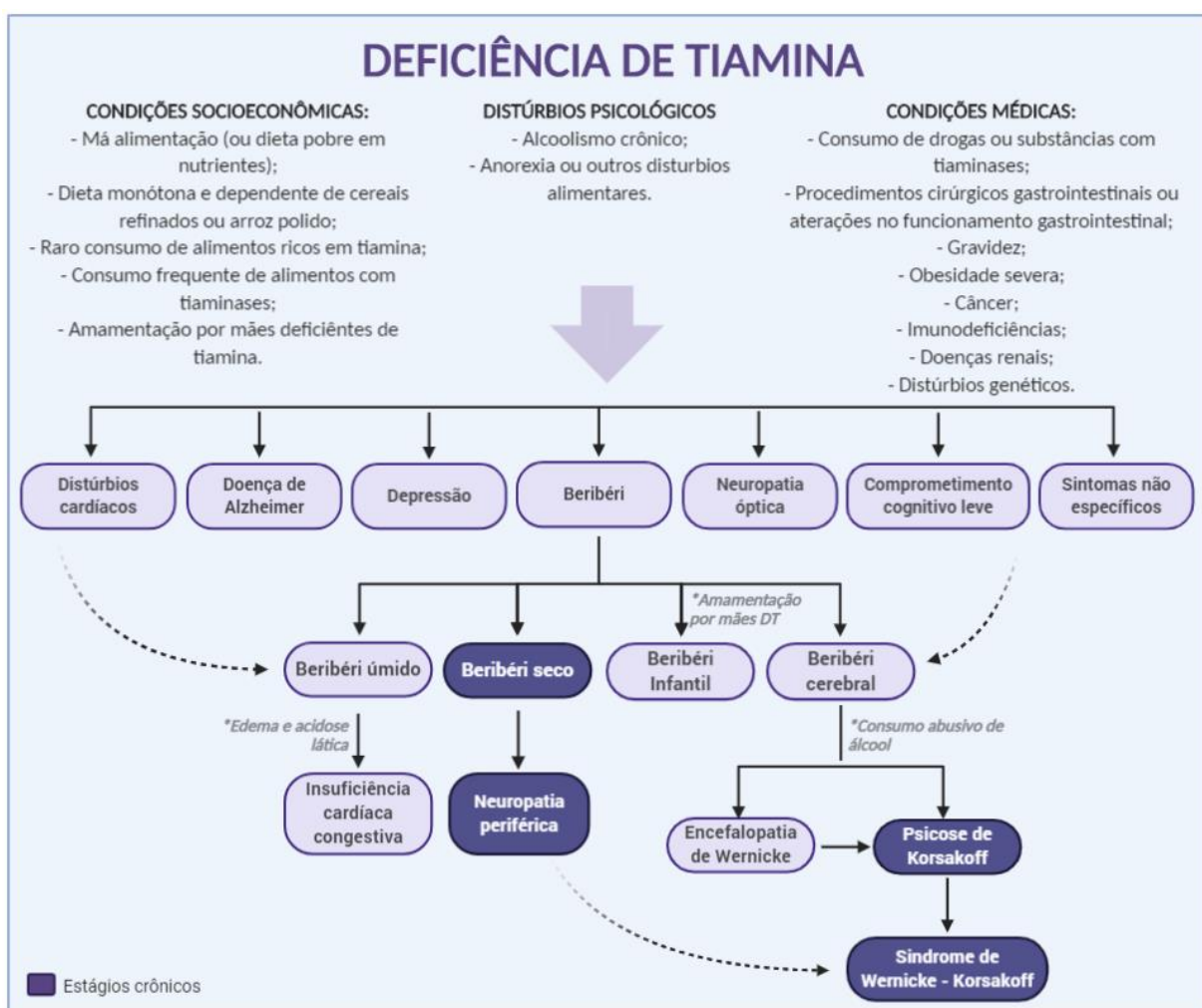
A forma clássica de manifestação da DT é o beribéri, com sintomas que acometem principalmente os sistemas nervoso e cardiovascular. Suas manifestações clínicas se dividem em: beribéri seco, beribéri úmido e beribéri infantil (Figura 3). O beribéri seco é caracterizado pelo comprometimento do sistema nervoso com prejuízo dos nervos sensoriais e motores. Há presença de sintomas como neuropatia periférica, fraqueza muscular e paralisia de nervos periféricos. O beribéri úmido se diferencia pela presença de edema e pelos sintomas mais relacionados ao sistema cardiovascular como cardiomegalia, fraqueza, taquicardia e insuficiência cardíaca, podendo levar o indivíduo à morte. Por fim, a beribéri infantil, apesar de rara pode ocorrer em bebês de mães deficientes em tiamina. As manifestações podem levar o bebê à morte rapidamente e incluem edema generalizado, taquicardia, cianose, vômito, diarreia e convulsões (GERALD F. COMBS; MCCLUNG, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

A Síndrome de Wernicke Korsakoff (SWK) é um distúrbio neurológico também associado à não ingestão ou má absorção de tiamina (Figura 3). Caracteriza-se por déficits cognitivos, amnésia, distúrbios neuropatológicos com extensiva neurodegeneração e disfunção celular e molecular. Em pacientes com SWK, os danos são observados em várias áreas do sistema nervoso central (SNC), como o hipocampo, tálamo, corpos mamilares e cerebelo. O grau das lesões e o comprometimento tecidual podem variar de acordo com a estrutura afetada (Revisado em (INABA; KISHIMOTO; OISHI; NAGATA *et al.*, 2016; NARDONE; HÖLLER; STORTI; CHRISTOVA *et al.*, 2013; SAVAGE; HALL; RESENDE, 2012)).

A SWK apresenta dois estágios clínicos, a encefalite de Wernicke (EW) e a psicose de Korsakoff (PK). A EW é uma deficiência aguda de tiamina descrita por Wernicke, em 1881 (THOMSON; COOK; GUERRINI; SHEEDY *et al.*, 2008), e caracterizada por uma tríade de sintomas clássicos: ataxia, oftalmoplegia/ nistagmo e confusão mental. Entretanto, 19% dos pacientes podem não chegar a apresentar

nenhum destes sintomas e apenas 16% apresentam a tríade completa (HARPER; GILES; FINLAY-JONES, 1986). Outros sintomas incluem diplopia, apatia, incapacidade em se concentrar, danos cognitivos, desorientação espacial e redução bilateral da acuidade visual (OTA; CAPIZZANO; MORITANI; NAGANAWA *et al.*, 2020). A PK, descrita por Korsakoff em 1887 (Revisado em: KORSKOFF, 1889a; VICTOR; ADAMS; COLLINS, 1971), é caracterizada por disfunção do lobo frontal, confabulação, distúrbios afetivos e amnésia anterógrada e retrógrada (KOPELMAN; THOMSON; GUERRINI; MARSHALL, 2009; NUNES; GÓMEZ-MENDOZA; REZENDE; FIGUEIREDO *et al.*, 2018; WIJNIA; OUDMAN; BRESSER; GERRIDZEN *et al.*, 2014).

FIGURA 3: Principais causas e consequências da deficiência de tiamina.



FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: O fluxograma representa os possíveis quadros clínicos associados a esta forma de subnutrição, além de fatores que podem agravar sua evolução.

Estima-se uma prevalência de 0,4 a 2,8% de EW na população geral (OTA; CAPIZZANO; MORITANI; NAGANAWA *et al.*, 2020). As lesões causadas pela DT podem levar à morte, com taxas de mortalidade relatadas de 17%-20%, ou ao desenvolvimento da psicose de Korsakoff, em aproximadamente 85% dos casos (Revisado em: COOK; HALLWOOD; THOMSON, 1998)). Entretanto, a SWK permanece sendo uma condição subdiagnosticada em 75 a 80% dos casos, que são identificados somente após a autópsia do paciente (ISENBERG-GRZEDA; KUTNER; NICOLSON, 2012; TORVIK; LINDBOE; ROGDE, 1982). A etiologia da SWK está relacionada principalmente ao alcoolismo (LISHMAN, 1990) e a prevalência de seus sintomas clássicos associados em pacientes etilistas crônicos é superior a 10% (ISENBERG-GRZEDA; KUTNER; NICOLSON, 2012; SECHI, G.; SERRA, A., 2007).

Mediante suspeita da síndrome, o paciente deve ser prontamente tratado com uma dose parenteral alta de tiamina. Esta aplicação deve ser feita em local que apresente condições adequadas para manejo do paciente devido ao risco de reações anafiláticas (KOPELMAN; THOMSON; GUERRINI; MARSHALL, 2009). A intervenção precoce, ainda no estágio agudo, com reposição adequada de tiamina facilita a recuperação do paciente. Entretanto, o tratamento tardio, principalmente para aqueles que já desenvolveram a psicose de Korsakoff, pode não ser suficiente para impedir os déficits cognitivos e de memória permanentes (OTA; CAPIZZANO; MORITANI; NAGANAWA *et al.*, 2020; THOMSON; GUERRINI; MARSHALL, 2012).

1.3. Hipocampo

O hipocampo é uma eminência alongada e curva do SNC localizada bilateralmente nos lobos temporais mediais, mais precisamente no assoalho do corno inferior de cada ventrículo lateral (MACHADO; MACHADO HAERTEL, 2006). Seu nome é inspirado no formato de um cavalo-marinho, espécie do gênero *Hippocampus*, ao qual a estrutura se assemelha após dissecação (KNIERIM, 2015). É constituído de um tipo filogeneticamente antigo de córtex (arquicórtex) e é composto por duas lâminas convolutas: o corno de Ammon (CA), que se subdivide em regiões de CA1 a CA4, e o giro denteado (GD) (DESTRIEUX; BOURRY; VELUT, 2013).

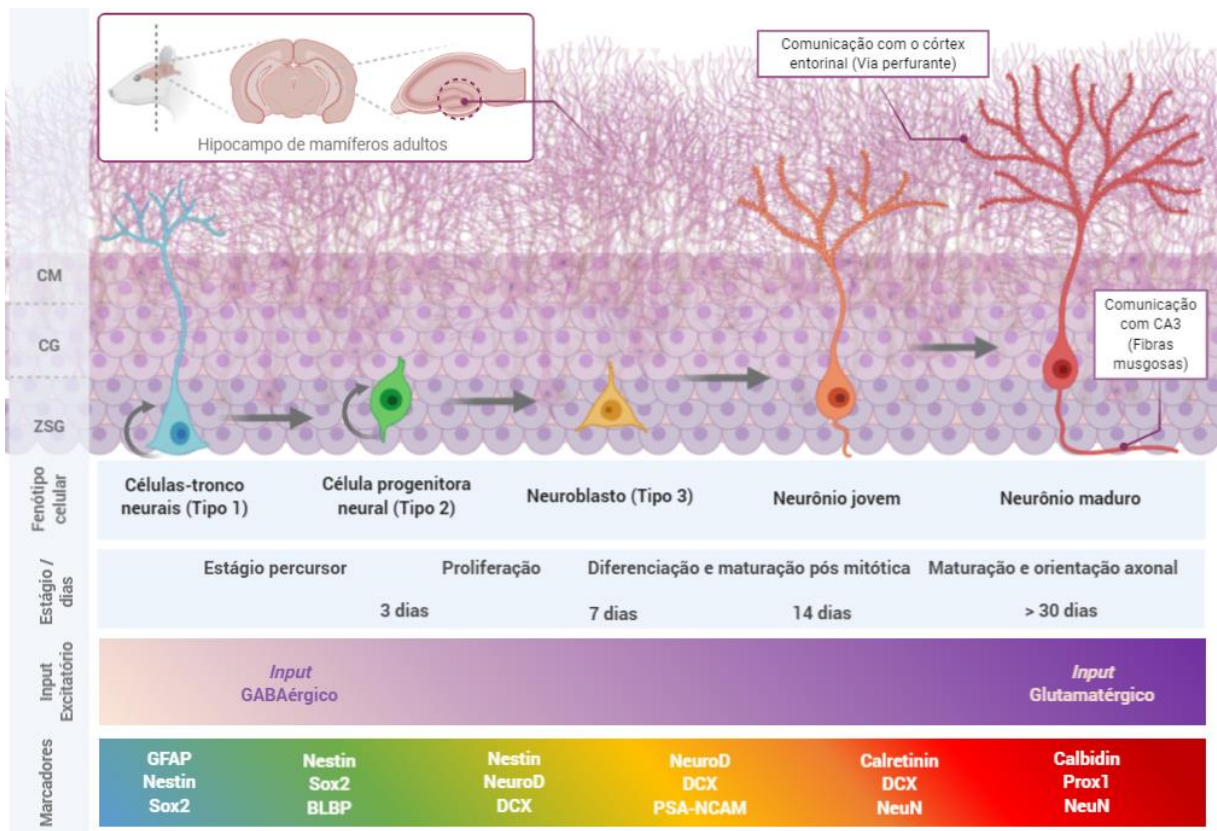
O hipocampo é uma das estruturas que compõem o sistema límbico e apresenta um papel importante na criação de novas memórias declarativas e no desenvolvimento de memórias espaciais, contribuindo para a formação de um mapa

cognitivo do ambiente e da memória dependente de contexto (ALY; RANGANATH, 2018; KNIERIM, 2015). É uma das áreas cerebrais mais afetadas pela DT e pela SWK (CAVALIERE; BENITO-MUÑOZ; MATUTE, 2016).

1.3.1. Neurogênese hipocampal

Altman e Das (1965) causaram grande controvérsia na década de 60 após relatarem evidências de neurogênese pós embrionária em ratos, algo incompatível com a imutabilidade atribuída ao SNC na época. Assim, após o nascimento, também seria possível a diferenciação e maturação de novos neurônios funcionais à partir de células precursoras existentes no SNC (FARES; BOU DIAB; NABHA; FARES, 2019; RAINETEAU; RIETSCHIN; GRADWOHL; GUILLEMOT *et al.*, 2004). Atualmente, essa proposição é bem aceita na comunidade científica, tendo sido descrita em três regiões cerebrais distintas: a zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais, o hipotálamo e a zona subgranular (ZSG) do GD do hipocampo (FARES; BOU DIAB; NABHA; FARES, 2019).

FIGURA 4: Estágios da neurogênese hipocampal pós nascimento.



FONTE: Elaborado pelo autor. Baseado em (HSIEH, 2012).

LEGENDA: As células-tronco (Tipo 1, em azul) mantêm seu plantel por meio de autorrenovação e dão origem a células progenitoras (Tipo 2, em verde), que expressam marcadores semelhantes, mas exibem morfologia diferente. Essas células passam por uma rápida fase de proliferação e começam a expressar marcadores específicos para o destino de sua progênie. As células do tipo 2 geram neuroblastos (Tipo 3, em amarelo), que entram no estágio inicial de diferenciação (neurônio jovem, em laranja) e se estendem em direção à camada molecular. Durante o estágio tardio de diferenciação, apenas neurônios recém-nascidos que formaram conexões funcionais e amadureceram morfologicamente (em vermelho) permanecem dos milhares de neuroblastos gerados. Os demais neurônios granulares estão representados em roxo claro. A barra de gradiente de roxo na parte inferior representa a mudança de perfil excitatório e a última barra de gradiente de cores na parte inferior ilustra a transição gradual na expressão de marcadores conforme as células progredem através dos diferentes estágios do processo neurogênico. CM= Camada molecular; CG= Camada granular; ZSG =zona subgranular.

As células-tronco neurais (tipo 1) (Figura 4) presentes na ZSG do hipocampo apresentam raras e lentas divisões celulares. Sugere-se que elas originem células progenitoras neurais (CPNs) (tipo 2), que são altamente proliferativas. Nas CPNs, inicia-se a expressão de marcadores que indicam seu comprometimento na produção de um tipo celular específico, como astrócitos ou neurônios. Com a diferenciação das CPNs em neuroblastos (tipo 3), segue-se o processo de maturação neuronal em que ocorre crescimento dendrítico e axonal, sinaptogênese e estabelecimento de conexões (KOZAREVA; CRYAN; NOLAN, 2019; SUH; CONSIGLIO; RAY; SAWAI *et al.*, 2007). Por fim, os novos neurônios granulares formados integram-se à circuitaria já existente no hipocampo, enviando projeções axonais para CA3 através do hilo e recebendo estímulo GABAérgico de interneurônios e do córtex entorrinal (GE; PRADHAN; MING; SONG, 2007).

Propõe-se que as células-tronco neurais e as CPNs possuam, além da capacidade de se diferenciar em novos tipos celulares, a possibilidade de gerar novas CPNs. A divisão dessas células ocorreria de forma assimétrica, produzindo neurônios/ astrócitos maduros e células CPN filhas. Assim, garantiria-se um equilíbrio, com a produção de células maduras e a manutenção constante de um plantel de CPNs responsivo a novos estímulos (SUH; CONSIGLIO; RAY; SAWAI *et al.*, 2007).

A regulação da neurogênese pós-embrionária no hipocampo envolve interações complexas e dinâmicas entre fatores ambientais, celulares e moleculares. Fatores de transcrição como SOX2 (*Sex determining region Y – box 2*), NEUROD1 (*Neuronal differentiation 1*), NEUROD2 (*Neuronal differentiation 2*) e NGN2 (*Neurogenin 2*) participam deste controle e evidências sugerem um papel relevante da metilação/

demetilação de DNA e outras modificações epigenéticas na regulação destes processos (COVIC; KARACA; LIE, 2010).

É importante, também, considerar o microambiente, ou nicho, em que estas células estão inseridas. Assim, a presença de neurotransmissores como o GABA (*Gamma-aminobutyric acid*), fatores de crescimento como o FGF-1 (*Acidic fibroblast growth factor*) e BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), e algumas citocinas também impactam na proliferação, diferenciação e maturação celular (COVIC; KARACA; LIE, 2010; GE; PRADHAN; MING; SONG, 2007; KOZAREVA; CRYAN; NOLAN, 2019).

A micróglia em seu estado não ativado atua de forma importante promovendo a neurogênese, fagocitando neurônios que não conseguem se integrar à circuitaria hipocampal, regulando a maturação e transmissão sináptica de receptores glutamatérgicos, auxiliando na poda sináptica (KOHMAN; RHODES, 2013; KOZAREVA; CRYAN; NOLAN, 2019). Em contraste, a ativação clássica da micróglia e a liberação de moléculas pró-inflamatórias prejudica a neurogênese hipocampal diminuindo a diferenciação de células em novos neurônios e criando um microambiente desfavorável à sua sobrevivência (Revisado em: KOHMAN; RHODES, 2013).

Fatores ambientais, externos ao indivíduo, também são cruciais na determinação do destino celular. Estresse, envelhecimento e eventos vivenciados podem contribuir para a inibição da neurogênese, ao passo que a prática de atividades físicas, o aprendizado e enriquecimento ambiental podem ter impactos positivos (KUHN; TODA; GAGE, 2018). Entretanto, apesar dos diversos estudos, muito há, ainda, a ser elucidado acerca dos mecanismos celulares e moleculares relacionados à neurogênese e da interação dos elementos que a permeiam.

A ocorrência de neurogênese em indivíduos após o nascimento confere um importante potencial de plasticidade sináptica ao SNC, sendo essencial à resposta a desafios e estímulos ambientais (LEE; DUAN; LONG; INGRAM *et al.*, 2000).

1.3.2. Modificações epigenéticas no hipocampo

Epigenética (*epi-* do grego ἐπι- "acima, de fora, ao redor") implica características que estão "acima de" ou "além de" a base genética tradicional para herança. É o ramo da biologia que estuda as interações causais entre genes e

seus produtos, os quais dão origem ao fenótipo. No sentido original desta definição, epigenética se refere a todas as vias moleculares que modulam a expressão de um genótipo em um fenótipo particular (WADDINGTON, 1942).

Essas interações abrangem a modificação da estrutura do próprio DNA ou das proteínas constituintes da cromatina, causando a ativação ou inibição gênica (WEINHOLD, 2006). Tal mecanismo permite que as células diferenciadas, mesmo possuindo o mesmo conteúdo genético, expressem apenas os genes necessários para sua função naquele determinado estágio da vida (CHANDLER, 2010). Com a descoberta da neurogênese contínua no cérebro adulto, as discussões sobre o papel da epigenética na promoção da diferenciação e condução do destino celular no desenvolvimento pós-natal tem ganhado destaque (LILJA; HELDRING; HERMANSON, 2013; LIM; HUANG; SWIGUT; MIRICK *et al.*, 2009).

Em neurônios maduros diferenciados do hipocampo, mecanismos epigenéticos, tais como a metilação de DNA, modificações pós-traducionais de histonas e regulação de lncRNAs (*long non-coding RNA*), desempenham papéis-chave em uma variedade de processos, incluindo aprendizagem e memória (COLLINS; GREER; COLEMAN; SWEATT, 2019; GUPTA; KIM; ARTIS; MOLFESE *et al.*, 2010; SNIGDHA; PRIETO; PETROSYAN; LOERTSCHER *et al.*, 2016). Entretanto, podem contribuir também para a ocorrência de distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer e distúrbios neuropsiquiátricos, como a depressão (HWANG; AROMOLARAN; ZUKIN, 2017).

A metilação de DNA é a modificação epigenética mais bem estudada até o momento. Esta consiste na adição de um grupo metil (CH₃) ao carbono 5 do nucleotídeo citosina por uma enzima metiltransferase, transformando-a em 5-metilcitosina (5mC) (RAZIN; KANTOR, 2005; WU; ZHANG, 2017). Nos tecidos somáticos em adultos, essa metilação ocorre tipicamente num contexto de um dinucleotídeo CpG (citosina – fosfato – guanina na sequência linear de bases 5'-3'). A metilação não-CpG é prevalente em células-tronco embrionárias (HAINES; RODENHISER; AINSWORTH, 2001). Os sítios CpGs estão localizados, em sua maior parte, próximo aos domínios de regulação da transcrição gênica, que é o principal local de metilação de DNA nos vertebrados; a metilação desses sítios causa o silenciamento do gene correspondente, uma vez que a presença de CpGs

modificadas impede a ligação de fatores de transcrição à sequência de reconhecimento (MUDBHARY; SADLER, 2011).

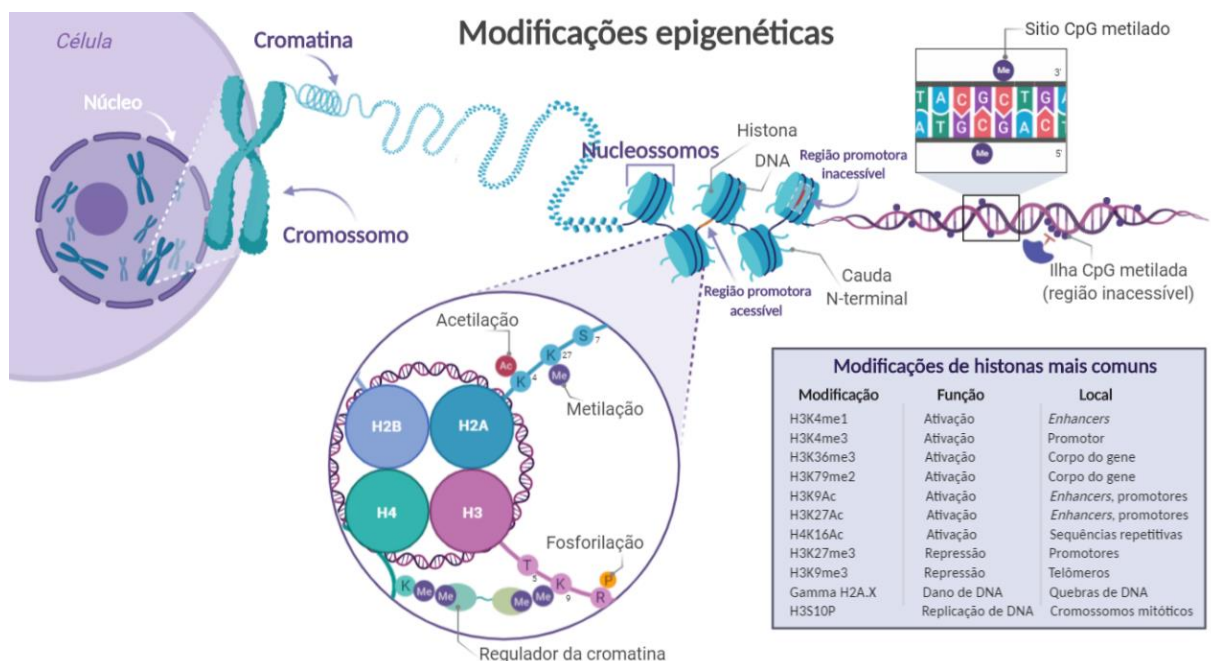
Metiltransferases *de novo* como DNMT3a e DNMT3b têm como substrato as sequências não metiladas na dupla fita, inserindo um grupo metil na posição 5 das citosinas de uma das fitas. Após a divisão celular, a DNMT1, chamada de metiltransferase de manutenção, reconhece as regiões onde os dinucleotídeos CpG estão metilados na fita parental e cataliza a metilação do carbono 5 da citosina na fita recém incorporada, garantindo assim a conservação do estado de metilação após a replicação. Ambas as classes de metiltransferases participam de vários estágios do destino neural e da neurogênese. Durante a diferenciação inicial de neurônios e glia (FENG; CHANG; LI; FAN, 2005), bem como durante estágios posteriores de maturação e função neuronal (LEVENSON; ROTH; LUBIN; MILLER *et al.*, 2006), DNMT3a e DNMT3b são fundamentais. DNMT1 também é crucial no SNC e está envolvida na sinalização JAK-STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) para controle do destino de células precursoras, mudando seu encaminhamento de neurogênese para gliogênese durante o desenvolvimento (FAN; MARTINOWICH; CHIN; HE *et al.*, 2005; NAMIHIRA; KOHYAMA; SEMI; SANOSAKA *et al.*, 2009).

A metilação do DNA também está envolvida no desenvolvimento do giro denteado hipocampal. Durante a migração para o GD, as células neuroepiteliais apresentam uma modulação no padrão de metilação global do DNA conforme se organizam na camada mais interna da estrutura para formação da ZSG. Essa evidência é sustentada por estudos que relataram a diminuição de CPNs no ZSG de camundongos com deficiência de TET1 (*Tet Methylcytosine Dioxygenase 1*), envolvida na desmetilação do DNA (ZHANG; CUI; MURAI; LIM *et al.*, 2013).

Uma segunda modificação epigenética que tem grande importância no hipocampo é a alteração nos aminoácidos que constituem as proteínas histonas. A cromatina é composta por repetições de nucleossomos constituídos por um octâmero proteico (histonas H2A, H2B, H3 e H4) que se associa fisicamente a uma sequência de 147 nucleotídeos (Figura 5) (BARTKE; VERMEULEN; XHEMALCE; ROBSON *et al.*, 2010; JENUWEIN; ALLIS, 2001; KOUZARIDES, 2007; NG; YUE; OPPERMANN; KLOSE, 2009). As histonas possuem caudas amino terminais (N), que estão sujeitas a uma variedade de modificações covalentes ou “marcas”, como

acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. As modificações de histonas específicas do sítio ou domínio do DNA ("código" da histona) exercem controle sobre a ativação ou repressão dos genes associados através da alteração do estado da cromatina (Eucromatina – favorável a transcrição / Heterocromatina – impede a transcrição) (CHEN; CHEN; WU; ZHANG *et al.*, 2015; COLLINS; SWEATT; GREER, 2019; KOUZARIDES, 2007; SANTOS-ROSA; SCHNEIDER; BANNISTER; SHERRIFF *et al.*, 2002; TAVERNA; LI; RUTHENBURG; ALLIS *et al.*, 2007). O código da histona é estabelecido e mantido por dezenas de enzimas modificadoras da cromatina, como histona acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs) e histona metiltransferases (HMTs) e desmetilases (HDMs), que são direcionadas a loci de cromatina específicos, resultando em uma hierarquia regulatória complexa para o controle do genoma (SATO; TSUCHIYA; MELTZER; SHIMIZU, 2011).

FIGURA 5: Modificações epigenéticas.



FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Modificações epigenéticas da cromatina por metilação do DNA e modificações das histonas. A expressão do gene é regulada antes da iniciação da transcrição pela modificação química do DNA ou das histonas que, juntas, formam a cromatina. A estrutura da cromatina depende da carga de suas histonas centrais, promovendo a formação de eucromatina (aberta e acessível a transcrição) ou de heterocromatina (compacta e inacessível). A transferência de um grupo metil em citosinas seguidas de guanina (CpG) forma a 5-metilcitosina, que forma pares de bases com guanina como o normal, mas difere da base não modificada em termos de suas interações com proteínas regulatórias.

A metilação das histonas, especialmente da histona 3 nos resíduos H3K4, H3K36, H3K9 e H3K27, são algumas das principais marcas epigenéticas que

controlam a transcrição em células-tronco e progenitoras no hipocampo (LILJA; HELDRING; HERMANSON, 2013). A metilação de H3K4, especialmente a trimetilação, está intimamente ligada a ativação da transcrição (CHEN; CHEN; WU; ZHANG *et al.*, 2015; COLLINS; SWEATT; GREER, 2019). O domínio SET da histona metiltransferase MLL1 (*Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1*) é responsável pela trimetilação da H3K4, regulando, também, a sua mono e dimetilação (KOUZARIDES, 2007; LIM; HUANG; SWIGUT; MIRICK *et al.*, 2009). Em células-tronco neurais de ratos *Mll1* nocaute, a neurogênese pós-natal é prejudicada (LIM; HUANG; SWIGUT; MIRICK *et al.*, 2009). Além disso, estudos demonstram que, em condições basais, domínios de H3K4me3 demarcam genes de desenvolvimento, aprendizagem e memória em neurônios da região CA1 do hipocampo (COLLINS; GREER; COLEMAN; SWEATT, 2019; COLLINS; SWEATT; GREER, 2019). Já a metilação de H3K9 e H3K27 são marcas características da repressão da expressão gênica (JURY; ABARZUA; DIAZ; GUERRA *et al.*, 2020). H3K9me interage com HP1 (*Heterochromatin protein 1*) e H3K27me recruta o complexo PRC1 (*Protein Regulator of cytokinesis 1*) para formação de heterocromatina (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; JENUWEIN; ALLIS, 2001). No hipocampo, H3K9me3 e H3K9me2 reprimem a transcrição gênica, mantêm a estabilidade do genoma e protegem o DNA contra danos. Entretanto, níveis alterados dessa marca estão associados com envelhecimento, inflamação e diabetes (SNIGDHA; PRIETO; PETROSYAN; LOERTSCHER *et al.*, 2016). Além disso, a redução da H3K9me3 foi relatada como crucial para a consolidação da memória do medo condicional (GUPTA; KIM; ARTIS; MOLFESE *et al.*, 2010), e sua diminuição também está correlacionada com o aumento dos níveis de *Bdnf* no hipocampo (SNIGDHA; PRIETO; PETROSYAN; LOERTSCHER *et al.*, 2016). A modulação de H3K27me durante o desenvolvimento neural também foi observada distribuída ao longo do genoma durante a diferenciação de células-tronco em CPNs e, posteriormente, em neurônios piramidais terminais (MOHN; WEBER; REBHAN; ROLOFF *et al.*, 2008).

1.3.3. Metabolismo energético no hipocampo

A neurogênese pós embrionária é modulada por diversos mecanismos moleculares. Fatores de transcrição impulsionam uma mudança no perfil do

transcriptoma das células durante o desenvolvimento neuronal e fatores extrínsecos, como moléculas de sinalização, também afetam muitas etapas da neurogênese (Revisado em: BECKERVORDER SANDFORTH; ZHANG; LIE, 2015). Curiosamente, estudos “ômicos” já relataram a proliferação de subpopulações de CPNs “dormentes” em resposta à perturbações, como exposição a interferons (ESSERS; OFFNER; BLANCO-BOSE; WAIBLER *et al.*, 2009; LLORENS-BOBADILLA; ZHAO; BASER; SAIZ-CASTRO *et al.*, 2015).

Em condições normais, na neurogênese hipocampal adulta, a oxidação de ácidos graxos é necessária para manutenção e proliferação de CPNs e a lipogênese é crítica para a diferenciação neuronal. Esses processos auxiliam na mudança metabólica para a fosforilação oxidativa durante o desenvolvimento neuronal. Os lipídios, além da glicose, podem ser usados como fonte alternativa de energia no metabolismo da glicose (anaeróbico) (CALVO-GARRIDO; MAFFEZZINI; SCHOBER; CLEMENTE *et al.*, 2019; ZHENG; BOYER; JIN; MERTENS *et al.*, 2016).

Os níveis de ROS são cruciais para determinar o destino da célula (KIM; RHEE; PAIK, 2014), não apenas regulando perfis de expressão de genes específicos por meio de fatores de transcrição, mas também influenciando diretamente as reações enzimáticas. Por exemplo, a cultura de CPNs na presença de antioxidantes melhora a proliferação neuronal (SHABAN; EL-HUSSENY; ABUSHOUK; SALEM *et al.*, 2017), e a regulação dos níveis de ROS foi sugerida como importante para a proliferação de CPNs do hipocampo em embriões de camundongo (YONEYAMA; KAWADA; GOTOH; SHIBA *et al.*, 2010).

Na ausência de oxigênio, o piruvato não entra na mitocôndria, mas é convertido em ácido láctico pela lactato desidrogenase (LDH) (SEMENZA, 2007). Este metabolismo da glicose é muito menos eficiente em termos energéticos, mas algumas células dependem predominantemente da glicólise para manter seu pool de ATP mesmo na presença de oxigênio. Este fenômeno é denominado glicólise aeróbia e é importante para fornecer precursores das vias de biossíntese essenciais, como purinas e pirimidinas, aminoácidos e triglicerídeos, que derivam de intermediários da glicólise e das vias de fosfato de pentose (SCHURR, 2018; TONG; ZHAO; THOMPSON, 2009). Em geral, acredita-se que CPNs quiescentes tenham níveis de ROS mais altos, que diminuem gradualmente durante o estágio progenitor, com níveis baixos de ROS relatados em neurônios maduros (LE BELLE; OROZCO;

PAUCAR; SAXE *et al.*, 2011). Um estudo recente em camundongos sugeriu que os CPNs requerem um pico nos níveis de ROS antes de se proliferarem e, que essa indução precede o redirecionamento do metabolismo energético (ADUSUMILLI; WALKER; OVERALL; KLATT *et al.*, 2019). Os autores também sugeriram que as CPNs podem mudar entre diferentes níveis de indução de proliferação, dependendo dos níveis de ROS, portanto, é provável que vários sinais precisem se reunir para iniciar a neurogênese.

Além da glicose e do lactato, os corpos cetônicos representam um combustível alternativo para os neurônios durante o jejum ou períodos prolongados de exercícios, atingindo até 60-70% do fornecimento total de energia para o cérebro (MORRIS, 2005). Ao contrário dos neurônios, os astrócitos são capazes de realizar a cetogênese fornecendo corpos cetônicos aos neurônios vizinhos (LE FOLL; LEVIN, 2016). Assim, os neurônios podem mudar da oxidação de carboidratos ou lactato para corpos cetônicos em um processo de transição conhecido como 'troca G-para-K' (Revisado em: MATTSON; MOEHL; GHENA; SCHMAEDICK *et al.*, 2020). O efeito dos corpos cetônicos na neurogênese é menos claro, mas foi correlacionado com a melhoria da plasticidade sináptica, aprendizagem espacial, memória e cognição, além de aumentar a expressão do BDNF, promovendo assim a resistência celular

Os astrócitos têm uma alta atividade glicolítica e são os principais consumidores de glicose no cérebro, enquanto consomem apenas cerca de 20% do oxigênio absorvido pelo cérebro (ATTWELL; LAUGHLIN, 2001; GOYAL; HAWRYLYCZ; MILLER; SNYDER *et al.*, 2014). Em contraste, os neurônios são os principais consumidores de oxigênio, com alta taxa metabólica. Isso acontece porque, em vez de alimentar o ciclo de Krebs e utilizar a fosforilação oxidativa, os astrócitos convertem o piruvato em ácido láctico por meio de LDH e o exportam para a matriz extracelular por meio do transportador de monocarboxilato, MCT4, onde é absorvido pelos neurônios (TANG; LANE; KORSACK; PATON *et al.*, 2014). Lá, o lactato é convertido de volta ao piruvato e usado como combustível nas mitocôndrias (BROWN; BALTAN TEKKÖK; RANSOM, 2004; DRINGEN; GEBHARDT; HAMPRECHT, 1993; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994; WYSS; JOLIVET; BUCK; MAGISTRETTI *et al.*, 2011). Os astrócitos, portanto, agem como um tampão, protegendo os neurônios dos níveis instáveis de glicose no sangue, alimentando

continuamente os neurônios com lactato. A capacidade tampão energética dos astrócitos é ainda apoiada pela observação de que, ao contrário dos neurônios, os astrócitos têm a capacidade de armazenar glicogênio, que é decomposto em glicose pela glicogenólise após a atividade sináptica (TANG; LANE; KORSACK; PATON *et al.*, 2014; VILCHEZ; ROS; CIFUENTES; PUJADAS *et al.*, 2007).

1.4. Modelos utilizados para avaliação da DT e SWK

O modelo de estudo da DT se mostra importante não apenas para estudo da SWK. Os mecanismos associados à sua fisiopatologia, como estresse oxidativo, inflamação, excitotoxicidade, edema cerebral, quebra da barreira hematoencefálica e danos microvasculares, também podem ocorrer em diversas doenças neurodegenerativas, nos acidentes vasculares cerebrais e no traumatismo crânio encefálico (JHALA; HAZELL, 2011). Similaridades entre a DT e a Doença de Alzheimer têm sido identificadas, como a presença de alterações cognitivas compatíveis, redução do metabolismo de glicose e da atividade de enzimas dependentes de TPP (Revisado em: GIBSON; HIRSCH; FONZETTI; JORDAN *et al.*, 2016).

O uso de animais em pesquisas neurobiológicas ocorre de forma ampla com o objetivo de compreender o funcionamento do SNC saudável e em estado patológico e de desenvolver tratamentos/ terapias para estas condições (ŻAKOWSKI, 2020). Modelos animais permitem avaliar e manipular variáveis em situações experimentais e suas interações, esclarecendo o papel de diferentes fatores em condições patológicas (VETRENO; HALL; SAVAGE, 2011).

Em uma análise das publicações feitas entre 1946 e 2018 relacionadas ao sistema nervoso, Zakowski (2020) concluiu que as duas espécies de mamíferos mais utilizadas em pesquisas científicas em modelo animal na área de neurociências tem sido *Rattus norvegicus* (rato) e *Mus musculus* (camundongo), correspondendo a 26% e 13% de todas as publicações científicas sobre o sistema nervoso de mamíferos não humanos, respectivamente. Os autores relataram, também, que ratos e camundongos têm sido as espécies de interesse em 39% de todas as publicações em neurociências.

Nas pesquisas sobre a DT, o uso de roedores é bastante difundido pelas similaridades observadas entre a neurodegeneração e a sintomatologia em

humanos e nestes animais (ŻAKOWSKI, 2020). A indução de deficiência de tiamina pode ser feita pela retirada da vitamina da dieta, por um período longo (3-4 semanas), ou, de forma mais rápida (duração aproximada de 16 dias), pela combinação da dieta sem tiamina com administração de inibidores da fosfoquinase, dentre os quais se destaca a piritiamina (PTD – *pyrithiamine-induced thiamine deficiency*) (Revisado em: VETRENO; RAMOS; ANZALONE; SAVAGE, 2012).

No modelo de indução de DT por meio da depleção de tiamina da dieta, dentre outros sintomas, os animais podem apresentar bradicardia, perda de apetite e de peso, hipotermia, maior resposta de sobressalto, alopecia e opistótono (Revisado em: VETRENO; RAMOS; ANZALONE; SAVAGE, 2012). Zhao e colaboradores (2008), identificaram que, após nove dias de privação da vitamina, animais apresentaram prejuízo à neurogênese hipocampal e um declínio da capacidade de aprendizado, que foi revertido com a reposição de tiamina. Entretanto, as lesões neuroanatômicas observadas neste modelo não se apresentaram tão reprodutíveis e difusas quando comparadas à SWK em humanos, tendo sido obtidos melhores resultados com o modelo PTD (Revisado em: BETTENDORFF; WINS, 1999).

Os animais submetidos ao modelo PTD apresentam como primeiro sinal clínico a perda de peso, que ocorre após aproximadamente 11 dias de tratamento. Com a continuidade do tratamento, observa-se também ataxia e diminuição da atividade motora com episódios de hiperatividade, reflexo de endireitamento prejudicado, postura distônica, opistótono e convulsões (ZHANG; WEILERSBACHER; HENDERSON; CORSO *et al.*, 1995). Neste modelo foi observada perda neuronal precoce no tálamo, colículo inferior e oliva inferior, que foi exacerbada na fase mais tardia do tratamento, com a perda do reflexo de endireitamento e o aparecimento de convulsões, no tálamo e mesencéfalo (TODD; BUTTERWORTH, 1998). Por meio da técnica de imunocoloração, observou-se aumento da marcação de GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) a partir do dia 11 e aumento da marcação para ED1 (*Ectodermal dysplasia protein*) a partir do dia oito, em áreas como colículo inferior e tálamo (TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F., 1999). Após nove dias, observa-se ruptura da BBB em regiões cerebrais mais vulneráveis (TODD; BUTTERWORTH, 1998). Prejuízos à memória espacial, ao aprendizado e outras alterações comportamentais também foram observadas em ratos consumindo dietas deficientes

em tiamina associadas a injeções de pirritiamina (LANGLAIS; SAVAGE, 1995; RESENDE; RIBEIRO; WERNER; HALL *et al.*, 2012; ROLAND; SAVAGE, 2007).

Visando reduzir o sofrimento animal e o número de animais utilizados em pesquisa, é importante pensar continuamente em modelos alternativos que reproduzam de forma adequada as alterações fenotípicas causadas pela DT. Estudos utilizando modelos *in vitro* tem sido realizados (LEE; YANG; YONG; LIU *et al.*, 2010; WANG; XU; FRANK; KE *et al.*, 2017; ZHAO; WU; HU; CAI *et al.*, 2014), no entanto, estes podem não refletir o contexto fisiológico do SNC, por exemplo, devido a utilização de um único tipo celular por estudo ou pelo contato reduzido entre as células (HUMPEL, 2015). Ademais, modelos de cultivo celular que envolvem a utilização de células-tronco pluripotentes induzidas a partir de células somáticas, apesar de representarem um enorme avanço científico, “apagam” modificações genéticas e epigenéticas celulares (ROBIN; JAFFREDO; ZAEHRES, 2019). Park, Zhang e Gibson (2001), demonstraram que o co-cultivo de neurônios hipocampais com astrócitos ou micróglia tem papel neuroprotetor na DT, protegendo neurônios do estresse oxidativo e disfunções metabólicas. Evidencia-se, portanto, a importância da diversidade e dinâmicas celulares para uma percepção mais compatível e atenta à complexidade do SNC.

Neste contexto, apresenta-se o modelo de culturas organotípicas de SNC, que consiste no cultivo de fatias de tecido, possibilitando a preservação de diversos aspectos da arquitetura tecidual, diversidade e interconexão celular (Revisado em: HUMPEL, 2015). O cultivo é realizado principalmente com fatias provenientes de animais com idades entre três e dez dias (P3-P10), podendo ser feito à partir de diferentes estruturas do SNC, como córtex, cerebelo e hipocampo (Revisado em: CAVALIERE; BENITO-MUÑOZ; MATUTE, 2016).

Culturas organotípicas de hipocampo (COH) permitem o estudo da neurogênese na estrutura, com a avaliação da proliferação, migração e diferenciação de células-tronco neurais, bem como dos mecanismos de sua integração às circuitarias já existentes no hipocampo e interações com outros tipos celulares como micróglia e astrócitos (Revisado em: CAVALIERE; BENITO-MUÑOZ; MATUTE, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O estudo tem como objetivo investigar, utilizando a plataforma de culturas organotípicas de hipocampo de ratos neonatos, os mecanismos moleculares subjacentes ao desequilíbrio entre morte neuronal e neurogênese associados à deficiência de tiamina no hipocampo.

2.2. Objetivos Específicos

- Validar o modelo de DT em COHs através da avaliação do mecanismo característico de morte neuronal por apoptose;
- Quantificar, em série temporal, o efeito da deficiência de tiamina na densidade de neurônios das COHs;
- Determinar o efeito da deficiência de tiamina na modulação das marcas epigenéticas H3K4me3 e H3K9me3;
- Identificar e validar a assinatura transcricional das COHs com deficiência de tiamina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* neonatos (7 a 10 dias de idade), obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) (FIOCRUZ), para a produção das COHs. Os filhotes foram alojados em grupos de dez por gaiola com uma fêmea lactante. As gaiolas foram mantidas em temperatura e umidade controladas (20-26°C, 40-60% respectivamente), sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas e com água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da FIOCRUZ (licença LW-18/10).

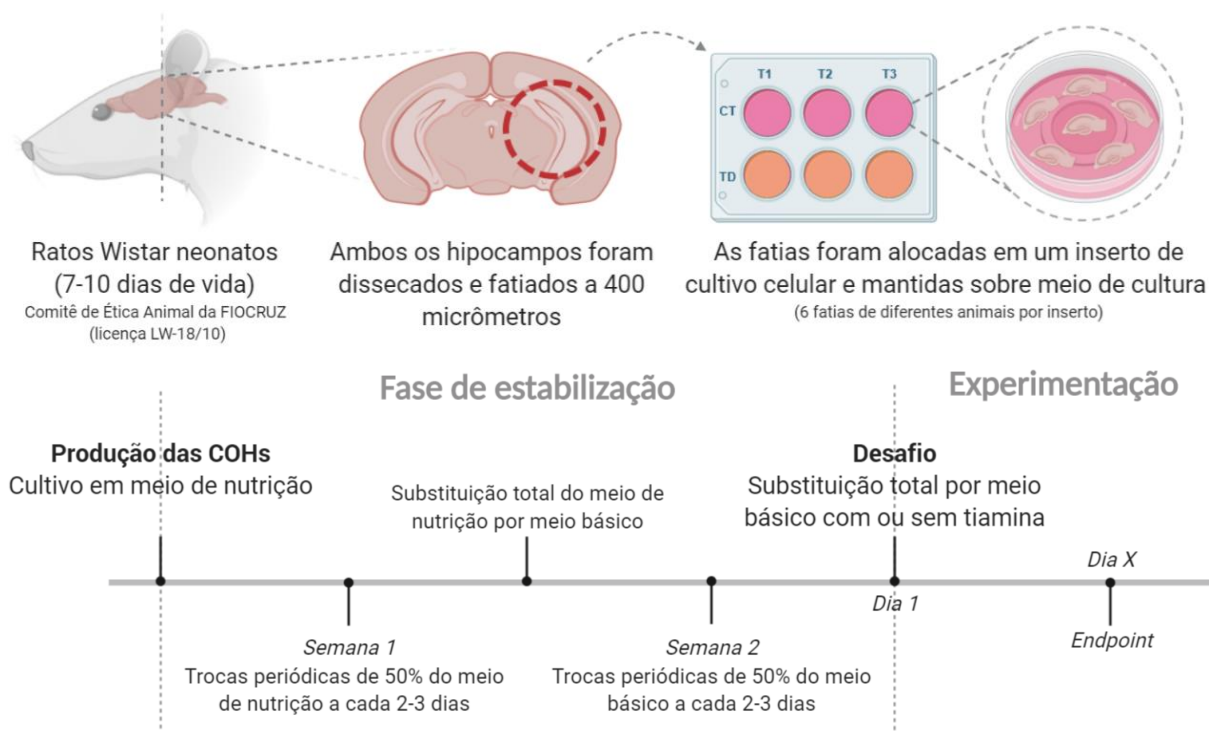
3.2. Cultura organotípica de fatias de hipocampo (COH)

As COHs foram preparadas usando o método descrito por Stoppini e colaboradores (STOPPINI; BUCHS; MULLER, 1991) com modificações (Figura 6). Resumidamente, após a eutanásia, os cérebros foram rapidamente removidos e ambos os hipocampos foram dissecados no meio de cultura básico gelado constituído por 75% de meio mínimo de Eagle (MEM) + HEPES (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) e 25% de solução balanceada de Hank's 1X (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO). Os hipocampos foram cortados transversalmente (400 µm) usando um fatiador de tecidos McIlwain (Mickle Laboratory Engineering Co LDT., Gomshal, Reino Unido) e as fatias foram transferidas para um inserto de cultura celular Millicell (PICMORG50) (Merck, Darmstadt, Alemanha) em uma placa de cultura de 6 poços (6 fatias de diferentes animais por poço).

Os insertos foram mantidos sobre 1 mL de meio de cultura de nutrição constituído por 50% de meio MEM + HEPES, 25 % de solução balanceada de Hank's 1X e 25% de soro equino inativado (Bio Nutrientes, Barueri, Brasil) para inibição da neurogênese durante a fase de estabilização das culturas. Após 7 dias, o meio de nutrição foi substituído pelo meio básico, sem soro equino, para permitir a neurogênese (RAINETEAU; RIETSCHIN; GRADWOHL; GUILLEMOT *et al.*, 2004). As COHs foram mantidas por 14 dias em estufa à 37°C com injeção de 5% de CO₂. A cada 2-3 dias, 50% do meio básico foi trocado para renovação dos nutrientes necessários.

Após a fase de estabilização, as COHs foram organizadas em grupos (DT e controle), sendo as culturas do grupo DT desafiadas através da substituição do meio básico descrito anteriormente por meio básico sem tiamina até o fim de cada experimento (Figura 7).

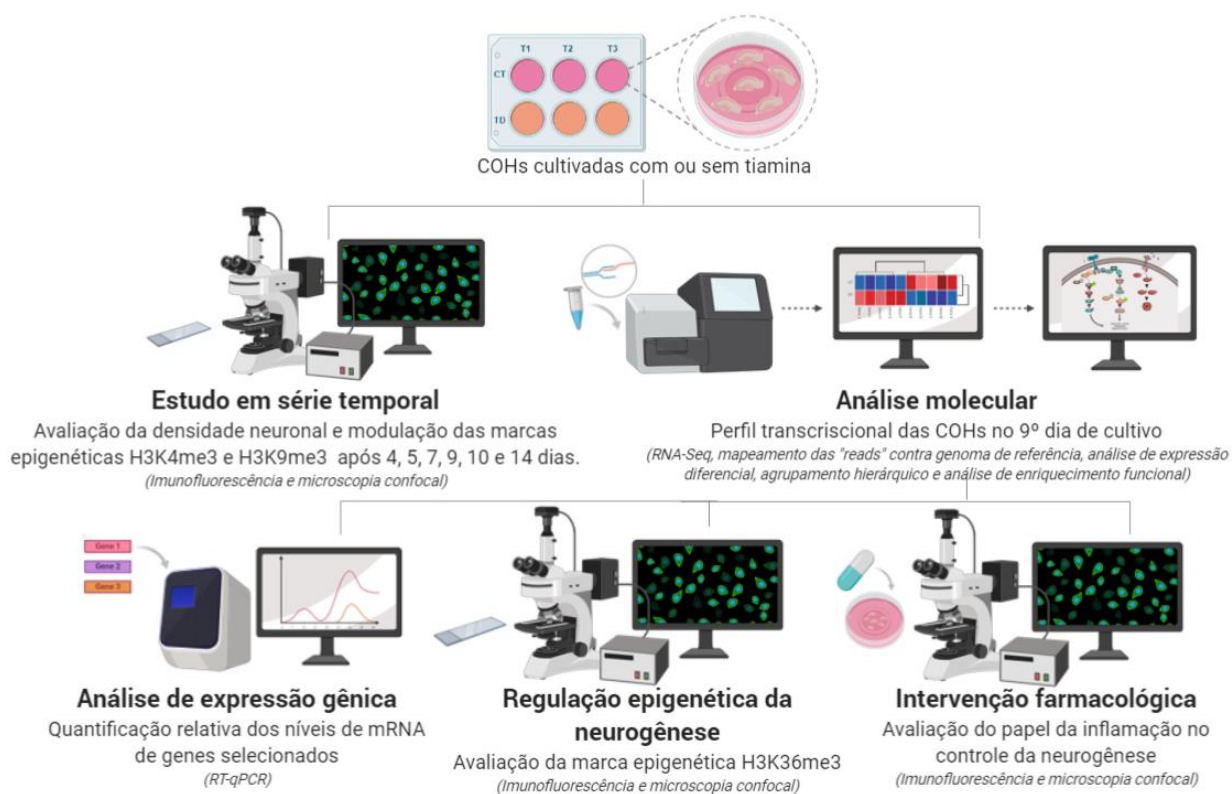
FIGURA 6: Preparação de culturas organotípicas de fatias do hipocampo e linha temporal de cultivo



FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Para remover o hipocampo, os animais foram eutanasiados por decaptação. Após a abertura do crânio, as conexões com o fórnice foram cortadas e o hipocampo gentilmente retirado do cérebro. Os hipocampus foram posicionados em uma lâmina de vidro para o fatiamento e as fatias obtidas foram transferidas para membranas semiporosas em uma interface ar-líquido em placas de seis poços (seis fatias de animais diferentes por inserto). O meio de cultura estava localizado abaixo da membrana e as fatias eram nutridas por capilaridade. Na primeira semana de cultivo, os insertos foram mantidos sobre 1 mL de meio de cultura de nutrição para inibição da neurogênese. Após 7 dias, o meio de nutrição foi substituído pelo meio básico, sem soro. Após a fase de estabilização, as COHs foram organizadas em grupos cultivados com ou sem tiamina até o fim de cada experimento.

FIGURA 7: Fluxograma de estratégias metodológicas utilizadas no estudo



FONTE: Elaborado pelo autor.

3.3. Imunofluorescência

As COHs foram imunocoradas de acordo com o protocolo de Gogolla e colaboradores (GOGOLLA; GALIMBERTI; DEPAOLA; CARONI, 2006) utilizando 0,05% Tween 20 em PBS como solução de permeabilização. Os neurônios maduros foram marcados com anticorpos de coelho ou camundongo conjugados com o fluoróforo Cy3 (Merck, #ABN78C3 ou #MAB377C3, 1:100). Micróglia ativada e histona H3 trimetilada em diferentes resíduos de lisina foram marcadas indiretamente com os anticorpos primários anti-Iba1 (Abcam, #AB178847, 1:100), anti-H3K4me3 (Merck, #05-1339, 1:500), anti-H3K9me3 (Merck, #07-442, 1:500) e anti-H3K36me3 (Abcam, #AB9050, 1:200) respectivamente. Como anticorpos secundários, foram utilizados anti-IgG de coelho (Thermo Fisher, #A11034, 1:400) ou camundongo (Thermo Fisher #A10684, 1:20000) conjugados com fluoróforo Alexa Fluor 488.

A fragmentação do DNA típica de células apoptóticas foi avaliada com o ensaio TUNEL (Thermo Fisher), realizado de acordo com as instruções do fabricante.

As COHs foram contra coradas DAPI (ThermoFisher) e montadas em lâminas de vidro para microscopia com ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher).

3.4. Microscopia confocal à laser

Pilhas de imagens *z-series* (~12 imagens ópticas com 2,79 μm de espessura cada) de amplificação de 10 X das COHs imunocoradas foram obtidas utilizando o microscópio confocal Nikon Eclipse Ti (Nikon, Tóquio, Japão) com filtro de comprimento de onda 488/561. Os parâmetros limiares de cada laser foram ajustados com um controle negativo (sem o anticorpo primário) para remover ruídos de fundo e autofluorescência do tecido. Para aquisição, foram selecionadas regiões das COHs com maior preenchimento neuronal (correspondente à fluorescência NeuN+) ou de micróglia ativada (correspondente à fluorescência Iba1+). As pilhas de imagens *z-series* foram deconvoluídas e analisadas com as ferramentas do software NIS-Elements Analysis. Resumidamente, o canal Cy3 (correspondente à fluorescência NeuN+) foi tratado com as ferramentas *Noise Reduction*, *Gauss-Laplace Sharpen* e *Local Contrast*. A área total do tecido foi determinada por uma máscara binária automática sob o canal DAPI, permitindo a delimitação apenas dos espaços preenchidos por tecido. Para a contagem de neurônios maduros, outra máscara binária foi criada, com base no campo anterior, onde apenas marcações do canal Cy3 com limiar de fluorescência >10 A.U foram selecionadas e quantificadas, gerando o valor de densidade neuronal (NeuN+/ mm^2). O mesmo foi feito para a contagem de micróglia ativada, onde apenas áreas com marcações do canal Alexa Fluor 488 com limiar de fluorescência >10 A.U. foram selecionadas e medidas, gerando o valor da densidade de micróglia ativada (Iba1+/ mm^2). Finalmente, os neurônios com dupla marcação (NeuN+ e TUNEL+, H3K4me3+, H3K9me3+ ou H3K36me3+) foram quantificados utilizando a ferramenta *Interest Region Manager (ROI)*, onde foram detectadas regiões de interseção entre as marcações dos canais Cy3 e Alexa Fluor 488. Essa estratégia, possibilitou o cálculo de porcentagem de neurônios maduros TUNEL+ (%NeuN+ TUNEL+), e cálculo da intensidade de fluorescência (IF) para marcação de trimetilação da H3 em diferentes resíduos de lisina, normalizada pelo número de neurônios positivos para essas marcas epigenéticas (Soma IF H3K_me3/NeuN+H3K_me3+).

3.5. RNA-Seq

O RNA total das COHs (cada amostra equivale a um *pool* de 3 fatias de animais diferentes) foi extraído usando o kit miRNeasy Mini (#217004) (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras tiveram seu RNA quantificado por fluorometria usando o Qubit RNA HS Assay Kit (#Q32852) (Invitrogen, Carlsbad, CA) com Fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen) e tiveram sua qualidade avaliada por eletroforese capilar com o kit Agilent RNA 2100 Nano (Bioanalyzer, Santa Clara, CA).

Em seguida, as amostras foram encaminhadas para a Plataforma de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) do Instituto René Rachou, onde as bibliotecas de cDNA foram produzidas com o kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina, San Diego, CA) e os fragmentos indexados foram sequenciados no NGS NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA), com o kit TG NextSeq 500/550 High Output v2 (Illumina, San Diego, CA).

3.6. Análises de Bioinformática

As *reads* brutas foram processadas com o *software* Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), removendo adaptadores, bases de baixa qualidade ou *reads* muito curtas (menores que 36nt). As *reads* filtradas foram alinhadas ao genoma de referência de *Rattus norvegicus* (release 94) utilizando o *software* STAR (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*) (DOBIN; DAVIS; SCHLESINGER; DRENKOW *et al.*, 2013) e somente *reads* mapeadas em um único sítio do genoma foram utilizadas para calcular o número de *reads* e o valor de *reads* por kilobase de transcrito por milhão de *reads* mapeadas (RPKM) (MORTAZAVI; WILLIAMS; MCCUE; SCHAEFFER *et al.*, 2008) para cada gene. A análise de contraste entre os grupos DT e controle foi realizada com o pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Genes com *Fold Change* superior a 1,5 e valor de *P* inferior a 0,01 obtidos na Análise de *False Discovery Rate* (FDR) foram considerados diferencialmente expressos. Os *scripts* utilizados estão descritos no Apêndice A e B.

A lista de genes diferencialmente expressos (Apêndice C) foi submetida ao *software* GenePattern (REICH; LIEFELD; GOULD; LERNER *et al.*, 2006) para análise de agrupamento hierárquico utilizando a correlação de Spearman como

método de comparação e *average linkage* como método de ligação. A análise de enriquecimento funcional de genes diferencialmente expressos foi realizada com o *web-based software Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) versão 6.8 do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009) e com o IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*) (Qiagen).

3.7. PCR quantitativa em Tempo Real

As amostras de RNA foram obtidas conforme descrito acima, a partir de um *pool* de 6 COHs (duas por animal) cultivadas com ou sem tiamina por 4, 7 e 9 dias. O cDNA foi sintetizado a partir de 0,5 a 1 µg de RNA total utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher), de acordo com o protocolo do fabricante. Ensaios de expressão gênica TaqMan (ThermoFisher) específicos para rato foram utilizados para detectar *Mmp9* (*Matrix Metalloproteinase 9*) (Rn00579162_m1), *C3* (*Complement C3*) (Rn00566466_m1), *Lcn2* (*Lipocalin 2*) (Rn00590612_m1), *Ogdh* (*Oxoglutarate dehydrogenase*) (Rn01443655_m1), *NeuroD1* (*Neuronal Differentiation 1*) (Rn01280117_m1), *Bdnf* (*Brain derived neurotrophic fator*) (Rn01484928_m1), *Nsd1* (*Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1*) (Rn01441947_m1) e *Bmp4* (*Bone Morphogenetic Protein 4*) (Rn00432087_m1). Para todos os ensaios RTq-PCR, os níveis de expressão dos genes-alvo foram normalizados para os níveis do gene endógeno *Ppia* (*Peptidylprolyl isomerase A*) (Rn00690933_m1). As reações de qPCR foram feitas com TaqMan Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher) acrescido de 10 ng/µL de cDNA em volume final de 10 µL. A ciclagem térmica e detecção de fluorescência foi realizada utilizando o sistema de PCR em tempo real ViiA 7 (ThermoFisher) de acordo com as recomendações do fabricante. A expressão relativa dos genes-alvos foi calculada através do método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.8. Intervenção com fármaco anti-inflamatório

Um tratamento com anti-inflamatório foi utilizado para testar a relação causal entre neuroinflamação e neurogênese na deficiência de tiamina. As COHs foram incubadas com Resveratrol (RSV) (Sigma Aldrich) a 5, 50 e 100 µM por 3 dias a partir do quarto dia de cultivo com meio básico livre de tiamina.

3.9. Análises estatísticas

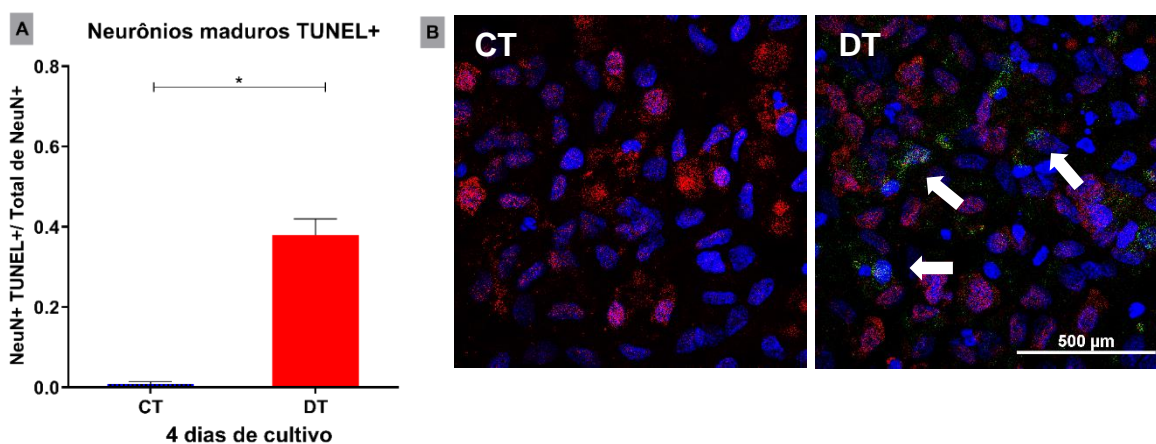
As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism (versão 8.02) (GraphPad Software Inc., Irvine, CA). Para análise da normalidade dos dados foram realizados os testes D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparação entre dois grupos. A Análise de Variância (ANOVA) bidirecional seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey's, ou por teste t de Student para múltiplas comparações (Holm-Sidak) (dependendo da normalidade dos dados), foram utilizados para comparações envolvendo o efeito de dois fatores em uma variável dependente em três ou mais grupos. Os dados foram expressos como mediana \pm interquartil ou média \pm desvio padrão. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Alterações fenotípicas associadas à DT em COHs

Após quatro dias de cultivo em privação de tiamina, foi observado, com as análises de imunofluorescência e microscopia confocal, um aumento no número de neurônios NeuN+ e TUNEL+ (Figura 8). No quinto dia de cultivo, essas COHs apresentaram uma redução de 71% na densidade neuronal quando comparados ao grupo controle (Gráfico 1). Curiosamente, entre o décimo e o décimo quarto dia de privação de tiamina, foi observado pulso de neurogênese, onde a densidade de neurônios maduros volta aos níveis encontrados nas COHs controles, seguido de nova perda massiva dessa população celular. Esses resultados comprovam a existência de uma janela temporal na qual é possível a neuroregeneração do tecido hipocampal privado de tiamina.

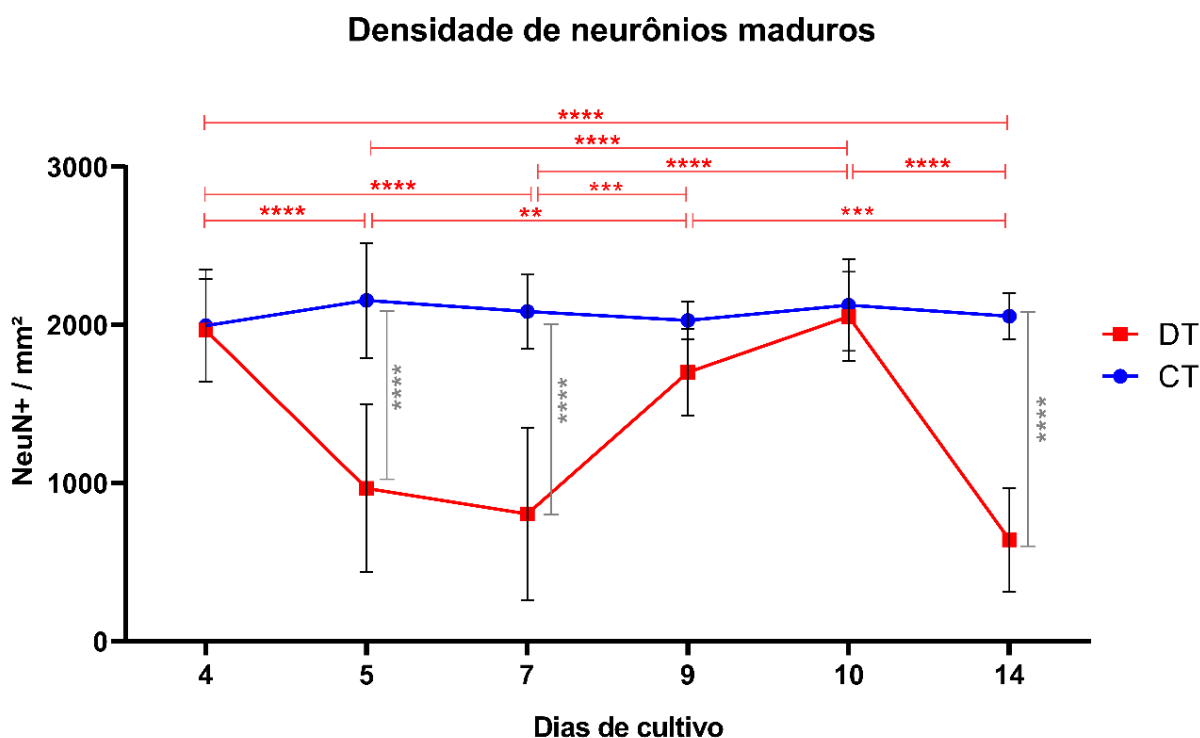
FIGURA 8: A DT causa morte por apoptose de neurônios hipocampais maduros.



FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: O ensaio TUNEL detecta a fragmentação do DNA típica de apoptose (setas no painel B). **A-** Porcentagem de neurônios marcados com TUNEL após 4 dias de privação de tiamina. As medianas dos grupos CT (Controles) e DT (Deficiência de Tiamina) foram comparadas com o teste de Mann-Whitney e os dados foram expressos como mediana \pm interquartil. Diferenças com valores de P inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas ($* = P \leq 0,05$). **B-** Micrografias confocais (100x) de COH com marcações de neurônios maduros (NeuN+) em vermelho, núcleo celular (DAPI) em azul e apoptose (TUNEL+) em verde. Barra = 500 μ m

GRÁFICO 1: Análise temporal da densidade de neurônios maduros durante 14 dias de cultivo com ou sem tiamina.

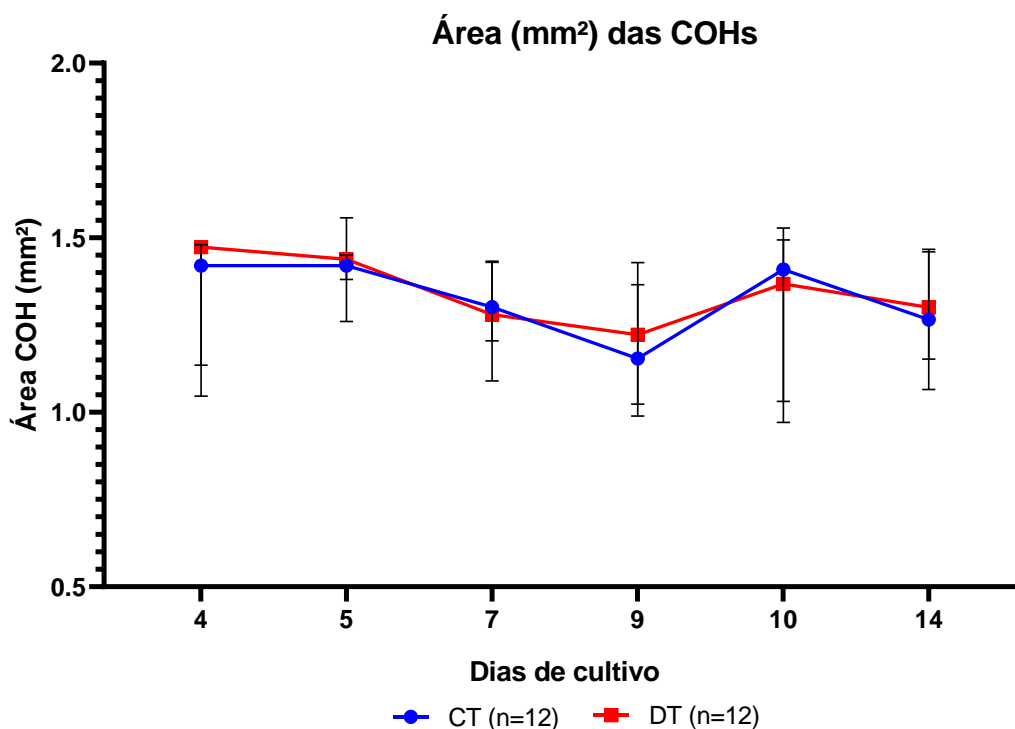


FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: As COHs desafiadas com privação de tiamina tiveram uma perda de aproximadamente 71% da densidade média de neurônios a partir do quinto dia. Surpreendentemente, entre o sétimo e o décimo quarto dia de cultivo sem tiamina, foi observado um pulso de neurogênese seguido de nova perda massiva de neurônios. As médias dos grupos CT (Controles) (n=12) e DT (Deficiência de Tiamina) (n=12) foram comparadas com o teste de Análise de Variância (ANOVA) bidirecional seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey's. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e diferenças com valores de P inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** = $P \leq 0,0001$). As diferenças estatísticas representadas em vermelho são referentes à variação da densidade neuronal no grupo DT entre os diferentes tempos de cultivo. Já as representações em cinza, são referentes às diferenças intergrupos (CT versus DT) nos tempos correspondentes.

O Gráfico 2 mostra média da área das COHs durante 14 dias de cultura com ou sem tiamina. Durante o cultivo, a área (mm²) das COHs não apresentou variações significativas, indicando que as alterações observadas na densidade de neurônios das COHs desafiadas com privação de tiamina não se devem a compactação das culturas.

GRÁFICO 2: Análise temporal da variação da área (mm²) das COHs durante 14 dias de cultivo com ou sem tiamina.

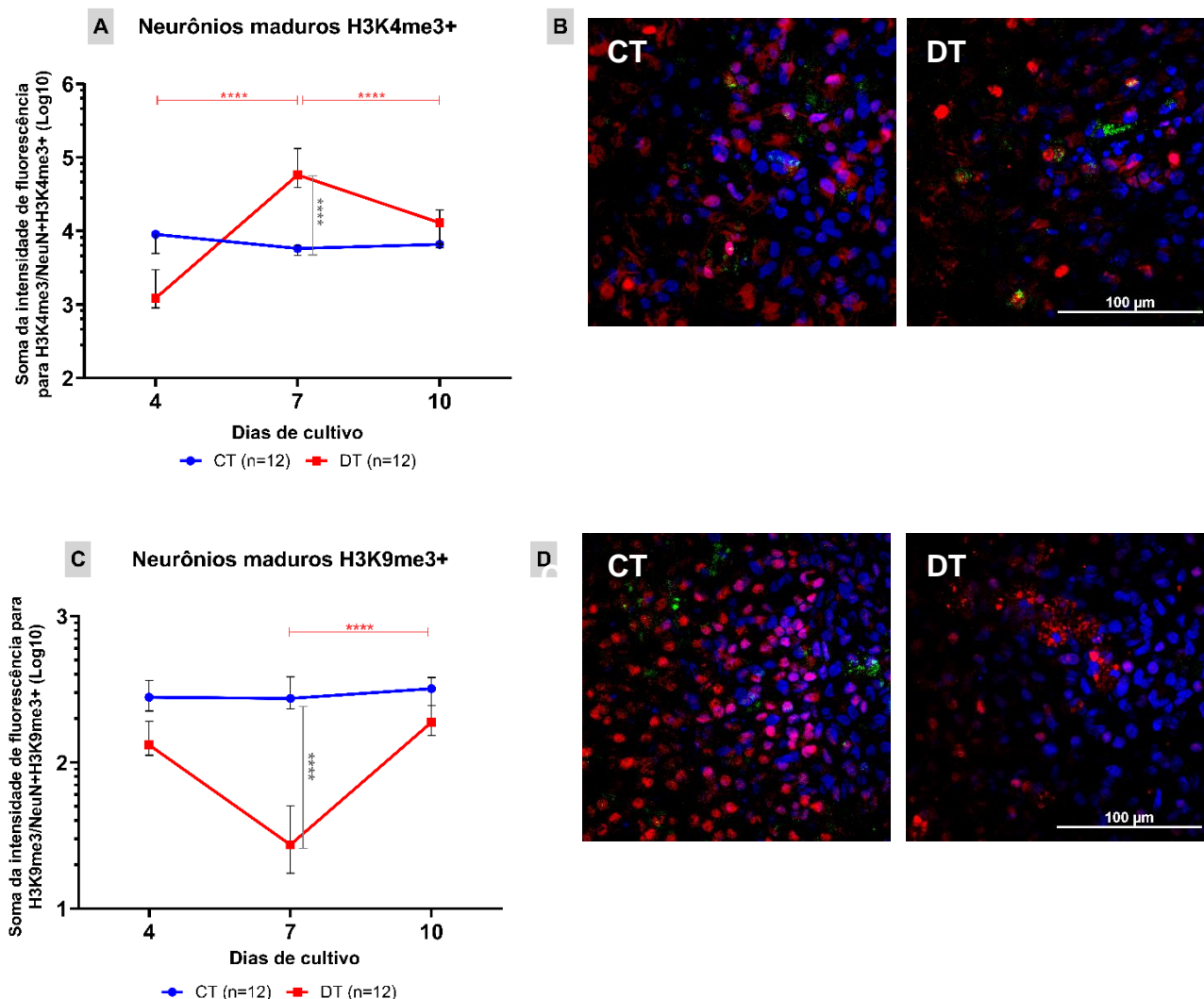


FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: A área das COHs desafiadas ou não com privação de tiamina não apresentou variação significativa durante o cultivo. As médias dos grupos CT (Controles) e DT (Deficiência de Tiamina) foram comparadas com o teste de Análise de Variância (ANOVA) bidirecional seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey's. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e diferenças com valores de P inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** = $P \leq 0,001$, **** = $P \leq 0,0001$).

A regulação epigenética da expressão gênica também parece ter um papel importante na fisiopatologia da DT. A Figura 9 mostra a intensidade de fluorescência para as marcas de trimetilação da histona H3 nas lisinas 4 e 9 normalizadas pelo número de neurônios maduros (NeuN+) com essas marcações após 4, 7 e 10 dias de cultura com ou sem tiamina. O aumento da marca H3K4me3 e diminuição da H3K9me3 no sétimo dia de privação de tiamina indicam uma regulação epigenética do estado da cromatina favorável ao aumento da expressão gênica, necessária para a neuroregeneração observada nos dias posteriores.

FIGURA 9: Efeitos da privação de tiamina em marcas epigenéticas de metilação da histona H3 em COHs cultivadas durante 4, 7 e 10 dias.



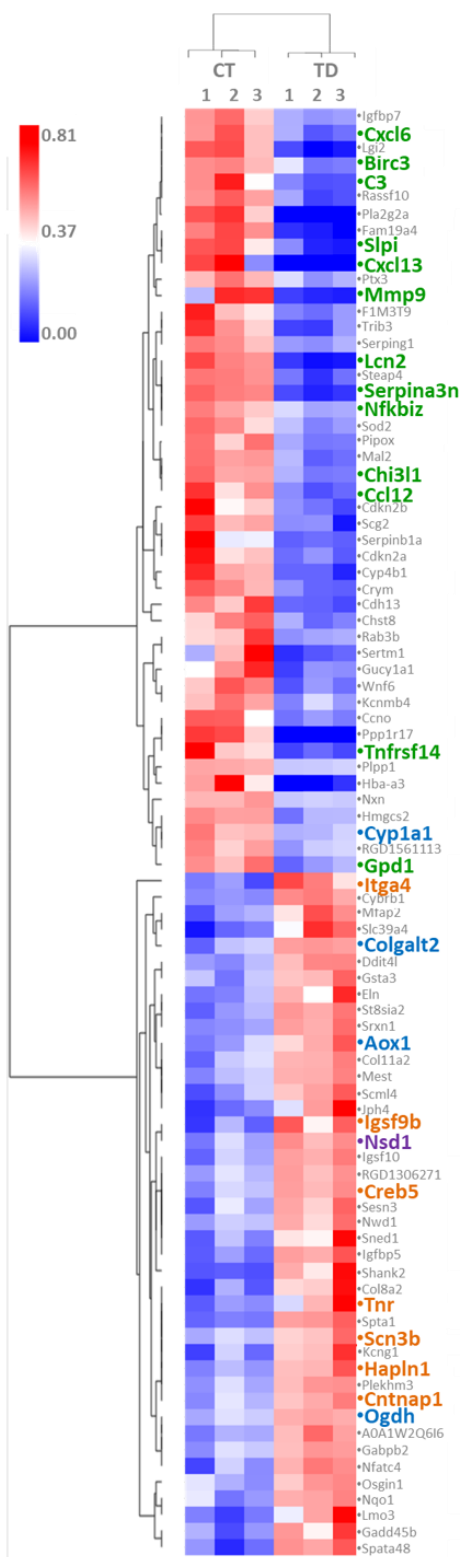
FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: A trimetilação das lisinas 4 e 9 na histona H3 modulam a acessibilidade da cromatina, aumentando (H3K4me3) ou inibindo (H3K9me3) a expressão gênica. **A e C**- Soma da intensidade de fluorescência da marca H3K4me3 (A) e H3K9me3 (B) normalizada pelo número de neurônios maduros identificados com essas marcações, após 4, 7 e 10 dias de cultivo com ou sem tiamina. As médias dos grupos CT (Controles) e DT (Deficiência de Tiamina) foram comparadas com o teste de Análise de Variância (ANOVA) bidirecional seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey's. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e diferenças com valores de P inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas (**** = $P \leq 0,0001$). As diferenças estatísticas representadas em vermelho são referentes à variação da marca epigenética no grupo DT entre os diferentes tempos de cultivo. Já as representações em cinza, são referentes as diferenças intergrupos (CT *versus* DT) nos tempos correspondentes. **B e D** - Micrografias confocais (60x) de COH com marcações de neurônios maduros (NeuN+) em vermelho, núcleo celular (DAPI) em azul e marcas epigenéticas H3K4me3 ou H3K9me3 em verde após 7 dias de cultivo com ou sem tiamina. (barra = 100 μ m).

4.2. Perfil Transcricional das COHs

Apesar de décadas de pesquisas sobre a DT, este é o primeiro estudo a reportar uma janela temporal de recuperação hipocampal durante a privação de tiamina. Para elucidar os mecanismos ligados à neuroregeneração observada, o perfil transcricional de COHs cultivadas por nove dias sem e com tiamina foram comparados. A análise de contraste evidenciou 89 genes diferencialmente expressos, sendo 42 genes com aumento e 47 com diminuição em sua expressão no grupo DT comparado ao controle (Figura 10) (Apêndice C). A análise de enriquecimento funcional com o *software* DAVID (Apêndice D) revelou que o conjunto de genes com expressão aumentada em DT está enriquecido em codificadores de componentes das vias *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) de Metabolismo de triptofano (map00380), Degradação de lisina (map00310), Interação ECM (*Extracellular matrix*)-receptor (map04512), Sinalização PI3K-Akt (*Phosphatidylinositol 3-kinase - Protein kinase B*) (map04151) e Adesão focal (map04510). Este subconjunto de genes também foi encontrado enriquecido em anotações de GO (*Gene Ontology*) relacionadas à regulação positiva da transmissão sináptica (*positive regulation of synaptic transmission*, [GO:0050806]), ao desenvolvimento do sistema nervoso (*nervous system development* [GO:0007399]), à regulação da plasticidade sináptica (*regulation of synaptic plasticity* [GO:0048167]) e à potenciação sináptica de longa duração (*long-term synaptic potentiation* [GO:0060291]). Embora a análise de enriquecimento funcional não o tenha associado a nenhuma via KEGG, o gene *Nsd1*, que tem anotações GO relacionadas à inibição da neurogênese através da regulação da metilação da histona H3 na lisina 36 (*positive regulation of transcription, DNA-templated* [GO:0045893]; *regulation of histone H3-K36 methylation* [GO:0000414]; *regulation of peptidyl-serine phosphorylation* [GO:0033135]; *regulation of RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding* [GO:1903025]), também teve sua expressão aumentada no grupo DT quando comparado ao controle.

FIGURA 10: Dendrograma e mapa de calor representando o agrupamento hierárquico e níveis de expressão dos 89 genes diferencialmente expressos no grupo DT em comparação ao controle.



FONTE: Elaborado pelo autor

LEGENDA: Os valores de *Fold Change* foram comparados por correlação de Spearman, *average linkage* e as cores do mapa de calor foram normalizados pelo Z-Score global. Dentre os genes diferencialmente no contraste entre DT e CT, foram observados genes relacionados à resposta inflamatória (verde), metabolismo celular (azul), ciclo celular, diferenciação e sobrevivência celular

(laranja) e à regulação epigenética da neurogênese (roxo). CT = Controles, TD = Deficiência de tiamina.

Concomitantemente, dentre os genes que tiveram sua expressão diminuída pela DT, diversos codificam componentes das vias KEGG de Metabolismo de glicerofosfolípídeos (map00564), Sinalização de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (map04668), Ciclo celular (map04110) e Sinalização de FoxO (*Forkhead box class O*) (map04068) e têm anotações GO relacionadas à resposta inflamatória (*Inflammatory response* [GO:0006954], *Immune response* [GO:0006955], *Chemokine-mediated signaling pathway* [GO:0070098], *Cellular response to TNF* [GO:0071356], *Cellular response to IL-1* [GO:0071347]).

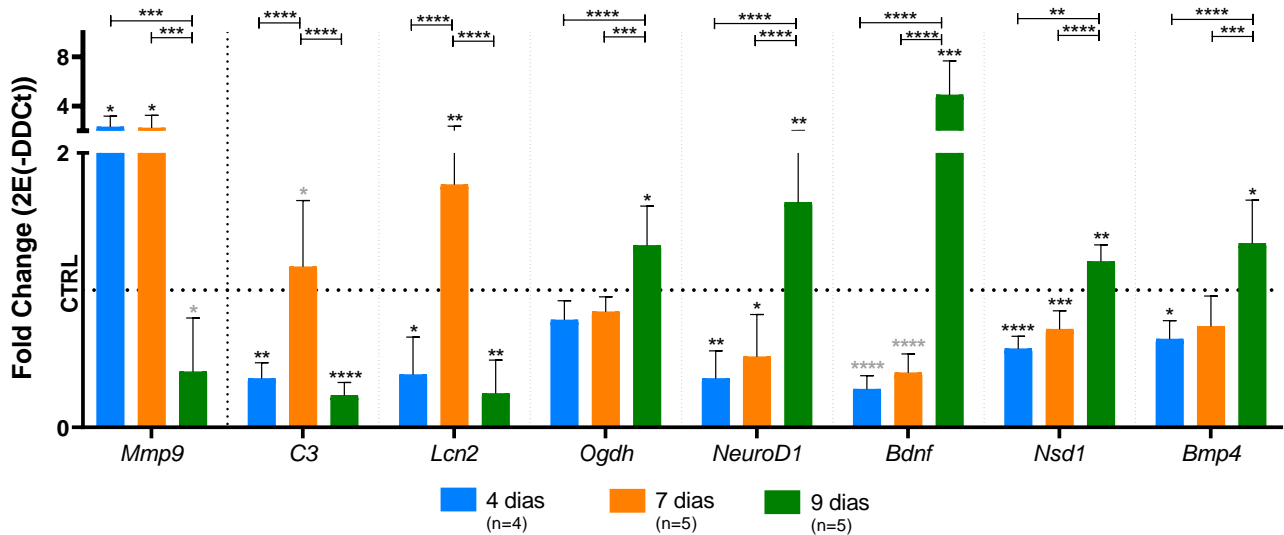
As análises de enriquecimento funcional realizadas com o *software* IPA (Apêndice E) indicaram a inibição de vias canônicas relacionadas à sinalização de neuroinflamação. Os genes codificadores das proteínas *NRF2* (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), *CREB1* (*cAMP responsive element binding protein 1*), *IFNG* (*Interferon gamma*), *TNF* e *TGFB1* (*Transforming Growth Factor Beta 1*) foram preditos como moléculas potencialmente inibidas nas COHs do grupo DT. Ademais, os resultados obtidos com o IPA apontaram a diminuição da expressão da APP como um possível regulador central para a redução da neuroinflamação nas COHs desafiadas com privação de tiamina.

4.3. Análise em série temporal de genes selecionados a partir da análise do transcriptoma relacionados à inflamação, ao metabolismo energético e à neurogênese

As análises do transcriptoma revelaram alguns genes chave potencialmente relacionados ao fenótipo de neurorregeneração observado nas COHs cultivadas por 9 dias sem tiamina. Os níveis de expressão dos genes *Mmp9*, *C3*, *Lcn2*, *Ogdh*, *NeuroD1*, *Bdnf*, *Nsd1* e *Bmp4*, foram avaliados por RT-qPCR após 4, 7 e 9 de cultivo com ou sem tiamina (Gráfico 2). Consoante aos resultados obtidos com o RNA-Seq (Tabela 1), os genes de resposta inflamatória, *Mmp9*, *C3* e *Lcn2*, apresentaram níveis de expressão gênica significativamente baixos nas COHs em DT durante a fase de recuperação dessas culturas. Concomitantemente, os níveis de *Ogdh*, *NeuroD1*, *Bdnf*, *Nsd1* e *Bmp4* aumentaram durante a janela temporal de neurorregeneração.

De acordo com a análise de correlação de Pearson (Tabela 2), os níveis de expressão dos genes de resposta inflamatória apresentam uma tendência de correlação negativa com os dos genes de neurogênese e sinaptogênese, entretanto, somente *Mmp9* apresenta coeficientes considerados estatisticamente significativos neste cenário. Além disso, os níveis de *Nsd1* e *Bmp4* possuem correlação positiva, bem como em relação a *Bdnf* e *Ogdh*. Em conjunto, esses resultados, além de validarem os achados da análise do perfil transcricional das COHs em supressão de tiamina por nove dias, comprovam uma correlação significativa entre a redução da resposta inflamatória e o pulso neurogênico observado.

GRÁFICO 3: Quantificação relativa da expressão de uma seleção de genes relacionados à inflamação, metabolismo energético e neurogênese em COHs cultivadas por 4, 7 e 9 dias em DT.



FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Os valores de *Fold Change* foram obtidos pelo cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, portanto, a linha pontilhada indica o nível de expressão basal média do respectivo gene no grupo controle (CTRL). As médias dos grupos CT (Controles) e DT (Deficiência de Tiamina) foram comparadas com o teste de Análise de Variância (ANOVA) bidirecional seguido pela análise de múltiplas comparações de Tukey's. Os grupos CT e DT também foram analisados separadamente com teste t de Student (*P-value* em cinza) para identificar possíveis diferenças estatísticas devido poder estatístico do método de múltiplas comparações. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e diferenças com valores de *P* inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** = $P \leq 0,0001$).

TABELA 1: Valores de *Fold Change* e *P* dos genes selecionados alterados pela DT em COHs cultivadas por 9 dias.

Gene	Fold Change	RNA-Seq	RTqPCR	
		Adj-P value	Fold Change	Adj-P value
Mmp9	0,543	6,51E-07	0,405	2,81E-02
C3	0,551	3,01E-06	0,232	<1,00E-06
Lcn2	0,355	5,19E-22	0,246	3,71E-04
Ogdh	1,549	1,80E-08	1,325	3,55E-02
NeuroD1	ns	ns	1,641	1,21E-02
Bdnf	ns	ns	4,910	1,30E-02
Nsd1	1,627	3,90E-05	1,208	5,04E-03
Bmp4	ns	ns	1,325	4,32E-02

Correlações com valores de *P* inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas
ns = não significativo

Adj-P value = Valor de *P* ajustado para teste estatístico de múltiplas comparações.

Mmp9= *Matrix Metalloproteinase 9* (ENSRNOG00000017539), *C3* = *Complement C3* (ENSRNOG00000046834), *Lcn2* = *Lipocalin-2* (ENSRNOG00000013973), *Ogdh* = *Alpha-ketoglutarate dehydrogenase* (ENSRNOG00000005130), *NeuroD1* = *Neurogenic differentiation 1* (ENSRNOG00000005609), *Bdnf* = *Brain-derived neurotrophic factor* (ENSRNOG00000047466), *Nsd1* = *Nuclear receptor-binding SET domain protein 1* (ENSRNOG00000016945)

FONTE: Elaborado pelo autor.

TABELA 2: Coeficientes de correlação de Pearson entre o nível de expressão dos genes selecionados alterados pela DT nas COHs.

	Nsd1	Bmp4	Ogdh	Mmp9	C3	Lcn2	NeuroD1	Bdnf
Nsd1	1,000							
Bmp4	0,996*	1,000						
Ogdh	0,994	0,999*	1,000					
Mmp9	-0,985	-0,996*	-0,998*	1,000				
C3	-0,418	-0,499	-0,517	0,570	1,000			
Lcn2	-0,382	-0,465	-0,483	0,537	0,999*	1,000		
NeuroD1	0,995	1,000**	0,999**	-0,997*	-0,507	-0,472	1,000	
Bdnf	0,982	0,995	0,997*	-0,999**	-0,583	-0,551	0,996*	1,000

Correlações com valores de *P* inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$)

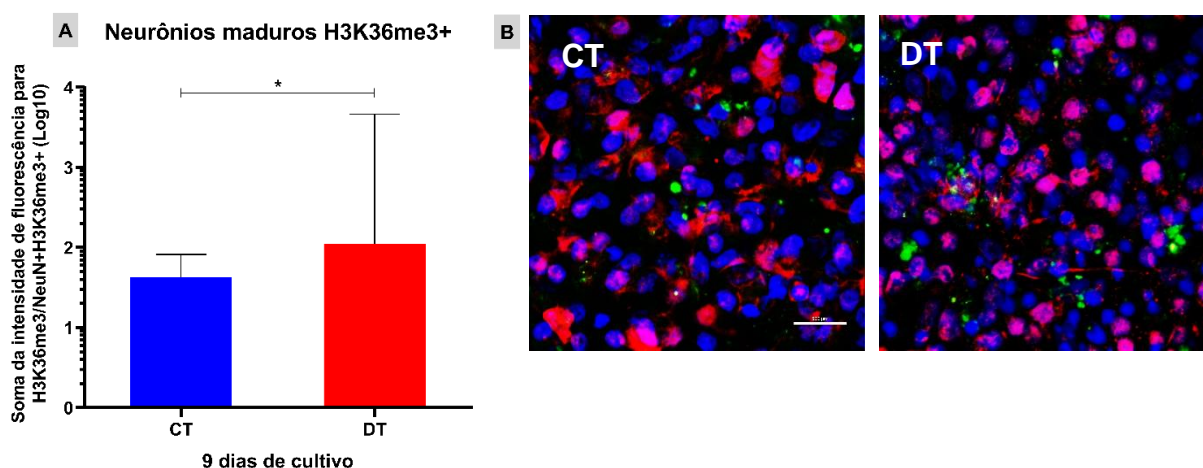
Mmp9= *Matrix metalloproteinase 9* (ENSRNOG00000017539), *C3* = *Complement C3* (ENSRNOG00000046834), *Lcn2* = *Lipocalin-2* (ENSRNOG00000013973), *Ogdh* = *Alpha-ketoglutarate dehydrogenase* (ENSRNOG00000005130), *NeuroD1* = *Neurogenic differentiation 1* (ENSRNOG00000005609), *Bdnf* = *Brain-derived neurotrophic factor* (ENSRNOG00000047466), *Nsd1* = *Nuclear receptor-binding SET domain protein 1* (ENSRNOG00000016945)

FONTE: Elaborado pelo autor.

4.4. Avaliação da marca epigenética H3K36me3 relacionada ao controle da neurogênese

As análises de enriquecimento funcional também indicaram um processo de inibição da neurogênese por regulação epigenética após o repovoamento observado nas COHs cultivadas a 9 dias em privação de tiamina. A proteína codificada pelo gene *Nsd1* é responsável pela mono e dimetilação da histona H3 na lisina 36. A trimetilação desse resíduo na H3, por sua vez, pode aumentar a expressão do gene *Bmp4*, importante inibidor da neurogênese. A Figura 11 mostra a intensidade de fluorescência para a marca H3K36me3, normalizada pelo número de neurônios maduros (NeuN+) com esta marca epigenética, após nove dias de cultivo com ou sem tiamina. O aumento da intensidade de fluorescência de H3K36me3 indica que, uma vez repovoadas com novos neurônios, as células progenitoras neurais das COHs ativam um mecanismo de inibição da diferenciação neuronal, de forma a controlar a densidade celular.

FIGURA 11: Modulação epigenética após pulso neurogênico nas COHs em DT.



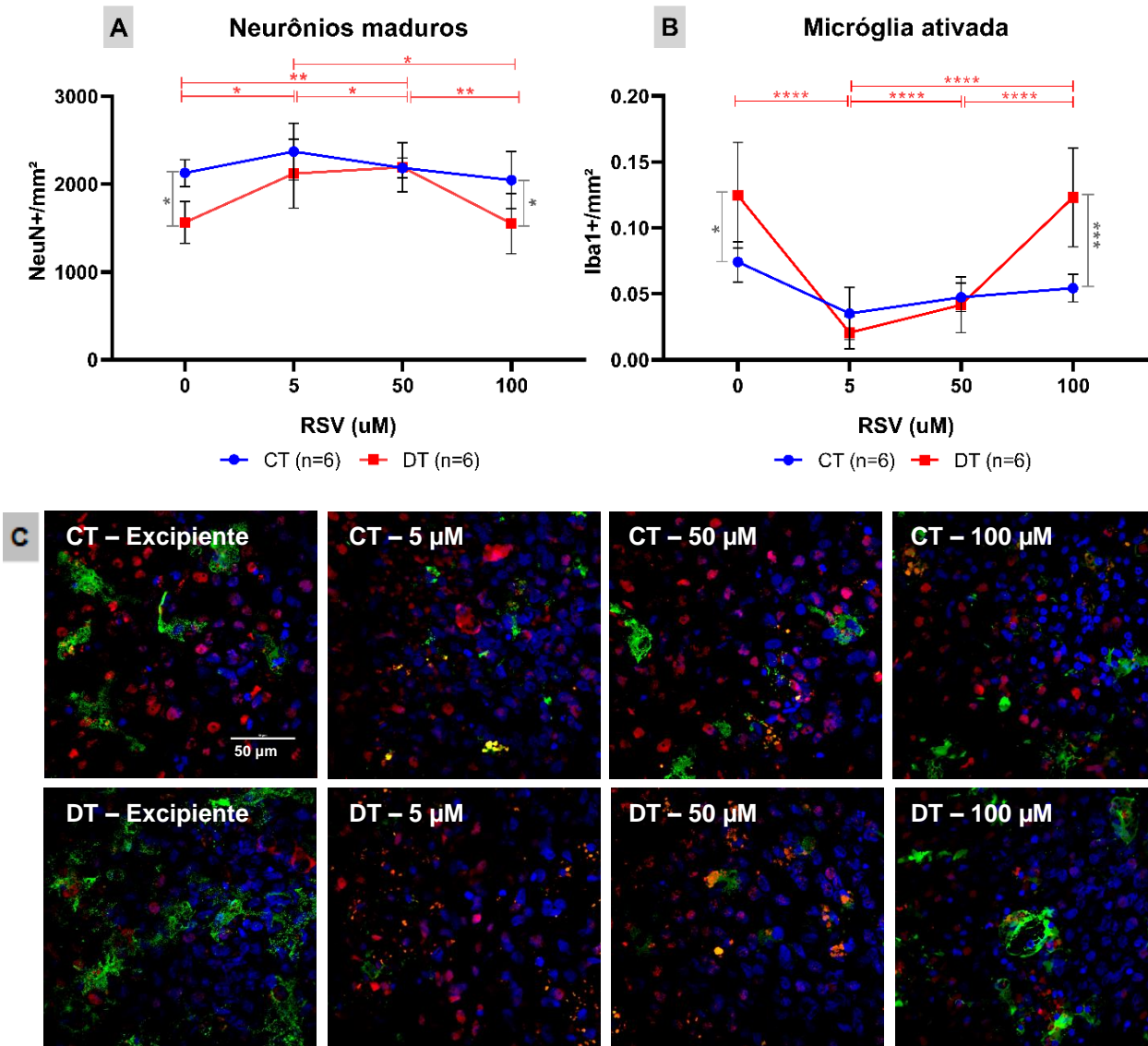
FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: A trimetilação da lisina 36 na histona H3 (setas no painel B) regula positivamente a expressão do gene *Bmp4*, importante inibidor da neurogênese. **A** - Soma da intensidade de fluorescência da marca H3K36me3 normalizada pelo número de neurônios maduros identificados com essa marcação após 9 dias de cultivo com ou sem tiamina. As medianas dos grupos CT (Controles) e DT (Deficiência de Tiamina) foram comparadas através do teste de Mann-Whitney e os dados foram expressos como mediana \pm interquartil. Diferenças com valores de P inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas ($* = P \leq 0,05$). **B** - Micrografias confocais (100x) (escala = 500 μ m) de COH com marcações de neurônios maduros (NeuN+) em vermelho, núcleo celular (DAPI) em azul e H3K36me3 em verde após 9 dias de cultivo com ou sem tiamina.

4.5. Intervenção com fármaco anti-inflamatório

As análises dos perfis transcricionais indicaram, consistentemente, a redução da neuroinflamação nas COHs mantidas por nove dias em DT. A fim de elucidar o papel da resposta inflamatória à DT na regulação da neuroregeneração observada nas COHs, foi proposta uma intervenção farmacológica com três doses diferentes de RSV (5, 50 ou 100 μM) a partir do quarto dia de cultivo com ou sem tiamina. Os efeitos do RSV na ativação da micróglia e na densidade neuronal foram registrados e quantificados por imunofluorescência e microscopia confocal após três dias de tratamento.

FIGURA 12: Avaliação de efeitos fenotípicos do tratamento com 5 μM , 50 μM ou 100 μM de RSV por 3 dias a partir do quarto dia de cultivo com ou sem tiamina.



FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Iba1 é uma proteína de ligação ao cálcio expressa especificamente por células da micróglia e macrófagos e que está envolvida no enrugamento da membrana e na fagocitose quando essas células estão ativadas. RSV é um polifenol com ação anti-inflamatória e anti-oxidante, além de possuir potencial neuroprotetor. **A-** As médias de densidade neuronal e de micróglia ativada dos grupos CT (Controles) e DT (Deficiência de Tiamina) foram comparadas com o teste de Análise de Variância (ANOVA) bidirecional seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey's. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e diferenças com valores de *P* inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas (* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** = $P \leq 0,0001$). As diferenças estatísticas representadas em vermelho são referentes à variação da densidade neuronal no grupo DT entre os grupos tratados com diferentes doses de RSV. Já as representações em cinza, são referentes as diferenças entre CT e DT tratados com as mesmas doses de RSV. **C** - Micrografias confocais (60x) de COH com marcações de neurônios maduros (NeuN+) em vermelho, núcleo celular (DAPI) em azul e micróglia ativada (Iba1+) em verde. Barra = 50 μ m.

A Figura 12 mostra as médias da densidade neuronal (Painel A) e as médias da densidade de micróglia ativada (Painel B) em COHs após sete dias de cultivo com ou sem tiamina, sendo os últimos três dias sob tratamento com três doses diferentes de RSV ou com excipiente.

As duas menores concentrações de RSV (5 μ M) induziram um aumento significativo da densidade de neurônios maduros e uma redução da micróglia ativada nas COHs em supressão de tiamina quando comparadas aos controles. Esses resultados sugerem fortemente que a neuroinflamação é um mecanismo inibidor da neurogênese das COHs durante a privação de tiamina. Contudo, com a dose mais concentrada de RSV (100 μ M), foi observado um fenótipo semelhante ao encontrado na condição não tratada (excipiente, ou dose 0), indicando um possível efeito dose-dependente do tratamento.

5. DISCUSSÃO

5.1. Dinâmica de neurodegeneração/ neurorregeneração nas COHs submetidas à DT

A tiamina é cofator de alguns complexos enzimáticos que catalisam reações de descarboxilação e transcetolização. Distúrbios nos níveis normais de tiamina podem resultar em déficits neurológicos severos, sendo a causa mais comum sua ingestão insuficiente associada ao consumo crônico de álcool (JHALA; HAZELL, 2011). Pacientes com SWK e animais submetidos à DT experimental apresentam, tipicamente, mudanças neuropatológicas graves e perda neuronal significativa nas regiões do córtex, corpos mamilares e hipocampo do cérebro (TODD, K.; BUTTERWORTH, R. F., 1999; WITT, 1985). Os resultados das análises de imunofluorescência do presente estudo apontam que, nos períodos iniciais da supressão de tiamina, há uma expressiva diminuição da população neuronal devido à morte por apoptose, confirmada pela perda de integridade do DNA detectada com o teste de TUNEL. A atividade dos complexos enzimáticos KGDHC e PDHC é prejudicada na ausência de tiamina, resultando na diminuição da produção de ATP, acúmulo de piruvato, aumento da acidose láctica e produção de ROS. Estes processos podem culminar em lesões da membrana celular, estresse oxidativo e ativação de cascatas de sinalização de vias intracelulares ligadas à apoptose mediada pela caspase-3 (JHALA; HAZELL, 2011). A diminuição da atividade de KGDHC é ainda prejudicada pela produção de óxido nítrico (NO) e ROS (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

Modificações de histonas são processos-chave na regulação epigenética e desempenham importantes funções em diversos eventos celulares. As enzimas que controlam a metilação de histonas estão envolvidas em todo o processo de desenvolvimento neural, desde o controle da proliferação e do estado indiferenciado de células progenitoras através da ativação ou inibição de vias neurogênicas e gliogênicas, até a sobrevivência e funcionamento neuronal (LEE; LEE, 2010). As trimetilações da histona H3 nas lisinas 4 e 9 são modificações epigenéticas bem caracterizadas, que modulam a acessibilidade à cromatina, aumentando ou inibindo, respectivamente, a expressão gênica. Sua regulação diferencial depende do tipo

celular e da fase de sobrevivência da célula (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; PATTARONI; JACOB, 2013; WEINHOLD, 2006; YOUN, 2017).

O aumento dos níveis de H3K4me3 e a diminuição dos níveis de H3K9me3 nos neurônios maduros das COHs mantidas por sete dias em privação de tiamina indicam um mecanismo regulatório a favor da expressão gênica, possivelmente subsidiando a limitação do processo neurodegenerativo induzido pela DT e favorecendo, também, a neuroregeneração observada nos dias posteriores.

A comparação do perfil transcricional das COHs cultivadas por nove dias em DT em relação ao grupo controle revelou a ativação do gene codificador da enzima alfa-cetoglutarato desidrogenase (OGDH) que catalisa a conversão de alfa-cetoglutarato (α KG ou 2OG) em succinil-CoA e CO₂ no ciclo de Krebs. Estudos anteriores indicam que os intermediários desse ramo do metabolismo energético podem moldar a paisagem epigenética da cromatina, regulando a metilação de CpGs e de histonas (BADEAUX; SHI, 2013; KAELIN; MCKNIGHT, 2013). Neste sentido, o α KG se destaca por ser substrato obrigatório para as dioxigenases α KG-dependentes. Essa família de enzimas inclui as principais proteínas de demetilação de CpGs e de histonas, ou seja, TETs e JmjC (*Jumonji C domain-containing*) desmetilases, respectivamente (LOENARZ; SCHOFIELD, 2011; MCDONOUGH; LOENARZ; CHOWDHURY; CLIFTON *et al.*, 2010). Succinato e fumarato, também intermediários do ciclo de Krebs, inibem as dioxigenases α KG-dependentes, levando ao aumento da metilação de CpGs e histonas (KAELIN; MCKNIGHT, 2013). Dessa forma, perturbações das reações do ciclo de Krebs, como na DT, podem afetar o nível de CpGs de DNA e histonas. Entretanto, é importante ressaltar que a regulação epigenética da expressão gênica é resultado de inúmeros processos coexistentes, como outras modificações de histonas, e ainda metilação de CpGs, sendo necessária uma análise mais aprofundada para determinar os mecanismos epigenéticos responsáveis pelo fenótipo de neuroregeneração aqui relatados.

Este é o primeiro estudo a relatar o repovoamento neuronal do tecido hipocampal em um modelo de DT. Uma hipótese capaz de explicar este fenômeno é que as CPNs das COHs poderiam sobreviver à privação de tiamina em virtude de sua quiescência (KRATHWOHL; KAISER, 2004), enquanto neurônios maduros e glia sucumbiriam prematuramente, devido ao seu alto gasto energético. Todavia, apesar dos dados fenotípicos e moleculares observados até o momento corroborarem à

essa hipótese, somente a avaliação da divisão mitótica neuronal permitirá uma conclusão definitiva se houve neurogênese entre o sétimo e décimo dia de cultivo (Ver tópico 7.1).

5.2. Redução da neuroinflamação e mudança metabólica poderiam regular a neurogênese

5.2.1. Redução da neuroinflamação

Vemuganti e colaboradores (2006), demonstraram que, em regiões afetadas pela DT no cérebro de ratos, os genes inflamatórios representam o maior grupo funcional de transcritos regulados positivamente. De fato, o estresse oxidativo decorrente do colapso energético e da excitotoxicidade durante a DT leva à ativação da micróglia e desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias por meio da regulação das vias de sinalização do NF κ B (*Nuclear factor kappa B*) e TNF- α (BUTTERWORTH, 1986; QIN; CREWS, 2014; TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F., 1999; VEMUGANTI; KALLURI; YI; BOWEN *et al.*, 2006; WANG; HAZELL, 2010). No presente estudo, as análises de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos durante a fase de neuroregeneração das COHs em DT apontam as vias canônicas de sinalização pelo TNF e sinalização de neuroinflamação, além dos processos biológicos (GO) de resposta ao TNF, resposta inflamatória e resposta imune como os mais fortemente inibidos (Apêndice D e 5). Isto sugere que a redução da inflamação está associada ao pulso de neuroregeneração observado durante a fase tardia da DT no modelo de COHs.

De acordo com as análises de enriquecimento funcional, a inibição do gene *App* é o mecanismo regulador central da diminuição da neuroinflamação na fase tardia da DT no modelo de COHs (Apêndice E). Este gene codifica uma proteína de membrana que, embora seja expressa em muitos tecidos, é especialmente abundante nas sinapses dos neurônios. APP é precursora do peptídeo A β , cuja forma fibrilar é componente primário das placas amilóides, encontradas em acúmulo no cérebro de pacientes acometidos pela doença de Alzheimer (KARUPPAGOUNDER; XU; SHI; CHEN *et al.*, 2009). O acúmulo de APP já foi relatado como resposta à DT, levando à geração de A β por aumentar a atividade de β -secretases. Esse mecanismo, posteriormente, intensifica o estresse oxidativo e a neurodegeneração (CALINGASAN; GANDY; BAKER; SHEU *et al.*, 1995;

CALINGASAN; GANDY; GIBSON, 1997; ZHANG; YANG; LI; FAN *et al.*, 2011). Com a redução da APP, a inibição de *Creb1*, *Nfkb1a* (*Nuclear factor-kappa-B-inhibitor alpha*), *Stat3* (*Signal transducer and activator of transcription 3*), *Tlr2* (*Toll-like receptor 2*) e *Tlr4* (*Toll-like receptor 4*) (Apêndice E) dão continuidade à cascata de atenuação da inflamação, inibindo a expressão dos genes “rio abaixo” nas COHs após nove dias de cultivo sem tiamina. Além da APP, a inibição de NFE2L2, IFNG, TGFB1, CREB1 e TNF- α , parece regular diretamente a diminuição da resposta inflamatória das COHs em DT (Apêndice E). A análise de enriquecimento funcional também evidenciou a ativação da via canônica de sinalização pela PIK-Akt nas COHs no nono dia de DT. As PI3Ks de classe I induzem a ativação de NFkB e estão envolvidas na transdução de sinal pelos receptores TLRs (*Toll-like receptors*) em células imunes, como macrófagos. No entanto, diferentes isoformas das PI3Ks de classe I podem regular positiva ou negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (Revisado em: TROUTMAN; BAZAN; PASARE, 2012). Em conjunto, a intensa redução da expressão de genes inflamatórios observada no período precedente ao completo repovoamento das COHs com novos neurônios, além da correlação negativa entre os níveis de mRNA dos genes de resposta inflamatória *Mmp9*, *C3*, *Lcn2* e genes de neurogênese e sinaptogênese *NeuroD1* e *Bdnf* (Gráfico 2 e Tabela 2), apontam a neuroinflamação como processo chave na regulação da neuroregeneração durante a DT.

5.2.2. Adaptação metabólica

Dentre as alterações transcricionais das COHs cultivadas por nove dias em privação de tiamina, também foi observada a ativação do *Ogdh* e de outros genes cujos produtos participam de vias relacionadas à síntese de acetil-CoA a partir de aminoácidos (Apêndice D). Isto sugere uma mudança metabólica dessas culturas, que poderia, em última instância, permitir-lhes contornar o gargalo energético resultante da diminuição da atividade de TK, KGDHC e PDHC. Com isso, a fosforilação oxidativa, principal fonte de energia de neurônios maduros (ZHENG; BOYER; JIN; MERTENS *et al.*, 2016), seria favorecida.

5.2.3. Maturação dos novos neurônios

A maturação dos novos neurônios nas COHs mantidas por nove dias em privação de tiamina parece ser regulada pela ativação da via KEGG de sinalização PI3K/Akt (Apêndice D). As PI3Ks (*Phosphoinositide 3-kinases*) são uma família de enzimas que desempenham um papel central em diversos processos metabólicos reguladores de diversos aspectos da fisiologia celular (Revisado em: ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006; HAWKINS; ANDERSON; DAVIDSON; STEPHENS, 2006). PI3Ks são enzimas que transduzem sinais mitogênicos e metabólicos para promover o crescimento celular, proliferação, migração e apoptose. A família PI3K classe I ativa a proteína quinase B (PKB), também conhecida como AKT, que, por sua vez, ativa mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) (Revisado em: ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006; HAWKINS; ANDERSON; DAVIDSON; STEPHENS, 2006). No hipocampo, córtex cerebral e cerebelo, a ativação da via AKT/mTOR é essencial para o desenvolvimento neuronal e a formação de sinapses (AKIYAMA; KAMIGUCHI, 2010; CUESTO; ENRIQUEZ-BARRETO; CARAMÉS; CANTARERO *et al.*, 2011; JAWORSKI; SPANGLER; SEEBURG; HOOGENRAAD *et al.*, 2005), contribuindo, assim, para a plasticidade neuronal e memória (BRUEL-JUNGERMAN; VEYRAC; DUFOUR; HORWOOD *et al.*, 2009; HORWOOD; DUFOUR; LAROCHE; DAVIS, 2006; SUI; WANG; LI, 2008). A ativação desta via por fatores de crescimento sinalizando através do receptor tirosina quinase (RTK) constitui a via central de regulação da proliferação neuronal, maturação e integração em circuitos maduros no cérebro (Revisado em: WAITE; EICKHOLT, 2010).

PI3K, por meio da ativação de AKT, aumenta a interação e a atividade de vários complexos de transcrição compostos por fatores de transcrição bHLH (*Basic Helix-Loop-Helix*) (NGN2 e NEUROD1), HATs e HDACs (VOJTEK; TAYLOR; DERUITER; YU *et al.*, 2003). A ativação de AKT pelo flavonoide natural curcumina em combinação com um inibidor de HDACs melhora a sobrevivência de neurônios em cultura e restaura o dano neuronal induzido por A β (MENG; LI; CAMARILLO; YAO *et al.*, 2014). Um dos mecanismos propostos para tal proteção é a fosforilação dependente de AKT do fator de transcrição CREB, que por sua vez estimula a expressão de BDNF. Um estudo prévio sugere que a PI3K/AKT é a via de sinalização responsável pela ativação da expressão gênica de fase tardia envolvida na diferenciação neuronal, neurogênese e neuroproteção (CHEN; MONTEITH; LAW;

LOH, 2010). Ademais, a sinalização PI3K/AKT/NFκB dependente de NGF (*Nerve growth factor*) regula seletivamente o status de trimetilação da H3K9, favorecendo a sobrevivência celular e diferenciação neuronal (CHEN; LAW; LOH, 2008).

As enzimas αKG dependentes, que são afetadas negativamente pela falta de substrato durante o desequilíbrio do ciclo de Krebs, também podem regular a síntese de colágeno e resposta à hipóxia (LILJA; HELDRING; HERMANSON, 2013). O colapso energético e estresse oxidativo limitam a proliferação celular e reduzem a síntese de colágeno. Por outro lado, o acúmulo de glutamato aumenta os níveis de enzimas αKG dependentes, que, por sua vez, induzem a produção de colágeno, a hidroxilação da lisina e podem, também, diminuir a hipóxia (HARJES, 2019; LOENARZ; SCHOFIELD, 2011; MCDONOUGH; LOENARZ; CHOWDHURY; CLIFTON *et al.*, 2010). Embora não tenha sido avaliado o conteúdo de glutamato das COHs neste estudo, as análises de enriquecimento funcional evidenciam a ativação de genes como *Col8a2* (*Collagen type VIII alpha 2 chain*), *Col11a2* (*Collagen type XI alpha 2 chain*) e *Colgalt2* (*Collagen beta(1-0) galactosyltransferase 2*). Estes também têm anotações GO relacionadas à adesão celular, desenvolvimento do sistema nervoso e interação entre receptor e matriz extracelular (MEC). A matriz extracelular consiste em uma complexa combinação de macromoléculas estruturais e funcionais e tem um importante papel na manutenção da estrutura e função celular e tecidual (KERRISK; CINGOLANI; KOLESKE, 2014). As atividades de receptores de adesão celular, que intermedam as interações entre os botões pré e pós-sinápticos são amplamente influenciadas pela composição da MEC. A adesão celular é, ainda, essencial à migração neuronal (LETOURNEAU; CONDIC; SNOW, 1994). Estes resultados sugerem uma recuperação da estabilidade e plasticidade sináptica das COHs no nono dia de DT, o que pode contribuir para sua recuperação funcional.

5.2.4. Regulação da neurogênese

O conjunto dos genes diferencialmente expressos após nove dias de cultivo sem tiamina aponta para uma programação genética a favor da regulação negativa da neurogênese mediada pela trimetilação da histona H3 na lisina 36. A maior expressão do gene *Nsd1* está relacionada à regulação da mono e dimetilação em H3K36. A trimetilação deste resíduo, entretanto, é catalisada pela enzima SET2

(*SET domain-containing 2*) expressa constitutivamente na célula. A marca epigenética H3K36me3 está relacionada à ativação transcricional do gene *Bmp4*, que, por sua vez, inibe a neurogênese (WAGNER; CARPENTER, 2012) (Figura 11 e Apêndice C).

O perfil transcricional das COHs também revelou a inibição do gene *Rassf10* (*Ras association domain family member 10*). RASSF10 é parte de uma família de proteínas que consiste de dez membros e tem sido apontada como um fator supressor de tumor (HESSON; DUNWELL; COOPER; CATCHPOOLE *et al.*, 2009; HILL; UNDERHILL-DAY; KREX; ROBEL *et al.*, 2011; WEI; CHEN; CHEN; WANG *et al.*, 2013). Esta proteína está envolvida na regulação da proliferação celular e regula a progressão da mitose (HILL; UNDERHILL-DAY; KREX; ROBEL *et al.*, 2011; VOLODKO; GORDON; SALLA; GHAZALEH *et al.*, 2014). A menor expressão do gene que codifica a RASSF10 nas COHs sob DT pode indicar um estímulo à sobrevivência celular.

Finalmente, genes mapeados em vias KEGG relacionadas ao ciclo celular, como *Gadd45*, foram encontrados como inibidos. A redução da expressão de *Gadd45* está relacionada a parada G2-M do ciclo celular e, conseqüentemente, na supressão do crescimento celular (JIN; TONG; FAN; FAN *et al.*, 2002).

Conjuntamente, estes resultados indicam que, quando as COHs sob DT estão completamente repovoadas com novos neurônios, há uma ativação de mecanismos objetivando atenuar a proliferação celular. A neurogênese é frequentemente afetada em distúrbios neuropatológicos. Portanto, a compreensão detalhada do microambiente celular e dos fatores moleculares que permitem e facilitam a neurogênese adulta pode representar um importante avanço para a recuperação do SNC após lesões e perda neuronal (KRATHWOHL; KAISER, 2004).

5.3. Resveratrol estimula neuroregeneração nas COHs durante a DT

Devido à relevância dos processos inflamatórios na fisiopatologia da DT, intervenções farmacológicas visando a atenuação desta resposta representam um promissor espaço de busca por novas estratégias terapêuticas. A terapia adjuvante com dimetilsulfóxido (DMSO), um anti-inflamatório, associado a doses de tiamina se mostrou neuroprotetor em modelo murino *in vivo* de DT, atenuando distúrbios neurológicos e alterações celulares (GOMES, 2020). Ainda, o tratamento de ratos

DT com minociclina, antibiótico com ação anti-inflamatória, da mesma classe estrutural das tetraciclinas, preveniu a ativação da micróglia e atrasou o aparecimento de alterações neurológicas, como a perda do reflexo de endireitamento, em aproximadamente 39 horas (WANG; HAZELL, 2010). No entanto, nenhum estudo, até o momento, demonstrou a associação entre inflamação e controle da neurogênese hipocampal na DT.

O RSV é um polifenol anti-inflamatório e antioxidante encontrado principalmente nas sementes e películas das uvas e no vinho tinto, frutas vermelhas e amendoim (Revisado em: GAMBINI; LÓPEZ-GRUESO; OLASO-GONZÁLEZ; INGLÉS *et al.*, 2013). Além dessas funções bem conhecidas, estudos prévios comprovaram que o RSV estimula a neurogênese, regula a expressão de miRNAs que têm como alvo componentes de vias críticas relacionadas à manutenção da integridade da barreira hemato-encefálica e apoptose, além de aumentar a expressão de mRNAs para produção *BDNF* no hipocampo (DE QUEIROZ; DOS SANTOS FONTES PEREIRA; ARAÚJO; GOMEZ *et al.*, 2018; FOTI CUZZOLA; CIURLEO; GIACOPPO; MARINO *et al.*, 2011; HUANG; TSAI; CHIH; HUNG *et al.*, 2001; SAKATA; ZHUANG; KWANSA; KOEHLER *et al.*, 2010; SHEU; LIAO; WU; SHYU *et al.*, 2013) .

No presente estudo, investigou-se o papel da resposta inflamatória à DT na regulação da neuroregeneração hipocampal através do tratamento das COHs dos grupos CT e DT com três doses diferentes de RSV (5, 50 ou 100 μ M) a partir do quarto dia de cultivo com ou sem tiamina. Esse período de tratamento foi determinado com base no início observado do fenótipo de neurodegeneração (quinto dia) nas COHs em DT. Com esta estratégia, objetivou-se antecipar a redução da inflamação observada pelas análises de expressão gênica (transcriptoma e RT-qPCR) no nono dia e testar a hipótese de que a inflamação reduzida favoreceria a antecipação da neuroregeneração das COHs sob privação de tiamina.

Apesar de forte relação causal entre neuroinflamação e neurogênese, nossos resultados não permitem concluir que o estado de ativação da micróglia por si só regula a neurogênese nas COHs em privação de tiamina. O processo inflamatório no SNC é um fenômeno complexo e integrado que envolve a ação orquestrada de diversos tipos de celulares. Apesar do papel predominante da micróglia nesse processo, outra grande parte da população celular, principalmente astrócitos, também constituem a resposta base da neuroinflamação. Para provar o papel

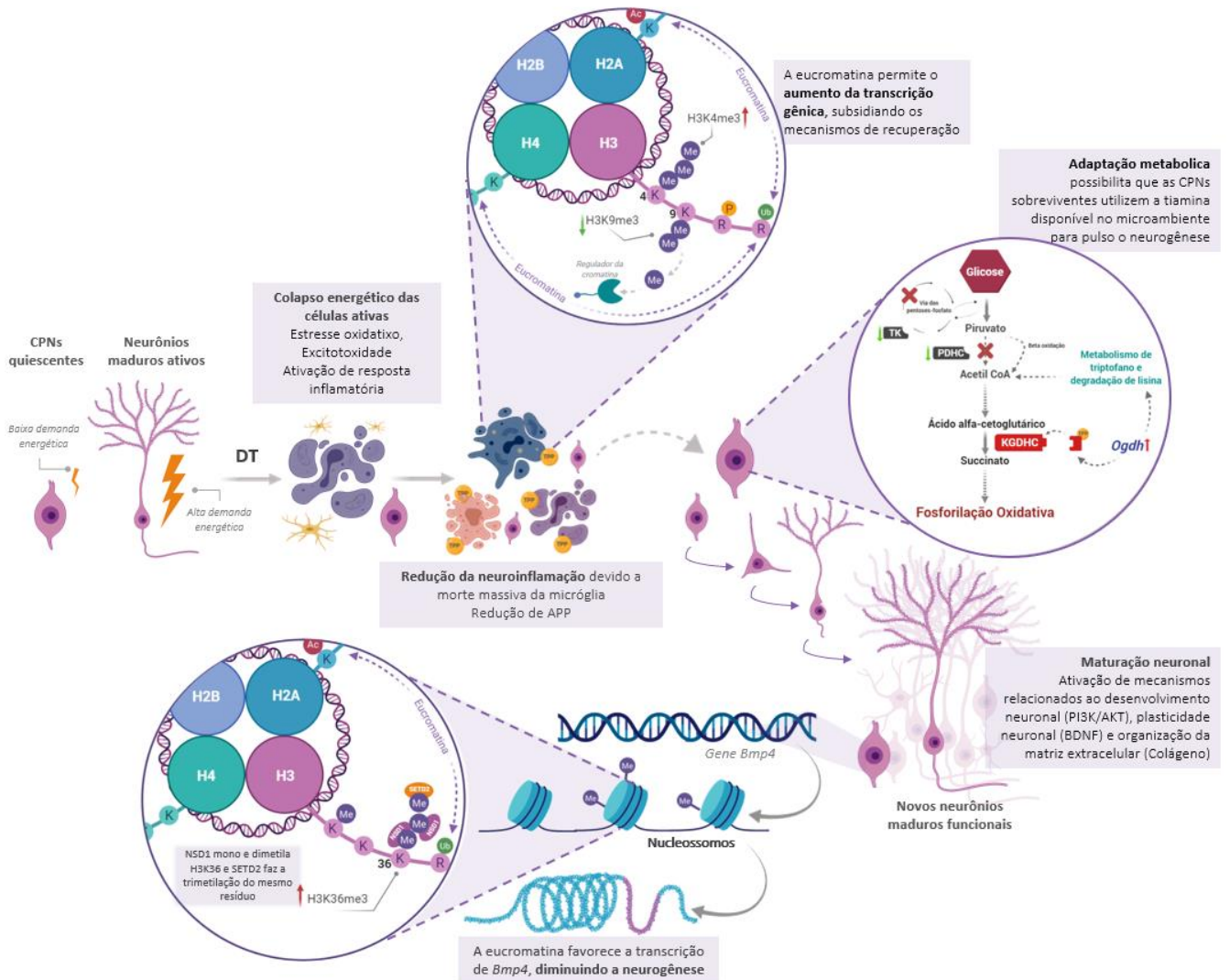
central da micróglia, é necessária uma avaliação em uma série temporal dessa população celular e depleção da mesma por intervenção farmacológica, além da avaliação da astrogliose nas COHs em privação de tiamina.

Embora não seja possível afirmar que a neuroregeneração antecipada pelo tratamento com RSV é capaz de gerar neurônios mais longevos do que a neurogênese espontânea, é possível concluir que este tratamento provou a relação causal entre inflamação e inibição da neuroregeneração no modelo de DT em COHs, além de abrir novas oportunidades de estudos *in vivo* sobre o papel desse processo fisiológico nos quadros clínicos relacionados à DT.

6. CONCLUSÃO

A regulação positiva de genes das vias relacionadas à síntese de acetil-CoA a partir de aminoácidos sugere uma adaptação metabólica capaz de permitir que células progenitoras neurais utilizem a fosforilação oxidativa como fonte de energia para a neuroregeneração. O conjunto de genes diferencialmente expressos no nono dia de privação de tiamina aponta para uma programação genética favorável à maturação dos neurônios e a regulação negativa da neurogênese mediada pela marca H3K36me3 em neurônios já diferenciados. Sobretudo, a redução da expressão de genes inflamatórios antes do repovoamento das COHs com novos neurônios sugere uma relação causal, que é apoiada por estudos anteriores relatando a inflamação como um fator supressor da neurogênese. Portanto, a neuroinflamação parece ser crucial na neurodegeneração associada à DT, podendo ter um papel também na fisiopatologia da SWK (Figura 13).

FIGURA 13: Esquema dos principais resultados e hipótese do mecanismo de neuroregeneração da COHs cultivadas por nove dias em DT.



FONTE: Elaborado pelo autor

7. PERSPECTIVAS

7.1. Avaliação da proliferação neuronal entre o sétimo e décimo dia de cultivo com ou sem tiamina, através da incorporação de BrdU (Bromodesoxiuridina).

Sabe-se que a neurogênese pós embrionária é frequentemente afetada em condições neuropatológicas (KRATHWOHL; KAISER, 2004), entretanto, este é um mecanismo complexo que envolve a proliferação e diferenciação de diversos precursores neuronais, e, que por sua vez, são influenciados por uma variedade de estímulos fisiológicos e patológicos (RAINETEAU; RIETSCHIN; GRADWOHL; GUILLEMOT *et al.*, 2004). Para confirmar o fenótipo de neurogênese observado no presente estudo, foi proposto um experimento de imunofluorescência que combina a incorporação de BrdU com a marcação de NeuN para avaliação da proliferação neuronal entre o sétimo e o décimo dia de cultivo das COHs em privação de tiamina. BrdU é um análogo da timina que se incorpora nas células em mitose durante a fase de síntese de DNA. Uma vez incorporado à nova fita de DNA, o BrdU permanece na célula e é transmitido para as células filhas após a divisão (WOJTOWICZ; KEE, 2006).

7.2. Avaliação dos níveis de metilação global do DNA de COHs cultivadas por 4, 7 e 10 dias com ou sem tiamina, através da imunocoloração contra 5mC.

Estudos recentes demonstram que o padrão de metilação do DNA pode regular a neurogênese pós embrionária através da modulação da diferenciação de CPNs em determinadas linhagens neurais (Revisado em: WANG; TANG; HE; JIN, 2016). Durante o desenvolvimento de células-tronco neurais, a inibição da via de sinalização PI3K/AKT, encontrada alterada pela DT no presente estudo, aumenta a expressão de *Dnmt1* e *Dnmt3a* e desativa a transcrição de genes de diferenciação e maturação neuronal (ZHANG; HE; LI; KONG *et al.*, 2017). Outros estudos ainda relatam que o padrão de metilação do DNA aumenta quando A β começa a se acumular e esse aumento é acompanhado pela regulação positiva de DNMTs (GRÍÑÁN-FERRÉ; SARROCA; IVANOVA; PUIGORIOL-ILLAMOLA *et al.*, 2016). A utilização dessa estratégia tem como objetivo contribuir para a elucidação dos

mecanismos de modulação epigenética envolvidos na neurodegeneração/neurorregeneração das COHs cultivadas com e sem tiamina.

7.3. Intervenção farmacológica com doxicilina (DOX)

Associado às suas propriedades bacteriostáticas, a DOX é uma potente inibidora de metaloproteinases de matriz (MMPs) e age diminuindo a liberação de citocinas. Ademais, está envolvida na digestão de ECM e na inibição da TACE (*tumor necrosis factor- α -converting enzyme*), responsável pela clivagem do TNF- α liberando-o em sua forma ativa (BROWN; DESAI; VAKILI; NOUNEH *et al.*, 2004; LEIB; CLEMENTS; LINDBERG; HEIMGARTNER *et al.*, 2001; MELI; COIMBRA; ERHART; LOQUET *et al.*, 2006). A proposição dessa nova intervenção farmacológica tem como objetivo avaliar o papel do TNF na resposta inflamatória das COHs à DT, permitindo assim, isolar os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do RSV, uma vez que a DOX não tem efeito neuroprotetor direto conhecido até o momento.

7.4. Análise das concentrações dos metabólitos que participam do ciclo de Krebs por Cromatografia Líquida ultra sensível acoplada à Espectrometria de Massas (uHPLC-MS).

A quantificação dos metabólitos do ciclo de Krebs durante a DT tem como objetivo validar a hipótese de que a ativação de *Ogdh* aumenta os níveis de metabólitos do ciclo de Krebs, permitindo que as células das COHs em DT utilizem a fosforilação oxidativa para obtenção da energia necessária para seu repovoamento com novos neurônios.

REFERÊNCIAS

- (CDC), C. F. D. C. Deaths associated with thiamine-deficient total parenteral nutrition. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 38, n. 3, p. 43-46, Jan 1989.
- AASHEIM, E. T. Wernicke encephalopathy after bariatric surgery: a systematic review. **Ann Surg**, 248, n. 5, p. 714-720, Nov 2008.
- ABDOU, E.; HAZELL, A. S. Thiamine deficiency: an update of pathophysiologic mechanisms and future therapeutic considerations. **Neurochem Res**, 40, n. 2, p. 353-361, Feb 2015.
- ADUSUMILLI, V. S.; WALKER, T. L.; OVERALL, R. W.; KLATT, G. M. *et al.* Redox potential defines functional states of adult hippocampal stem cells. **bioRxiv**, p. 606186, 2019.
- AKIYAMA, H.; KAMIGUCHI, H. Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates microtubule-dependent membrane transport for neuronal growth cone guidance. **J Biol Chem**, 285, n. 53, p. 41740-41748, Dec 2010.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**, 124, n. 3, p. 319-335, Jun 1965.
- ALY, M.; RANGANATH, C. New perspectives on the hippocampus and memory. **Neurosci Lett**, 680, p. 1-3, 07 2018.
- ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, 21, n. 10, p. 1133-1145, Oct 2001.
- AZARIAS, G.; PERRETEN, H.; LENGACHER, S.; POBURKO, D. *et al.* Glutamate transport decreases mitochondrial pH and modulates oxidative metabolism in astrocytes. **J Neurosci**, 31, n. 10, p. 3550-3559, Mar 2011.
- BADEAUX, A. I.; SHI, Y. Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 14, n. 4, p. 211-224, Apr 2013.
- BALAGHI, M.; NEAL, R. A. Effect of chronic ethanol administration on thiamin metabolism in the rat. **J Nutr**, 107, n. 12, p. 2144-2152, Dec 1977.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Res**, 21, n. 3, p. 381-395, Mar 2011.
- BARTKE, T.; VERMEULEN, M.; XHEMALCE, B.; ROBSON, S. C. *et al.* Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. **Cell**, 143, n. 3, p. 470-484, Oct 2010.
- BECKERVORDERSANDFORTH, R.; ZHANG, C. L.; LIE, D. C. Transcription-Factor-Dependent Control of Adult Hippocampal Neurogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 7, n. 10, p. a018879, Oct 2015.

BEHRENS, M. M.; ALI, S. S.; DUGAN, L. L. Interleukin-6 mediates the increase in NADPH-oxidase in the ketamine model of schizophrenia. **J Neurosci**, 28, n. 51, p. 13957-13966, Dec 2008.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5ª Edição ed. Rio de Janeiro, RJ: 2004.

BETTENDORFF, L.; WINS, P. Thiamine derivatives in excitable tissues: Metabolism, deficiency and neurodegenerative diseases. 1999.

BETTENDORFF, L.; WINS, P. Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. **FEBS J**, 276, n. 11, p. 2917-2925, Jun 2009.

BETTENDORFF, L.; WIRTZFELD, B.; MAKARCHIKOV, A. F.; MAZZUCHELLI, G. *et al.* Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. **Nat Chem Biol**, 3, n. 4, p. 211-212, Apr 2007.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30, n. 15, p. 2114-2120, Aug 2014.

BRASIL. Resolução ANVISA/MS RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnica sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Brasília, DF: Diário Oficial da União 2005.

BROWN, A. M.; BALTAN TEKKÖK, S.; RANSOM, B. R. Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. **Neurochem Int**, 45, n. 4, p. 529-536, Sep 2004.

BROWN, D. L.; DESAI, K. K.; VAKILI, B. A.; NOUNEH, C. *et al.* Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 24, n. 4, p. 733-738, Apr 2004.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; VEYRAC, A.; DUFOUR, F.; HORWOOD, J. *et al.* Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. **PLoS One**, 4, n. 11, p. e7901, Nov 2009.

BUBBER, P.; KE, Z. J.; GIBSON, G. E. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. **Neurochem Int**, 45, n. 7, p. 1021-1028, Dec 2004.

BUTTERWORTH, R. F. Cerebral thiamine-dependent enzyme changes in experimental Wernicke's encephalopathy. **Metab Brain Dis**, 1, n. 3, p. 165-175, Sep 1986.

CALINGASAN, N. Y.; GANDY, S. E.; BAKER, H.; SHEU, K. F. *et al.* Accumulation of amyloid precursor protein-like immunoreactivity in rat brain in response to thiamine deficiency. **Brain Res**, 677, n. 1, p. 50-60, Apr 1995.

CALINGASAN, N. Y.; GANDY, S. E.; GIBSON, G. E. Thiamine deficiency alters APP but not presenilin-1 immunoreactivity in vulnerable brain regions. **Neuroreport**, 8, n. 11, p. 2631-2634, Jul 1997.

CALINGASAN, N. Y.; PARK, L. C.; GANDY, S. E.; GIBSON, G. E. Disturbances of the blood-brain barrier without expression of amyloid precursor protein- containing neuritic clusters or neuronal loss during late stages of thiamine deficiency in guinea pigs. **Dev Neurosci**, 20, n. 4-5, p. 454-461, 1998.

CALVO-GARRIDO, J.; MAFFEZZINI, C.; SCHOBER, F. A.; CLEMENTE, P. *et al.* SQSTM1/p62-Directed Metabolic Reprogramming Is Essential for Normal Neurodifferentiation. **Stem Cell Reports**, 12, n. 4, p. 696-711, 04 2019.

CAVALIERE, F.; BENITO-MUÑOZ, M.; MATUTE, C. Organotypic Cultures as a Model to Study Adult Neurogenesis in CNS Disorders. **Stem Cells Int**, 2016, p. 3540568, 2016.

CHADDA, K.; RAYNARD, B.; ANTOUN, S.; THYRAULT, M. *et al.* Acute lactic acidosis with Wernicke's encephalopathy due to acute thiamine deficiency. **Intensive Care Med**, 28, n. 10, p. 1499, Oct 2002.

CHANDLER, V. L. Paramutation's properties and puzzles. **Science**, 330, n. 6004, p. 628-629, Oct 2010.

CHAO, C. C.; HU, S.; MOLITOR, T. W.; SHASKAN, E. G. *et al.* Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. **J Immunol**, 149, n. 8, p. 2736-2741, Oct 1992.

CHEN, K.; CHEN, Z.; WU, D.; ZHANG, L. *et al.* Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes. **Nat Genet**, 47, n. 10, p. 1149-1157, Oct 2015.

CHEN, Y. L.; LAW, P. Y.; LOH, H. H. NGF/PI3K signaling-mediated epigenetic regulation of delta opioid receptor gene expression. **Biochem Biophys Res Commun**, 368, n. 3, p. 755-760, Apr 2008.

CHEN, Y. L.; MONTEITH, N.; LAW, P. Y.; LOH, H. H. Dynamic association of p300 with the promoter of the G protein-coupled rat delta opioid receptor gene during NGF-induced neuronal differentiation. **Biochem Biophys Res Commun**, 396, n. 2, p. 294-298, May 2010.

COLLINS, B. E.; GREER, C. B.; COLEMAN, B. C.; SWEATT, J. D. Histone H3 lysine K4 methylation and its role in learning and memory. **Epigenetics Chromatin**, 12, n. 1, p. 7, 01 2019.

COLLINS, B. E.; SWEATT, J. D.; GREER, C. B. Broad domains of histone 3 lysine 4 trimethylation are associated with transcriptional activation in CA1 neurons of the hippocampus during memory formation. **Neurobiol Learn Mem**, 161, p. 149-157, 05 2019.

- COLLINS, G. H. Glial cell changes in the brain stem of thiamine-deficient rats. **Am J Pathol**, 50, n. 5, p. 791-814, May 1967.
- COMBS JR, G. F.; MCCLUNG, J. P. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Academic Press 2016.
- COOK, C. C.; HALLWOOD, P. M.; THOMSON, A. D. B Vitamin deficiency and neuropsychiatric syndromes in alcohol misuse. **Alcohol Alcohol**, 33, n. 4, p. 317-336, 1998 Jul-Aug 1998.
- COOPER, J. R.; ROTH, R. H.; KINI, M. M. BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL FUNCTION OF THIAMINE IN NERVOUS TISSUE. **Nature**, 199, p. 609-610, Aug 1963.
- COVIC, M.; KARACA, E.; LIE, D. C. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. **Heredity (Edinb)**, 105, n. 1, p. 122-134, Jul 2010.
- CUESTO, G.; ENRIQUEZ-BARRETO, L.; CARAMÉS, C.; CANTARERO, M. *et al.* Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons. **J Neurosci**, 31, n. 8, p. 2721-2733, Feb 2011.
- DE QUEIROZ, K. B.; DOS SANTOS FONTES PEREIRA, T.; ARAÚJO, M. S. S.; GOMEZ, R. S. *et al.* Resveratrol Acts Anti-Inflammatory and Neuroprotective in an Infant Rat Model of Pneumococcal Meningitis by Modulating the Hippocampal miRNome. **Mol Neurobiol**, Apr 2018.
- DESTRIEUX, C.; BOURRY, D.; VELUT, S. Surgical anatomy of the hippocampus. **Neurochirurgie**, 59, n. 4-5, p. 149-158, 2013 Aug-Oct 2013.
- DHIR, S.; TARASENKO, M.; NAPOLI, E.; GIULIVI, C. Neurological, Psychiatric, and Biochemical Aspects of Thiamine Deficiency in Children and Adults. **Front Psychiatry**, 10, p. 207, 2019.
- DOBIN, A.; DAVIS, C. A.; SCHLESINGER, F.; DRENKOW, J. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, 29, n. 1, p. 15-21, Jan 2013.
- DRINGEN, R.; GEBHARDT, R.; HAMPRECHT, B. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. **Brain Res**, 623, n. 2, p. 208-214, Oct 1993.
- ELNAGEH, K. M.; GAITONDE, M. K. Effect of a deficiency of thiamine on brain pyruvate dehydrogenase: enzyme assay by three different methods. **J Neurochem**, 51, n. 5, p. 1482-1489, Nov 1988.
- ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nat Rev Genet**, 7, n. 8, p. 606-619, Aug 2006.

ESSERS, M. A.; OFFNER, S.; BLANCO-BOSE, W. E.; WAIBLER, Z. *et al.* IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. **Nature**, 458, n. 7240, p. 904-908, Apr 2009.

FAN, G.; MARTINOWICH, K.; CHIN, M. H.; HE, F. *et al.* DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. **Development**, 132, n. 15, p. 3345-3356, Aug 2005.

FARES, J.; BOU DIAB, Z.; NABHA, S.; FARES, Y. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. **Int J Neurosci**, 129, n. 6, p. 598-611, Jun 2019.

FENG, J.; CHANG, H.; LI, E.; FAN, G. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. **J Neurosci Res**, 79, n. 6, p. 734-746, Mar 2005.

FOTI CUZZOLA, V.; CIURLEO, R.; GIACOPPO, S.; MARINO, S. *et al.* Role of resveratrol and its analogues in the treatment of neurodegenerative diseases: focus on recent discoveries. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, 10, n. 7, p. 849-862, Nov 2011.

FOURNIER, H.; BUTTERWORTH, R. F. Effects of thiamine deficiency on thiamine-dependent enzymes in regions of the brain of pregnant rats and their offspring. **Metab Brain Dis**, 5, n. 2, p. 77-84, Jun 1990.

FOX, J. M.; DUPPEL, W. The action of thiamine and its di- and triphosphates on the slow exponential decline of the ionic currents in the node of Ranvier. **Brain Res**, 89, n. 2, p. 287-302, May 1975.

FRANÇA, A. K. T. D. C.; CHAGAS, D. C. D.; PESSOA, F. S.; PINHO, J. R. O. *et al.* Alimentação e Nutrição na Atenção Básica em Saúde. 164 p. 2017.

FUNK, C. The etiology of the deficiency diseases. Beri-beri, polyneuritis in birds, epidemic dropsy, scurvy, experimental scurvy in animals, infantile scurvy, ship beri-beri, pellagra. **Journal of State Medicine**, n. 20, p. 341-368, 1912.

FUNK, C.; DUBIN, H. E. **The vitamins**. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins Company, 1922. 516 p.

GAMBINI, J.; LÓPEZ-GRUESO, R.; OLASO-GONZÁLEZ, G.; INGLÉS, M. *et al.* [Resveratrol: distribution, properties and perspectives]. **Rev Esp Geriatr Gerontol**, 48, n. 2, p. 79-88, 2013 Mar-Apr 2013.

GE, S.; PRADHAN, D. A.; MING, G. L.; SONG, H. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. **Trends Neurosci**, 30, n. 1, p. 1-8, Jan 2007.

GERALD F. COMBS, J.; MCCLUNG, J. P. **The Vitamins**. 5th ed. Academic Press, 2017. 628 p. 978-0-12-802965-7.

GIBSON, G. E.; HIRSCH, J. A.; FONZETTI, P.; JORDAN, B. D. *et al.* Vitamin B1 (thiamine) and dementia. **Ann N Y Acad Sci**, 1367, n. 1, p. 21-30, 03 2016.

GOGOLLA, N.; GALIMBERTI, I.; DEPAOLA, V.; CARONI, P. Staining protocol for organotypic hippocampal slice cultures. **Nat Protoc**, 1, n. 5, p. 2452-2456, 2006.

GOMES, K. C. **Estratégias terapêuticas para a deficiência de tiamina**. 2020. 76 f. (Doutorado) - Programa de pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, Brasil.

GOYAL, M. S.; HAWRYLYCZ, M.; MILLER, J. A.; SNYDER, A. Z. *et al.* Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenus gene expression. **Cell Metab**, 19, n. 1, p. 49-57, Jan 2014.

GRIÑÁN-FERRÉ, C.; SARROCA, S.; IVANOVA, A.; PUIGORIOL-ILLAMOLA, D. *et al.* Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. **Aging (Albany NY)**, 8, n. 4, p. 664-684, 04 2016.

GUBLER, C. J. Studies on the physiological functions of thiamine. I. The effects of thiamine deficiency and thiamine antagonists on the oxidation of alpha-keto acids by rat tissues. **J Biol Chem**, 236, p. 3112-3120, Dec 1961.

GUBLER, C. J.; PETERSON, J. W.; TURPIN, K. K.; CRANE, L. W. *et al.* Effects of thiamin deficiency and thiamin antagonists on serum and liver cholesterol levels and on cholesterol biosynthesis in rats. **J Nutr**, 104, n. 12, p. 1690-1695, Dec 1974.

GUPTA, S.; KIM, S. Y.; ARTIS, S.; MOLFESE, D. L. *et al.* Histone methylation regulates memory formation. **J Neurosci**, 30, n. 10, p. 3589-3599, Mar 2010.

HAINES, T. R.; RODENHISER, D. I.; AINSWORTH, P. J. Allele-specific non-CpG methylation of the Nf1 gene during early mouse development. **Dev Biol**, 240, n. 2, p. 585-598, Dec 2001.

HAKIM, A. M. The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. **Ann Neurol**, 16, n. 6, p. 673-679, Dec 1984.

HARJES, U. Renovation in progress. **Nat Rev Cancer**, 19, n. 5, p. 246, 05 2019.

HARPER, C. G.; GILES, M.; FINLAY-JONES, R. Clinical signs in the Wernicke-Korsakoff complex: a retrospective analysis of 131 cases diagnosed at necropsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 49, n. 4, p. 341-345, Apr 1986.

HAWKINS, P. T.; ANDERSON, K. E.; DAVIDSON, K.; STEPHENS, L. R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochem Soc Trans**, 34, n. Pt 5, p. 647-662, Nov 2006.

HAZELL, A. S.; BUTTERWORTH, R. F. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. **Alcohol Alcohol**, 44, n. 2, p. 141-147, 2009 Mar-Apr 2009.

HAZELL, A. S.; ITZHAK, Y.; LIU, H.; NORENBURG, M. D. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. **J Neurochem**, 68, n. 5, p. 2216-2219, May 1997.

HESSON, L. B.; DUNWELL, T. L.; COOPER, W. N.; CATCHPOOLE, D. *et al.* The novel RASSF6 and RASSF10 candidate tumour suppressor genes are frequently epigenetically inactivated in childhood leukaemias. **Mol Cancer**, 8, p. 42, Jul 2009.

HILL, V. K.; UNDERHILL-DAY, N.; KREX, D.; ROBEL, K. *et al.* Epigenetic inactivation of the RASSF10 candidate tumor suppressor gene is a frequent and an early event in gliomagenesis. **Oncogene**, 30, n. 8, p. 978-989, Feb 2011.

HORWOOD, J. M.; DUFOUR, F.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. **Eur J Neurosci**, 23, n. 12, p. 3375-3384, Jun 2006.

HSIEH, J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. **Genes Dev**, 26, n. 10, p. 1010-1021, May 2012.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc**, 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

HUANG, S. S.; TSAI, M. C.; CHIH, C. L.; HUNG, L. M. *et al.* Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. **Life Sci**, 69, n. 9, p. 1057-1065, Jul 2001.

HUMPEL, C. Organotypic brain slice cultures: A review. **Neuroscience**, 305, p. 86-98, Oct 2015.

HUMPHRIES, K. M.; SZWEDA, L. I. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. **Biochemistry**, 37, n. 45, p. 15835-15841, Nov 1998.

HWANG, J. Y.; AROMOLARAN, K. A.; ZUKIN, R. S. The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. **Nat Rev Neurosci**, 18, n. 6, p. 347-361, 05 2017.

HÖLLER, H.; SCHALLER, K.; WERTH, R. Thiamine absorption in the rat. III. Effect of ethyl alcohol on active absorption of thiamine in-vitro. **Int J Vitam Nutr Res**, 45, n. 2, p. 138-143, 1975.

INABA, H.; KISHIMOTO, T.; OISHI, S.; NAGATA, K. *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. **Biosci Biotechnol Biochem**, 80, n. 12, p. 2425-2436, Dec 2016.

INSTITUTE OF MEDICINE (US) STANDING COMMITTEE ON THE SCIENTIFIC EVALUATION OF DIETARY REFERENCE INTAKES AND ITS PANEL ON FOLATE,

- O. B. V., AND CHOLINE. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. *In*, 1998.
- ISENBERG-GRZEDA, E.; KUTNER, H. E.; NICOLSON, S. E. Wernicke-Korsakoff-syndrome: under-recognized and under-treated. **Psychosomatics**, 53, n. 6, p. 507-516, 2012 Nov-Dec 2012.
- ITOKAWA, Y.; COOPER, J. R. Ion movements and thiamine. II. The release of the vitamin from membrane fragments. **Biochim Biophys Acta**, 196, n. 2, p. 274-284, 1970.
- JAWORSKI, J.; SPANGLER, S.; SEEBURG, D. P.; HOOGENRAAD, C. C. *et al.* Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. **J Neurosci**, 25, n. 49, p. 11300-11312, Dec 2005.
- JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, 293, n. 5532, p. 1074-1080, Aug 2001.
- JHALA, S. S.; HAZELL, A. S. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. **Neurochem Int**, 58, n. 3, p. 248-260, Feb 2011.
- JIN, S.; TONG, T.; FAN, W.; FAN, F. *et al.* GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. **Oncogene**, 21, n. 57, p. 8696-8704, Dec 2002.
- JUNIOR, E. V.; CESAR, C. L.; FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. Socio-economic variables influence the prevalence of inadequate nutrient intake in Brazilian adolescents: results from a population-based survey. **Public Health Nutr**, 14, n. 9, p. 1533-1538, Sep 2011.
- JURY, N.; ABARZUA, S.; DIAZ, I.; GUERRA, M. V. *et al.* Widespread loss of the silencing epigenetic mark H3K9me3 in astrocytes and neurons along with hippocampal-dependent cognitive impairment in C9orf72 BAC transgenic mice. **Clin Epigenetics**, 12, n. 1, p. 32, 02 2020.
- KAELIN, W. G.; MCKNIGHT, S. L. Influence of metabolism on epigenetics and disease. **Cell**, 153, n. 1, p. 56-69, Mar 2013.
- KARUPPAGOUNDER, S. S.; XU, H.; PECHMAN, D.; CHEN, L. H. *et al.* Translocation of amyloid precursor protein C-terminal fragment(s) to the nucleus precedes neuronal death due to thiamine deficiency-induced mild impairment of oxidative metabolism. **Neurochem Res**, 33, n. 7, p. 1365-1372, Jul 2008.
- KARUPPAGOUNDER, S. S.; XU, H.; SHI, Q.; CHEN, L. H. *et al.* Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model. **Neurobiol Aging**, 30, n. 10, p. 1587-1600, Oct 2009.

KE, Z. J.; DEGIORGIO, L. A.; VOLPE, B. T.; GIBSON, G. E. Reversal of thiamine deficiency-induced neurodegeneration. **J Neuropathol Exp Neurol**, 62, n. 2, p. 195-207, Feb 2003.

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

KERRISK, M. E.; CINGOLANI, L. A.; KOLESKE, A. J. ECM receptors in neuronal structure, synaptic plasticity, and behavior. **Prog Brain Res**, 214, p. 101-131, 2014.

KIM, D. Y.; RHEE, I.; PAIK, J. Metabolic circuits in neural stem cells. **Cell Mol Life Sci**, 71, n. 21, p. 4221-4241, Nov 2014.

KINNERSLEY, H. W.; PETERS, R. A. Carbohydrate metabolism in birds: Brain localisation of lactic acidosis in avitaminosis B, and its relation to the origin of symptoms. **Biochem J**, 24, n. 3, p. 711-722, 1930.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Curr Biol**, 25, n. 23, p. R1116-1121, Dec 2015.

KOHMAN, R. A.; RHODES, J. S. Neurogenesis, inflammation and behavior. **Brain Behav Immun**, 27, n. 1, p. 22-32, Jan 2013.

KOPELMAN, M. D.; THOMSON, A. D.; GUERRINI, I.; MARSHALL, E. J. The Korsakoff syndrome: clinical aspects, psychology and treatment. **Alcohol Alcohol**, 44, n. 2, p. 148-154, 2009 Mar-Apr 2009.

KORSAKOFF, S. S. Psychic disorder in conjunction with peripheral neuritis. 1889a.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, 128, n. 4, p. 693-705, Feb 2007.

KOZAREVA, D. A.; CRYAN, J. F.; NOLAN, Y. M. Born this way: Hippocampal neurogenesis across the lifespan. **Ageing Cell**, 18, n. 5, p. e13007, 10 2019.

KRAFT, C. E.; ANGERT, E. R. Competition for vitamin B1 (thiamin) structures numerous ecological interactions. **Q Rev Biol**, 92, n. 2, p. 151-168, Jun 2017.

KRATHWOHL, M. D.; KAISER, J. L. Chemokines promote quiescence and survival of human neural progenitor cells. **Stem Cells**, 22, n. 1, p. 109-118, 2004.

KUHN, H. G.; TODA, T.; GAGE, F. H. Adult Hippocampal Neurogenesis: A Coming-of-Age Story. **J Neurosci**, 38, n. 49, p. 10401-10410, 12 2018.

LANDRETH, G. E. Microglia in central nervous system diseases. **J Neuroimmune Pharmacol**, 4, n. 4, p. 369-370, Dec 2009.

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

LE BELLE, J. E.; OROZCO, N. M.; PAUCAR, A. A.; SAXE, J. P. *et al.* Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. **Cell Stem Cell**, 8, n. 1, p. 59-71, Jan 2011.

LE FOLL, C.; LEVIN, B. E. Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 310, n. 11, p. R1186-1192, 06 2016.

LEE, J.; DUAN, W.; LONG, J. M.; INGRAM, D. K. *et al.* Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. **J Mol Neurosci**, 15, n. 2, p. 99-108, Oct 2000.

LEE, S.; LEE, S. K. Crucial roles of histone-modifying enzymes in mediating neural cell-type specification. **Curr Opin Neurobiol**, 20, n. 1, p. 29-36, Feb 2010.

LEE, S.; YANG, G.; YONG, Y.; LIU, Y. *et al.* ADAR2-dependent RNA editing of GluR2 is involved in thiamine deficiency-induced alteration of calcium dynamics. **Mol Neurodegener**, 5, p. 54, Nov 2010.

LEIB, S. L.; CLEMENTS, J. M.; LINDBERG, R. L.; HEIMGARTNER, C. *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. **Brain**, 124, n. Pt 9, p. 1734-1742, Sep 2001.

LETOURNEAU, P. C.; CONDIC, M. L.; SNOW, D. M. Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. **J Neurosci**, 14, n. 3 Pt 1, p. 915-928, Mar 1994.

LEVENSON, J. M.; ROTH, T. L.; LUBIN, F. D.; MILLER, C. A. *et al.* Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. **J Biol Chem**, 281, n. 23, p. 15763-15773, Jun 2006.

LILJA, T.; HELDRING, N.; HERMANSON, O. Like a rolling histone: epigenetic regulation of neural stem cells and brain development by factors controlling histone acetylation and methylation. **Biochim Biophys Acta**, 1830, n. 2, p. 2354-2360, Feb 2013.

LIM, D. A.; HUANG, Y. C.; SWIGUT, T.; MIRICK, A. L. *et al.* Chromatin remodelling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. **Nature**, 458, n. 7237, p. 529-533, Mar 2009.

LISHMAN, W. A. Alcohol and the brain. **Br J Psychiatry**, 156, p. 635-644, May 1990.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LLORENS-BOBADILLA, E.; ZHAO, S.; BASER, A.; SAIZ-CASTRO, G. *et al.* Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. **Cell Stem Cell**, 17, n. 3, p. 329-340, Sep 2015.

LOENARZ, C.; SCHOFIELD, C. J. Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. **Trends Biochem Sci**, 36, n. 1, p. 7-18, Jan 2011.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, 15, n. 12, p. 550, 2014.

MACHADO, A.; MACHADO HAERTEL, L. **Neuroanatomia Funcional**. 3 ed. Atheneu, 2006. 344 p.

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

MATTSON, M. P.; MOEHL, K.; GHENA, N.; SCHMAEDICK, M. *et al.* Publisher Correction: Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. **Nat Rev Neurosci**, 21, n. 8, p. 445, Aug 2020.

MCDONOUGH, M. A.; LOENARZ, C.; CHOWDHURY, R.; CLIFTON, I. J. *et al.* Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases. **Curr Opin Struct Biol**, 20, n. 6, p. 659-672, Dec 2010.

MELI, D. N.; COIMBRA, R. S.; ERHART, D. G.; LOQUET, G. *et al.* Doxycycline reduces mortality and injury to the brain and cochlea in experimental pneumococcal meningitis. **Infect Immun**, 74, n. 7, p. 3890-3896, Jul 2006.

MENG, J.; LI, Y.; CAMARILLO, C.; YAO, Y. *et al.* The anti-tumor histone deacetylase inhibitor SAHA and the natural flavonoid curcumin exhibit synergistic neuroprotection against amyloid-beta toxicity. **PLoS One**, 9, n. 1, p. e85570, 2014.

MOHN, F.; WEBER, M.; REBHAN, M.; ROLOFF, T. C. *et al.* Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. **Mol Cell**, 30, n. 6, p. 755-766, Jun 2008.

MONJE, M. L.; TODA, H.; PALMER, T. D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, 302, n. 5651, p. 1760-1765, Dec 2003.

MORRIS, A. A. Cerebral ketone body metabolism. **J Inherit Metab Dis**, 28, n. 2, p. 109-121, 2005.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L. *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat Methods**, 5, n. 7, p. 621-628, Jul 2008.

- MUDBHARY, R.; SADLER, K. C. Epigenetics, development, and cancer: zebrafish make their mark. **Birth Defects Res C Embryo Today**, 93, n. 2, p. 194-203, Jun 2011.
- MUNUJOS, P.; VENDRELL, M.; FERRER, I. Proto-oncogene c-fos induction in thiamine-deficient encephalopathy. Protective effects of nicardipine on pyrithiamine-induced lesions. **J Neurol Sci**, 118, n. 2, p. 175-180, Sep 1993.
- NAMIHIRA, M.; KOHYAMA, J.; SEMI, K.; SANOSAKA, T. *et al.* Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. **Dev Cell**, 16, n. 2, p. 245-255, Feb 2009.
- NARDONE, R.; HÖLLER, Y.; STORTI, M.; CHRISTOVA, M. *et al.* Thiamine deficiency induced neurochemical, neuroanatomical, and neuropsychological alterations: a reappraisal. **ScientificWorldJournal**, 2013, p. 309143, 2013.
- NG, S. S.; YUE, W. W.; OPPERMANN, U.; KLOSE, R. J. Dynamic protein methylation in chromatin biology. **Cell Mol Life Sci**, 66, n. 3, p. 407-422, Feb 2009.
- NUNES, P. T.; GÓMEZ-MENDOZA, D. P.; REZENDE, C. P.; FIGUEIREDO, H. C. P. *et al.* Thalamic Proteome Changes and Behavioral Impairments in Thiamine-deficient Rats. **Neuroscience**, 385, p. 181-197, 08 2018.
- OTA, Y.; CAPIZZANO, A. A.; MORITANI, T.; NAGANAWA, S. *et al.* Comprehensive review of Wernicke encephalopathy: pathophysiology, clinical symptoms and imaging findings. **Jpn J Radiol**, 38, n. 9, p. 809-820, Sep 2020.
- PARK, L. C.; ZHANG, H.; GIBSON, G. E. Co-culture with astrocytes or microglia protects metabolically impaired neurons. **Mech Ageing Dev**, 123, n. 1, p. 21-27, Dec 2001.
- PATTARONI, C.; JACOB, C. Histone methylation in the nervous system: functions and dysfunctions. **Mol Neurobiol**, 47, n. 2, p. 740-756, Apr 2013.
- PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91, n. 22, p. 10625-10629, Oct 1994.
- PETERS, R. A., M.C., M.D., F.R.S. THE BIOCHEMICAL LESION IN VITAMIN B₁ DEFICIENCY: APPLICATION OF MODERN BIOCHEMICAL ANALYSIS IN ITS DIAGNOSIS. **The Lancet**, 227, n. 5882, p. 1161-1165, 1936.
- PUNTAMBEKAR, S. S.; DOOSE, J. M.; CARSON, M. J. Microglia: A CNS-Specific Tissue Macrophage. *In*: LANE , T. E.; CARSON , M., *et al* (Ed.). **Central Nervous System Diseases and Inflammation**. Boston, MA: Springer, 2008. p. 1-12.
- QIN, L.; CREWS, F. T. Focal thalamic degeneration from ethanol and thiamine deficiency is associated with neuroimmune gene induction, microglial activation, and lack of monocarboxylic acid transporters. **Alcohol Clin Exp Res**, 38, n. 3, p. 657-671, Mar 2014.

RAINETEAU, O.; RIETSCHIN, L.; GRADWOHL, G.; GUILLEMOT, F. *et al.* Neurogenesis in hippocampal slice cultures. **Mol Cell Neurosci**, 26, n. 2, p. 241-250, Jun 2004.

RAZIN, A.; KANTOR, B. DNA methylation in epigenetic control of gene expression. **Prog Mol Subcell Biol**, 38, p. 151-167, 2005.

REICH, M.; LIEFELD, T.; GOULD, J.; LERNER, J. *et al.* GenePattern 2.0. **Nat Genet**, 38, n. 5, p. 500-501, May 2006.

RENTHAL, W.; MARIN-VALENCIA, I.; EVANS, P. A. Thiamine deficiency secondary to anorexia nervosa: an uncommon cause of peripheral neuropathy and Wernicke encephalopathy in adolescence. **Pediatr Neurol**, 51, n. 1, p. 100-103, Jul 2014.

RESENDE, L. S.; RIBEIRO, A. M.; WERNER, D.; HALL, J. M. *et al.* Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. **Behav Brain Res**, 232, n. 2, p. 421-425, Jul 2012.

ROBERTSON, D. M.; MANZ, H. J.; HAAS, R. A.; MEYERS, N. Glucose uptake in the brainstem of thiamine-deficient rats. **Am J Pathol**, 79, n. 1, p. 107-118, Apr 1975.

ROBIN, C.; JAFFREDO, T.; ZAEHRES, H. Stem cell reprogramming: blood, neurons, and beyond. **FEBS Lett**, 593, n. 23, p. 3241-3243, 12 2019.

ROLAND, J. J.; SAVAGE, L. M. Blunted hippocampal, but not striatal, acetylcholine efflux parallels learning impairment in diencephalic-lesioned rats. **Neurobiol Learn Mem**, 87, n. 1, p. 123-132, Jan 2007.

ROTHWELL, N. J.; RELTON, J. K. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. **Neurosci Biobehav Rev**, 17, n. 2, p. 217-227, 1993.

RUBERT, A.; ENGEL, B.; ROHLFES, A. L. B.; MARQUARDT, L. *et al.* Vitaminas do complexo B: uma breve revisão. Santa Cruz do Sul: Revista Jovens Pesquisadores. 7: 30-45 p. 2017.

SAKATA, Y.; ZHUANG, H.; KWANSA, H.; KOEHLER, R. C. *et al.* Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. **Exp Neurol**, 224, n. 1, p. 325-329, Jul 2010.

SANTOS-ROSA, H.; SCHNEIDER, R.; BANNISTER, A. J.; SHERRIFF, J. *et al.* Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. **Nature**, 419, n. 6905, p. 407-411, Sep 2002.

SATO, F.; TSUCHIYA, S.; MELTZER, S. J.; SHIMIZU, K. MicroRNAs and epigenetics. **FEBS J**, 278, n. 10, p. 1598-1609, May 2011.

SAVAGE, L. M.; HALL, J. M.; RESENDE, L. S. Translational rodent models of Korsakoff syndrome reveal the critical neuroanatomical substrates of memory dysfunction and recovery. **Neuropsychol Rev**, 22, n. 2, p. 195-209, Jun 2012.

SCHURR, A. Glycolysis Paradigm Shift Dictates a Reevaluation of Glucose and Oxygen Metabolic Rates of Activated Neural Tissue. **Front Neurosci**, 12, p. 700, 2018.

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

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

SEMENZA, G. L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. **Biochem J**, 405, n. 1, p. 1-9, Jul 2007.

SHABAN, S.; EL-HUSSENY, M. W. A.; ABUSHOUK, A. I.; SALEM, A. M. A. *et al.* Effects of Antioxidant Supplements on the Survival and Differentiation of Stem Cells. **Oxid Med Cell Longev**, 2017, p. 5032102, 2017.

SHEU, J. N.; LIAO, W. C.; WU, U. I.; SHYU, L. Y. *et al.* Resveratrol suppresses calcium-mediated microglial activation and rescues hippocampal neurons of adult rats following acute bacterial meningitis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 36, n. 2, p. 137-148, Mar 2013.

SINGLETON, C. K.; MARTIN, P. R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Curr Mol Med**, 1, n. 2, p. 197-207, May 2001.

SNIGDHA, S.; PRIETO, G. A.; PETROSYAN, A.; LOERTSCHER, B. M. *et al.* H3K9me3 Inhibition Improves Memory, Promotes Spine Formation, and Increases BDNF Levels in the Aged Hippocampus. **J Neurosci**, 36, n. 12, p. 3611-3622, Mar 2016.

STOPPINI, L.; BUCHS, P. A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J Neurosci Methods**, 37, n. 2, p. 173-182, Apr 1991.

SUH, H.; CONSIGLIO, A.; RAY, J.; SAWAI, T. *et al.* In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. **Cell Stem Cell**, 1, n. 5, p. 515-528, Nov 2007.

SUI, L.; WANG, J.; LI, B. M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. **Learn Mem**, 15, n. 10, p. 762-776, Oct 2008.

TANG, F.; LANE, S.; KORSAK, A.; PATON, J. F. *et al.* Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. **Nat Commun**, 5, p. 3284, 2014.

- TAVERNA, S. D.; LI, H.; RUTHENBURG, A. J.; ALLIS, C. D. *et al.* How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. **Nat Struct Mol Biol**, 14, n. 11, p. 1025-1040, Nov 2007.
- THAUVIN-ROBINET, C.; FAIVRE, L.; BARBIER, M. L.; CHEVRET, L. *et al.* Severe lactic acidosis and acute thiamin deficiency: a report of 11 neonates with unsupplemented total parenteral nutrition. **J Inherit Metab Dis**, 27, n. 5, p. 700-704, 2004.
- THOMSON, A. D.; BAKER, H.; LEEVY, C. M. Patterns of 35S-thiamine hydrochloride absorption in the malnourished alcoholic patient. **J Lab Clin Med**, 76, n. 1, p. 34-45, Jul 1970.
- THOMSON, A. D.; COOK, C. C.; GUERRINI, I.; SHEEDY, D. *et al.* Wernicke's encephalopathy revisited. Translation of the case history section of the original manuscript by Carl Wernicke 'Lehrbuch der Gehirnkrankheiten für Aerzte und Studierende' (1881) with a commentary. **Alcohol Alcohol**, 43, n. 2, p. 174-179, 2008 Mar-Apr 2008.
- THOMSON, A. D.; GUERRINI, I.; MARSHALL, E. J. The evolution and treatment of Korsakoff's syndrome: out of sight, out of mind? **Neuropsychol Rev**, 22, n. 2, p. 81-92, Jun 2012.
- TODD, K.; BUTTERWORTH, R. F. Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. **Ann N Y Acad Sci**, 893, p. 404-411, 1999.
- TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F. Evaluation of the role of NMDA-mediated excitotoxicity in the selective neuronal loss in experimental Wernicke encephalopathy. **Exp Neurol**, 149, n. 1, p. 130-138, Jan 1998.
- TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F. Early microglial response in experimental thiamine deficiency: an immunohistochemical analysis. **Glia**, 25, n. 2, p. 190-198, Jan 1999.
- TONG, X.; ZHAO, F.; THOMPSON, C. B. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. **Curr Opin Genet Dev**, 19, n. 1, p. 32-37, Feb 2009.
- TORVIK, A.; LINDBOE, C. F.; ROGDE, S. Brain lesions in alcoholics. A neuropathological study with clinical correlations. **J Neurol Sci**, 56, n. 2-3, p. 233-248, Nov 1982.
- TROUTMAN, T. D.; BAZAN, J. F.; PASARE, C. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. **Cell Cycle**, 11, n. 19, p. 3559-3567, Oct 2012.
- TYLICKI, A.; ŁOTOWSKI, Z.; SIEMIENIUK, M.; RATKIEWICZ, A. Thiamine and selected thiamine antivitamin - biological activity and methods of synthesis. **Biosci Rep**, 38, n. 1, 02 2018.

VANNUCCHI, H.; CUNHA, S. F. D. C. D. Vitaminas do Complexo B: Tiamina, Riboflavina, Niacina, Piridoxina, Biotina e Ácido Pantotênico. ILSI Brasil. 9 2009.

VEMUGANTI, R.; KALLURI, H.; YI, J. H.; BOWEN, K. K. *et al.* Gene expression changes in thalamus and inferior colliculus associated with inflammation, cellular stress, metabolism and structural damage in thiamine deficiency. **Eur J Neurosci**, 23, n. 5, p. 1172-1188, Mar 2006.

VETRENO, R. P.; HALL, J. M.; SAVAGE, L. M. Alcohol-related amnesia and dementia: animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. **Neurobiol Learn Mem**, 96, n. 4, p. 596-608, Nov 2011.

VETRENO, R. P.; RAMOS, R. L.; ANZALONE, S.; SAVAGE, L. M. Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Brain Res**, 1436, p. 178-192, Feb 2012.

VICTOR, M.; ADAMS, R. D.; COLLINS, G. H. The Wernicke-Korsakoff syndrome. A clinical and pathological study of 245 patients, 82 with post-mortem examinations. **Contemp Neurol Ser**, 7, p. 1-206, 1971.

VILCHEZ, D.; ROS, S.; CIFUENTES, D.; PUJADAS, L. *et al.* Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. **Nat Neurosci**, 10, n. 11, p. 1407-1413, Nov 2007.

VOJTEK, A. B.; TAYLOR, J.; DERUITER, S. L.; YU, J. Y. *et al.* Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. **Mol Cell Biol**, 23, n. 13, p. 4417-4427, Jul 2003.

VOLODKO, N.; GORDON, M.; SALLA, M.; GHAZALEH, H. A. *et al.* RASSF tumor suppressor gene family: biological functions and regulation. **FEBS Lett**, 588, n. 16, p. 2671-2684, Aug 2014.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. **Endeavour**, 1, p. 18–20, 1942.

WAGNER, E. J.; CARPENTER, P. B. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 2, p. 115-126, Jan 2012.

WAITE, K.; EICKHOLT, B. J. The neurodevelopmental implications of PI3K signaling. **Curr Top Microbiol Immunol**, 346, p. 245-265, 2010.

WANG, D.; HAZELL, A. S. Microglial activation is a major contributor to neurologic dysfunction in thiamine deficiency. **Biochem Biophys Res Commun**, 402, n. 1, p. 123-128, Nov 2010.

WANG, X.; XU, M.; FRANK, J. A.; KE, Z. J. *et al.* Thiamine deficiency induces endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in human neurons derived from induced pluripotent stem cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, 320, p. 26-31, 04 2017.

WANG, Z.; TANG, B.; HE, Y.; JIN, P. DNA methylation dynamics in neurogenesis. **Epigenomics**, 8, n. 3, p. 401-414, Mar 2016.

WEI, Z.; CHEN, X.; CHEN, J.; WANG, W. *et al.* RASSF10 is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in gastric cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, 432, n. 4, p. 632-637, Mar 2013.

WEINHOLD, B. Epigenetics: the science of change. **Environ Health Perspect**, 114, n. 3, p. A160-167, Mar 2006.

WHITFIELD, K. C.; SMITH, G.; CHAMNAN, C.; KARAKOCHUK, C. D. *et al.* High prevalence of thiamine (vitamin B1) deficiency in early childhood among a nationally representative sample of Cambodian women of childbearing age and their children. **PLoS Negl Trop Dis**, 11, n. 9, p. e0005814, Sep 2017.

WIJNIA, J. W.; OUDMAN, E.; BRESSER, E. L.; GERRIDZEN, I. J. *et al.* Need for early diagnosis of mental and mobility changes in Wernicke encephalopathy. **Cogn Behav Neurol**, 27, n. 4, p. 215-221, Dec 2014.

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

WOJTOWICZ, J. M.; KEE, N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. **Nat Protoc**, 1, n. 3, p. 1399-1405, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, U. N. H. C. F. R. **Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies**. World Health Organization, 1999. 52 p.

WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nat Rev Genet**, 18, n. 9, p. 517-534, 09 2017.

WYSS, M. T.; JOLIVET, R.; BUCK, A.; MAGISTRETTI, P. J. *et al.* In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. **J Neurosci**, 31, n. 20, p. 7477-7485, May 2011.

YONEYAMA, M.; KAWADA, K.; GOTOH, Y.; SHIBA, T. *et al.* Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. **Neurochem Int**, 56, n. 6-7, p. 740-746, 2010 May-Jun 2010.

YOUN, H. D. Methylation and demethylation of DNA and histones in chromatin: the most complicated epigenetic marker. **Exp Mol Med**, 49, n. 4, p. e321, 04 2017.

ZHANG, Q.; YANG, G.; LI, W.; FAN, Z. *et al.* Thiamine deficiency increases β -secretase activity and accumulation of β -amyloid peptides. **Neurobiol Aging**, 32, n. 1, p. 42-53, Jan 2011.

ZHANG, R. R.; CUI, Q. Y.; MURAI, K.; LIM, Y. C. *et al.* Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. **Cell Stem Cell**, 13, n. 2, p. 237-245, Aug 2013.

ZHANG, S. X.; WEILERSBACHER, G. S.; HENDERSON, S. W.; CORSO, T. *et al.* Excitotoxic cytopathology, progression, and reversibility of thiamine deficiency-induced diencephalic lesions. **J Neuropathol Exp Neurol**, 54, n. 2, p. 255-267, Mar 1995.

ZHANG, X.; HE, X.; LI, Q.; KONG, X. *et al.* PI3K/AKT/mTOR Signaling Mediates Valproic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells through Epigenetic Modifications. **Stem Cell Reports**, 8, n. 5, p. 1256-1269, 05 2017.

ZHAO, N.; ZHONG, C.; WANG, Y.; ZHAO, Y. *et al.* Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. **Neurobiol Dis**, 29, n. 2, p. 176-185, Feb 2008.

ZHAO, Y.; PAN, X.; ZHAO, J.; WANG, Y. *et al.* Decreased transketolase activity contributes to impaired hippocampal neurogenesis induced by thiamine deficiency. **J Neurochem**, 111, n. 2, p. 537-546, Oct 2009.

ZHAO, Y.; WU, Y.; HU, H.; CAI, J. *et al.* Downregulation of transketolase activity is related to inhibition of hippocampal progenitor cell proliferation induced by thiamine deficiency. **Biomed Res Int**, 2014, p. 572915, 2014.

ZHENG, X.; BOYER, L.; JIN, M.; MERTENS, J. *et al.* Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. **Elife**, 5, 06 2016.

ŻAKOWSKI, W. Animal Use in Neurobiological Research. **Neuroscience**, 433, p. 1-10, 05 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A: *Pipeline* utilizado para processamento, mapeamento e análise das reads obtidas através do RNA-Seq de COHs cultivadas por 9 dias em DT.

```
#Formatação das reads brutas - Trimmomatic

java -jar trimmomatic-0.35.jar PE -phred33 input_forward.fq.gz
input_reverse.fq.gz output_forward_paired.fq.gz
output_forward_unpaired.fq.gz output_reverse_paired.fq.gz
output_reverse_unpaired.fq.gz ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10
LEADING:5 TRAILING:5 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50

#Gerando os arquivos indexes do genoma de referência - STAR

STAR --runThreadN 8 --runMode genomeGenerate --genomeDir /ref_genome_path
--genomeFastaFiles /ref_genome.fa --sjdbGTFfile /ref_genome.gtf --
sjdbOverhang 74

#Mapeamento e contagem das reads - STAR

for i in `ls /indexes_path/`;
do STAR --runThreadN 8 --genomeDir /ref_genome_path --readFilesIn
/indexes_path/$i --readFilesCommand zcat --outSAMtype BAM
SortedByCoordinate --quantMode GeneCounts;
done
```

FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Trimmomatic é uma ferramenta de linha de comando que pode ser usada para processar e remover adaptadores de dados FASTQ gerados em sequenciamentos na plataforma Illumina. Os comandos executados realizaram as seguintes ações:

- Remoção de adaptadores (ILLUMINACLIP: TruSeq3-PE.fa: 2: 30: 10)
- Remoção de bases de baixa qualidade no início da *read* (abaixo da qualidade 5) (LEADING: 5)
- Remoção das bases de baixa qualidade no final da *read* (abaixo da qualidade 5) (TRAILING: 5)
- Leitura das *reads* com uma janela de quatro bases, cortando quando a qualidade média por base for menor do que 15 (SLIDINGWINDOW: 4:15)
- Remoção de reads abaixo de 36 bases de comprimento (MINLEN: 36)

Para determinar o sítio do genoma do rato a partir do qual os mRNAs que originaram as *reads* foram transcritos, estas foram alinhadas ao genoma de referência usando o programa STAR. Os comandos executados realizaram as seguintes ações:

- Criação dos arquivos de índices do genoma (--runMode genomeGenerate; --sjdbOverhang);
- Mapeamento das *reads* no genoma de referência (--readFilesIn);
- Contagem de *reads* mapeadas (--quantMode GeneCounts)

APÊNDICE B: *Pipeline* utilizado para análise de contraste dos perfis transcricionais das COHs cultivadas por 9 dias em DT em relação ao grupo controle.

```
#Carregamento das bibliotecas necessárias:
library(DESeq2)
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(pheatmap)
library(apeglm)
library(gplots)

#Leitura das contagens:
dados <- read.table("input_file", header=T, row.names=1)

#Definição das replicatas:
replicas <- rep(c("Control","Test"), c(3,3))

#Criando colData:
colData = data.frame (condition=as.factor (replicas))
rownames(colData) <- colnames(dados)

#Confirmando se dados e colData estão na mesma ordem:
all(rownames(colData)==colnames(dados))

#Análise de expressão diferencial
#Criando objeto dds:
ddsData <- DESeqDataSetFromMatrix(dados, colData, formula (~condition))
ddsData
dds <- DESeq(ddsData)

#Obtendo o resultado da análise de expressão diferencial:
res <- results(dds)
res.lfs <- lfcShrink(dds = dds, res = res, coef = 2 , type = "apeglm")

#Resumo dos resultados:
summary(res.lfs)
mcols(res.lfs, use.names = TRUE)

#Resumo do GDE (Genes diferencialmente expressos):
sum(res.lfs$padj < 0.05, na.rm = TRUE)
sum(res.lfs$pvalue < 0.05, na.rm = TRUE)

sum(res.lfs$log2FoldChange >= 0.5849625 & res$padj < 0.05, na.rm = TRUE)
sum(res.lfs$log2FoldChange <= -0.5849625 & res$padj < 0.05, na.rm =
TRUE)

which(res.lfs$log2FoldChange >= 0.5849625 & res$padj < 0.05)
which(res.lfs$log2FoldChange <= -0.5849625 & res$padj < 0.05)
```

```

which(res.lfs$log2FoldChange >= 0.5849625 & res$padj < 0.05)
which(res.lfs$log2FoldChange <= -0.5849625 & res$padj < 0.05)

select <- which(res.lfs$padj < 0.05 & abs(res.lfs$log2FoldChange) >=
log2(1.5))
select
length(select)

#Transformação dos dados com Variance Stabilizing Transformation
vsd <- varianceStabilizingTransformation(dds)
assay(vsd)
table = assay(vsd)[select,]

#Produzindo as tabelas de genes diferencialmente expressos:
resOrder <- res.lfs[order(res.lfs$padj),]
res.tab <- data.frame(resOrder)

res.padj <- res.tab[res.tab$padj<0.05, ]
res.padj <- res.padj[!is.na(res.padj$padj),]
write.csv(res.padj, "deseq2_diffexp_005.csv")

de_up <- res.padj[res.padj$log2FoldChange >= 0.5849625, ]
write.csv(de_up, "deseq2_diffexp_005_50percent_upFoldChange.csv")

de_down <- res.padj[res.padj$log2FoldChange <= -0.5849625, ]
write.csv(de_down, "deseq2_diffexp_005_50percent_downFoldChange.csv")

```

FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: O DESeq2 é uma ferramenta que estima a dependência média da variância em dados de contagem de ensaios de sequenciamento e testa a expressão diferencial dos genes com base em um modelo de distribuição binomial negativa.

APÊNDICE C: Genes diferencialmente expressos nas COHs cultivadas por 9 dias em DT em relação ao grupo controle

Ensembl ID	Gene symbol	Proteína codificada	UNIPROT ID	Fold Change	Adj <i>P</i> -value
ENSRNOG00000000463	<i>Col11a2</i>	Collagen type XI alpha 2 chain	F6T0B3	1.51025	3.04E-03
ENSRNOG000000001469	<i>Eln</i>	Elastin	D4A9U4	1.53873	3.21E-03
ENSRNOG000000002050	<i>Igfbp7</i>	Insulin-like growth factor binding protein 7	F1M9B2	0.57916	4.45E-08
ENSRNOG000000002468	<i>Tnr</i>	Tenascin-R	F1LQ63	1.57160	1.74E-03
ENSRNOG000000002843	<i>Cxcl6</i>	C-X-C motif chemokine 6	G3V6C8	0.57205	1.18E-05
ENSRNOG000000003537	<i>Spta1</i>	Spectrin	D4A678	2.35701	2.56E-35
ENSRNOG000000003887	<i>Lgi2</i>	Leucine-rich repeat LGI family member 2	F7ESR8	0.48128	4.17E-10
ENSRNOG000000004861	<i>Itga4</i>	Integrin subunit alpha 4	D3ZMQ3	1.61018	7.89E-04
ENSRNOG000000005130	<i>Ogdh</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E1	Q5XI78	1.54902	1.80E-08
ENSRNOG000000005731	<i>Birc3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 3	F7FLN8	0.65789	4.33E-03
ENSRNOG000000005830	<i>Fam19a4</i>	Fam19a4 protein	B1H244	0.64612	1.59E-04
ENSRNOG000000006735	<i>Cdkn2b</i>	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B	Q5PQW4	0.64041	2.07E-03
ENSRNOG000000006956	<i>AABR07049085.1</i>	Uncharacterized protein	F1M3T9	0.62867	1.16E-03
ENSRNOG000000007319	<i>Trib3</i>	Tribbles homolog 3	Q9WTQ6	0.63385	1.24E-03
ENSRNOG000000007457	<i>Serping1</i>	Plasma protease C1 inhibitor	Q6P734	0.56281	2.48E-09
ENSRNOG000000008001	<i>Rab3b</i>	Ras-related protein Rab-3B	Q63941	0.61693	8.02E-05
ENSRNOG000000008173	<i>Sesn3</i>	Sestrin 3	D4A469	1.51102	4.89E-03
ENSRNOG000000008178	<i>Nxn</i>	Nucleoredoxin	D4A0M2	0.65544	1.93E-09
ENSRNOG000000008257	<i>Mfap2</i>	Microfibril-associated protein 2	D3Z952	1.70876	1.62E-05

ENSRNOG00000008602	<i>Steap4</i>	Metalloreductase 4	Q4V8K1	0.49561	2.03E-09
ENSRNOG00000008615	<i>Mal2</i>	Mal T-cell differentiation protein 2	Q7TPB7	0.65474	4.68E-03
ENSRNOG00000008622	<i>Creb5</i>	cAMP-responsive element-binding protein 5	D3ZBH0	1.55331	3.55E-04
ENSRNOG00000008798	<i>Pipox</i>	Pipelicolic acid oxidase	Q5I0K1	0.64151	2.16E-03
ENSRNOG00000009253	<i>Igsf9b</i>	Immunoglobulin superfamily member 9B	D3ZB51	1.57963	1.43E-03
ENSRNOG00000009620	<i>Cybrd1</i>	Cytochrome b reductase 1	Q5RKJ2	2.08759	2.34E-22
ENSRNOG00000009980	<i>Plpp1</i>	Phospholipid phosphatase 1	G3V9Y2	0.65704	7.87E-09
ENSRNOG00000010047	<i>Ddit4l</i>	DNA damage-inducible transcript 4-like protein	Q8VD50	1.79506	8.18E-11
ENSRNOG00000010454	<i>Ccno</i>	Cyclin O	D3ZHT5	0.61105	3.55E-04
ENSRNOG00000010478	<i>Serpina3n</i>	Serine protease inhibitor A3N	A0A0H2UH15	0.35853	3.28E-24
ENSRNOG00000010841	<i>Col8a2</i>	Collagen type VIII alpha 2 chain	D4ADG9	1.62377	5.33E-04
ENSRNOG00000012031	<i>St8sia2</i>	Alpha-2,8-sialyltransferase 8B	Q07977	1.69166	3.63E-05
ENSRNOG00000012235	<i>Ppp1r17</i>	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 17	Q8CJC8	0.57387	3.51E-07
ENSRNOG00000012280	<i>Ptx3</i>	Pentraxin 3	D3ZT94	0.65833	8.63E-04
ENSRNOG00000012302	<i>Gucy1a1</i>	Guanylate cyclase soluble subunit alpha-1	Q5U330	0.63848	2.07E-03
ENSRNOG00000012772	<i>Nqo1</i>	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	P05982	1.51861	3.18E-03
ENSRNOG00000013484	<i>Gsta3</i>	Glutathione S-transferase alpha-3	P04904	1.52838	1.74E-03
ENSRNOG00000013729	<i>RGD1306271</i>	Similar to KIAA1549 protein	D3Z9D0	1.55242	4.72E-05
ENSRNOG00000013820	<i>Tnfrsf14</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14	Q5BK53	0.64822	2.07E-03
ENSRNOG00000013917	<i>Igsf10</i>	Immunoglobulin superfamily member 10	G3V7S1	1.64161	4.05E-05
ENSRNOG00000013973	<i>Lcn2</i>	Lipocalin-2	P30152	0.35529	5.19E-22
ENSRNOG00000014046	<i>Sertm1</i>	Serine-rich and transmembrane domain-containing 1	D3ZR22	0.61655	3.88E-04

ENSRNOG00000014314	<i>Slc39a4</i>	Solute carrier family 39 member 4	A0A0H2UHY4	1.69177	8.46E-05
ENSRNOG00000014371	<i>Cdh13</i>	Cadherin 13	F1M7X3	0.45024	4.44E-14
ENSRNOG00000014847	<i>Rassf10</i>	Ras association domain family member 10)	A0A0G2JT12	0.61110	4.19E-04
ENSRNOG00000014948	<i>Osgin1</i>	Oxidative stress-induced growth inhibitor	Q8R430	1.50533	1.88E-03
ENSRNOG00000015055	<i>Scg2</i>	Secretogranin-2	G3V7X2	0.64374	2.02E-03
ENSRNOG00000015354	<i>Aox1</i>	Aldehyde oxidase 1	F1LRQ1	1.61296	1.03E-04
ENSRNOG00000016581	<i>Serpinb1a</i>	Serine protease inhibitor family B member 1A	Q4G075	0.66141	4.65E-03
ENSRNOG00000016680	<i>Nsd1</i>	Nuclear receptor binding SET domain protein 1	D4AA06	1.62707	3.90E-05
ENSRNOG00000016945	<i>Pla2g2a</i>	Phospholipase A2 group IIA	P14423	0.55398	1.66E-07
ENSRNOG00000017206	<i>Igfbp5</i>	Insulin-like growth factor-binding protein 5	P24594	2.04585	1.66E-12
ENSRNOG00000017409	<i>Wnt6</i>	Protein Wnt	D4A3W9	0.65202	4.30E-03
ENSRNOG00000017539	<i>Mmp9</i>	Matrix Metalloproteinase 9	D3ZYK8	0.54275	6.51E-07
ENSRNOG00000019048	<i>Sod2</i>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	P07895	0.62230	2.28E-04
ENSRNOG00000019120	<i>Hmgcs2</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase	Q68G44	0.57495	4.45E-08
ENSRNOG00000019822	<i>Gadd45b</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Q5U3Z2	0.66128	5.61E-04
ENSRNOG00000019500	<i>Cyp1a1</i>	Cytochrome P450 1A1	P00185	1.55644	2.37E-03
ENSRNOG00000020277	<i>Cntnap1</i>	Contactin-associated protein 1	P97846	1.55296	1.69E-04
ENSRNOG00000020482	<i>Nfatc4</i>	Nuclear factor of-activated T-cells 4	A0A0G2K0L1	1.59888	8.80E-04
ENSRNOG00000021105	<i>Gabpb2</i>	GA-binding protein transcription factor subunit beta 2	D3ZSD3	1.50081	1.43E-03
ENSRNOG00000022681	<i>RGD1561113</i>	Similar to Hypothetical UPF0184 protein	D3ZBT2	0.65584	1.67E-03
ENSRNOG00000022919	<i>Chst8</i>	Carbohydrate sulfotransferase	B1WBV7	0.59046	4.27E-05
ENSRNOG00000023548	<i>Sned1</i>	Sushi, nidogen and EGF-like domains 1	D3ZNR4	1.52444	4.65E-03

ENSRNOG00000023760	<i>Plekhm3</i>	Pleckstrin homology domain-containing M3	D4A959	1.60265	1.58E-05
ENSRNOG00000024899	<i>Cxcl13</i>	C-X-C motif chemokine ligand 13	F7F7W7	0.56468	1.47E-12
ENSRNOG00000025589	<i>Jph4</i>	Junctophilin-4	A0A0A0MY08	1.64601	3.13E-04
ENSRNOG00000026110	<i>Scml4</i>	Scm polycomb group protein-like 4	A0A0G2K2K4	1.51179	6.23E-03
ENSRNOG00000028207	<i>Colgalt2</i>	Collagen beta(1-O) galactosyltransferase 2	D3Z9Z7	1.58478	3.55E-04
ENSRNOG00000029768	<i>Ccl12</i>	C-C motif chemokine 12	D4ABS1	0.62095	7.74E-04
ENSRNOG00000031163	<i>Nfkbiz</i>	NFKB inhibitor zeta	A0A0G2K6U7	0.66318	1.18E-03
ENSRNOG00000031167	<i>AABR07054319.1</i>	Sulfiredoxin 1	Q7TP44	1.85022	4.17E-10
ENSRNOG00000032002	<i>Hapln1</i>	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	P03994	1.60636	2.40E-04
ENSRNOG00000037621	<i>Spata48</i>	Spermatogenesis associated 48	D4A9H9	1.68897	1.20E-04
ENSRNOG00000045989	<i>Hba-a3</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 3	Q63910	0.63567	1.34E-04
ENSRNOG00000046699	<i>Slpi</i>	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	A0A096MJ68	0.64224	8.70E-04
ENSRNOG00000046834	<i>C3</i>	Complement C3	M0RBJ7	0.55144	3.01E-06
ENSRNOG00000047450	<i>Lmo3</i>	LIM domain only protein 3	M0R4L0	1.59832	9.80E-04
ENSRNOG00000048088	<i>Mest</i>	Mesoderm-specific transcript homolog protein	M0R830	1.59825	2.24E-05
ENSRNOG00000050206	<i>Shank2</i>	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	Q9QX74	1.89099	3.51E-07
ENSRNOG00000052129	<i>Nwd1</i>	NACHT and WD repeat domain containing 1	A0A0G2JWP6	1.55298	6.80E-05
ENSRNOG00000053272	<i>Chi3l1</i>	Chitinase-3-like protein 1	Q9WTV1	0.56284	5.63E-07
ENSRNOG00000054314	<i>Kcng1</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily G member 1	D4AD53	1.56790	1.98E-03
ENSRNOG00000054458	<i>Kcnmb4</i>	Calcium-activated potassium channel subunit beta-4	Q9ESK8	0.64448	1.18E-03
ENSRNOG00000055078	<i>Cyp4b1</i>	Cytochrome P450 4B1	P15129	0.52021	1.26E-07
ENSRNOG00000056457	<i>Gpd1</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35077	0.55874	8.45E-08

ENSRNOG00000057221	<i>Scn3b</i>	Sodium channel subunit beta-3	Q9JK00	1.50474	1.55E-04
ENSRNOG00000059837	<i>Cdkn2a</i>	Tumor suppressor ARF	A0A0G2K211	0.60227	2.28E-04
ENSRNOG00000061215	<i>Crym</i>	Ketimine reductase mu-crystallin	A0A0G2K568	0.52656	4.36E-08
ENSRNOG00000062276	<i>AABR07044631.2</i>	Uncharacterized protein (Fragment)	A0A1W2Q6I6	1.68223	1.18E-05

FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Lista de dos genes com expressão aumentada (vermelho) ou reduzida (azul) nas COHs mantidas em DT por 9 dias em relação ao controle, encontrados na análise de contrastes pelo pacote DESeq2. Genes com *Fold Change* superior a 1,5 e valor de *P* inferior a 0,01 foram considerados como diferencialmente expressos. Identificadores UNIPROT, nomes das proteínas codificadas e símbolo dos genes foram obtidos com o web-software DAVID a partir dos identificadores Ensembl.

APÊNDICE D: Análise de enriquecimento funcional com o software DAVID dos 89 genes diferencialmente expressos

Parametrização da análise:

Consideradas somente moléculas e/ou relações onde (espécies = *Rattus norvegicus*)

Análise de enriquecimento para vias canônicas:

Vias KEGG	Genes mapeados	P-value
Tryptophan metabolism	<i>Aox1, Cyp1a1, Ogdh</i>	3,00E-03
Lysine Degradation	<i>Ogdh, Nsd1, Colgalt2</i>	5,00E-03
Cell cycle	<i>Ink4a, Ink4b, Arf, Gadd45</i>	5,00E-02
ECM-receptor interaction	<i>Col11a2, Tnr</i>	1,00E-02
PI3K-Akt signaling	<i>Creb, Ecm, Itga, Itgb</i>	3,00E-02
TNF Signaling	<i>Ccl12, Mmp9, Birc3</i>	4,00E-02

FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Lista das vias cujos componentes estão com expressão aumentada (vermelho) ou reduzida (azul) nas COHs mantidas em DT por 9 dias em relação ao controle. Valores de *P* inferiores a 0,05 no teste de Fisher denotam enriquecimento funcional.

Análise de enriquecimento para anotações GO para Processos Biológicos:

Processos Biológicos	Genes mapeados	P-value
Inflammatory response	<i>Cxcl13, Cxcl6, Nfkbia, Tnfrsf14, Ccl12, Chi3l1, C3, Serpina3n</i>	6,00E-06
Cellular response to TNF	<i>Birc3, Ccl12, Chi3l1, Gpd1, Lcn2 e Mmp9</i>	1,00E-05
Cellular response to IL-1	<i>Ccl12, Chi3l1, Lcn2, Mmp9, Serpina3n</i>	8,00E-05
Chemokine-mediated signaling pathway	<i>Cxcl13, Cxcl6 e Ccl12</i>	8,00E-03
Immune response	<i>Cxcl13, Cxcl6, Tnfrsf14, Sipi</i>	2,00E-02
Nervous system development	<i>Igsf9b, Scn3b, Tnr</i>	5,00E-02
Cell adhesion	<i>Cntnap1, Hapln1, Itga4, Tnr</i>	1,00E-02

FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Lista de anotações GO relacionadas a genes com expressão aumentada (vermelho) ou reduzida (azul) nas COHs mantidas em DT por 9 dias em relação ao controle. Valores de *P* inferiores a 0,05 no teste de Fisher denotam enriquecimento funcional.

APÊNDICE E: Análise de enriquecimento funcional no software IPA dos 89 genes diferencialmente expressos encontrados.

Parametrização da análise:

Consideradas somente moléculas e/ou relações onde (espécies = Rato) E (confiança = experimentalmente observado ou altamente predito) E (tecidos/ linhagem celular = Hipocampo OU todas as linhagens celulares do SNC OU linhagens do SNC não especificadas)

Análise de enriquecimento para vias canônicas:

Vias Canônicas	Genes mapeados	P-value
Neuroinflammation Signaling	<i>Birc3, Ccl2, Creb5, Mmp9, Nfatc4, Sod2</i>	1,00E-03
2-ketoglutarate dehydrogenase complex	<i>Ogdh</i>	2,00E-02

FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Lista das vias relacionadas a genes com expressão aumentada (vermelho) ou diminuída (azul) nas COHs mantidas em DT por 9 dias em relação ao controle. Valores de *P* inferiores a 0,05 no teste de Fisher denotam enriquecimento funcional.

Predição de reguladores *upstream*:

Reguladores	Estado predito	Genes alvo	P-value
NFE2L2	Inibido	<i>Cxcl6, Kcnb4, Scg2, Nqo1</i>	1,88E-04
CREB1	Inibido	<i>Lcn2, Gadd45b, Lmo3, Igsf9b, Crym, Scg2</i>	2,00E-05
IFNG	Inibido	<i>Ccl12, Chst8, Eln, Lcn2, Ptx3, Sod2</i>	4,70E-04
TNF	Inibido	<i>Ccl12, Itga4, Lcn2, Mmp9, Sod2</i>	2,00E-05
TGFB1	Inibido	<i>Ccl12, Chst8, Eln, Itga4, Lcn2, Ptx3</i>	5,00E-05
APP	Inibido	<i>Cxcl13, C3, Ccl12, Crym, Eln, Mmp9, Plpp1</i>	1,45E-02

FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Lista de proteínas preditas como reguladoras de genes alvo com expressão aumentada (vermelho) ou reduzida (azul) nas COHs mantidas em DT por 9 dias em relação ao controle. Relações com valor de *P* inferior a 0,05 no teste de Fisher foram considerados significativas.

Predição de reguladores causais:

Regulador central	Reguladores downstream	Genes alvo	P-value
APP	<i>Creb1, Nfkb1a, Stat3, Tlr2, Tlr4</i>	<i>Ccl12, C3, Chi3l1, Eln, Igsf9b, Gadd45b, Lcn2, Lmo3, Mmp9, Plpp1, Ptx3, Scg2, Sod2, Srxn1</i>	5,33E-09

FONTE: Elaborado pelo autor.

LEGENDA: Lista de reguladores preditos como inibidos (verde) relacionados de forma causal com a alteração da expressão de genes cuja expressão foi aumentada (vermelho) ou reduzida (azul) nas COHs mantidas em DT por 9 dias em relação ao controle. Relações com valor de *P* inferior a 0,05 no teste de Fisher foram consideradas significativas.