

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Ivonne Carolina Bolaños Burgos

Efeitos da deficiência de tiamina em camundongos adultos sobre parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos das células de Purkinje cerebelares.

Belo Horizonte

2019

Ivonne Carolina Bolaños Burgos

Efeitos da deficiência de tiamina em camundongos adultos sobre parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos das células de Purkinje cerebelares.

Dissertação submetida ao PPG 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, sob a orientação do Prof. Dr. Christopher Kushmerick.

Belo Horizonte

2019

043 Burgos, Ivonne Carolina Bolaños.
Efeitos da deficiência de tiamina em camundongos adultos sobre parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos das células de Purkinje cerebelares [manuscrito] / Ivonne Carolina Bolaños Burgos. – 2019.

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

Orientador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick.

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

1. Neurociências. 2. Deficiência de tiamina. 3. Células de Purkinje. 4. Técnicas de Patch-Clamp. I. Kushmerick, Christopher. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Efeitos da deficiência de tiamina em camundongos adultos sobre parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos das células de Purkinje cerebelares"

IVONNE CAROLINA BOLAÑOS BURGOS

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 03 de maio de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Christopher Kastrup - Orientador
UFMG

Prof(a). Antonio-Carlos Pinheiro De Almeida

Prof(a). Fernando Machado Vilhena Dias
UFOP

Belo Horizonte, 3 de maio de 2019.

Dedico este trabalho ao meu amoroso e inigualável pai Eyder,
a minha maravilhosa mãe Consuelo, a minha linda irmã Daniela
e a memória do meu avô Roberto.

AGRADECIMENTOS

A meus grandes amigos, Deus e Nossa Senhora, por sempre estarem presentes, pelo amor, confiança, companhia, colo, força, direção e luz, nesta etapa da minha vida.

A meus pais e irmã pelo grande amor, cuidado, compreensão, orações e apoio incondicional na minha vida e por serem a minha força para continuar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Christopher Kushmerick, por me receber de braços abertos no seu laboratório, por me guiar, pela paciência, atenção e por todos os ensinamentos durante o mestrado.

A professora Ligia Naves pelos ensinamentos e conhecimento compartilhados.

A professora Ângela Maria Ribeiro por abrir-me as portas no Brasil, pela direção, apoio, ensinamentos e experiências compartilhadas.

A Ana Maria Bernal meu eterno agradecimento pela entrega a este trabalho, pela amizade incondicional, carinho, ensinamentos, paciência, cuidado, total apoio e por cada dia compartilhado durante o desenvolvimento desse projeto.

Aos meus amigos do laboratório, Jennifer, Rafael, Aline, Wallace, Matheus, por todo o carinho, ajuda, paciência, suporte e ensinamentos e por sempre estarem atentos para me dar a mão.

Aos meus companheiros, André, Vanessa, Kyane, Katyana e Itamar pelo tempo compartilhado.

Aos meus companheiros do laboratório LaNeC, Mariana, Rogerio, Flavio e Isabela pela ajuda, guia e ensinamentos durante o mestrado.

Ao professor Germán Mahecha por seus ensinamentos no estudo morfológico.

Aos companheiros do Laboratório LABRE em especial a Gabriel Campolina por me guiar nas análises morfológicas e pelos ensinamentos compartilhados.

A Julia Cheik pela ajuda com os estudos morfológicos.

A família Nájera Bernal, pelo carinho e grande ajuda durante este tempo.

Aos meus amigos do Ministério Universidades Renovadas (MUR) e do Grupo de Oração Universitário FACE, pelo grande carinho e apoio, na minha vida e no mestrado.

A Juliana de Oliveira pela maravilhosa amizade, conselhos, todo o carinho e os momentos compartilhados.

A família Resgala por ser a primeira família que me recebeu e me deu todo o apoio e o carinho para me adaptar neste país.

A Jamile Cristeli pela linda amizade, pelo carinho, ajuda, pelas orações e sorrisos e todos os momentos que compartilhamos.

A família Hegermann Cristeli por serem como minha família e por me tratar como uma filha a mais.

Ao EJC por me guiar no caminho e por todos os amigos que me deu, pelo imenso carinho, por serem luz e força para minha vida.

A minhas amigas do apartamento Gabi, pelo carinho e convivência diária.

A minha família e amigos Colombianos pelo amor, apoio incondicional por sempre me esperar de braços abertos.

“O coração do homem traça seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos.”

Provérbios 16: 8.

RESUMO

A tiamina ou vitamina B1 é uma vitamina essencial que cumpre um papel essencial em muitos processos enzimáticos envolvidos no funcionamento cerebral. A tiamina age por meio das suas formas fosforiladas, tiamina monofosfato, tiamina difosfato e tiamina trifosfato, que contribuem em funções celulares incluindo o metabolismo de carboidratos, a síntese de neurotransmissores como a acetilcolina, a condutância de membrana e a transmissão sináptica. A deficiência de B1 no sistema nervoso central causa alterações no metabolismo celular que podem levar a disfunção ou morte neuronal. O cerebelo é uma das regiões do cérebro mais afetadas pela deficiência desta vitamina, em especial na parte anterior da vermis onde a deficiência de tiamina afeta o funcionamento e morfologia das células de Purkinje que formam a única via eferente desta região. Alterações na função das células de Purkinje estão relacionadas como o desenvolvimento de ataxia cerebelar um dos sinais clínicos da síndrome de Wernicke – Korsakoff, uma doença neurodegenerativa relacionada a deficiência de tiamina. No entanto, pouco se sabe dos efeitos da deficiência de tiamina sobre propriedades eletrofisiológicas e morfológicas das células de Purkinje. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da deficiência de tiamina em camundongos adultos sobre parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos das células de Purkinje em fatias da vermis cerebelar *in vitro*. Nos utilizamos um modelo de deficiência de tiamina baseado na dieta (ração livre de tiamina) e na injeção diária pirritiamina, um inibidor da tiamina difosfato (para os grupos deficientes) ou tiamina (para os grupos controles), durante 13 dias de tratamento. O tratamento foi aplicado em camundongos C57/Black, machos, adultos (8 semanas), com massa corporal de 20-25 g que foram distribuídos em 4 grupos experimentais: 1) Controle 2) Deficiente, 3) Controle recuperado e 4) Deficiente recuperado. Os animais foram submetidos a estudos eletrofisiológicos e morfológicos em uma de duas etapas: 1) no momento onde apresentaram os sinais clínicos da deficiência de tiamina ou 2) depois de um período de recuperação que consistiu em uma única aplicação de tiamina seguido por água e alimento padrão *ad libitum* durante 7 dias. Os estudos morfológicos foram feitos na primeira etapa. Os estudos eletrofisiológicos foram feitos em células de Purkinje da vermis cerebelar por meio da técnica de Patch-Clamp na modalidade *Whole-cell*,

current clamp. Foram feitos registros da atividade espontânea e aplicados protocolos de injeção de corrente para determinar a reobase, resistência de entrada e a relação entre a corrente injetada e a frequência de potenciais de ação. Nos análises morfométricos, foram analisado o número de células de Purkinje, seu diâmetro maior e diâmetro menor e o diâmetro do seu núcleo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no número ou densidade de células de Purkinje. No entanto, as medidas dos diâmetros celulares revelaram uma redução modesta (7%) mas estatisticamente significativa no tamanho do soma das células de Purkinje, principalmente ao longo do seu eixo menor nos animais deficientes de tiamina. O tamanho do núcleo também foi reduzido proporcionalmente. A redução observada no tamanho não foi, no entanto, suficiente para alterar a resistência de entrada da membrana, já que este parâmetro não foi diferente entre os grupos. A frequência de potenciais de ação espontânea e a relação entre a taxa de disparo do potencial de ação e a injeção de corrente também não foram significativamente diferentes entre os grupos. Não entanto, a reobase foi fortemente (55%) reduzida em animais deficientes em tiamina em comparação com grupos controle ou recuperados. Concluímos que a deficiência de tiamina altera as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios de Purkinje sem causar alterações morfológicas marcantes.

Palavras chave: Deficiência de tiamina, célula de Purkinje, Patch clamp

ABSTRACT

Thiamine (vitamin B1) is an essential vitamin that plays an important role in many enzymatic processes involved in brain function. Thiamine acts through its phosphorylated forms, thiamine monophosphate, thiamine diphosphate and thiamine triphosphate, that contribute to cellular functions including carbohydrate metabolism, synthesis of neurotransmitters such as acetylcholine, membrane conductance and synaptic transmission. Thiamine deficiency in the central nervous system causes changes in cellular metabolism that may lead to neuronal dysfunction or death. The cerebellum, especially the anterior vermis, is one of the brain regions most affected by thiamine deficiency, which affects the morphology and function of cerebellar Purkinje cells that form the only efferent pathway from this region. Changes in the function of Purkinje cells are related to the development of cerebellar ataxia, which is one of the clinical signs of Wernicke-Korsakoff syndrome, a neurodegenerative disease associated with thiamine deficiency. However, little is known about the effects of thiamine deficiency on the electrophysiological and morphological properties of Purkinje cells. The objective of this work was to evaluate the effects of thiamine deficiency in adult mice on electrophysiological and morphological parameters of Purkinje cells in slices of the cerebellar vermis *in vitro*. We used a model of thiamine deficiency based on diet (thiamine free chow) and daily injects of pyrithiamine, an inhibitor of thiamine diphosphate (deficient groups) or thiamine (control groups) for 13 days of treatment. The treatment was applied in C57 / Black mice, male, adult (8 weeks), 20-25 g body mass, which were distributed in 4 experimental groups: 1) Control 2) Deficient, 3) Control recovered and 4) Deficient recovered. The animals were submitted to electrophysiological and morphological studies in one of two stages: 1) when the deficient group presented clinical signs of thiamine deficiency or 2) after recovery following a single application of thiamine, followed by water and standard chow *ad libitum* for 7 days. Morphological studies were performed in the first stage. Electrophysiological studies were performed on Purkinje cells of the cerebellar vermis using the Whole-cell *current clamp* technique. Spontaneous activity and responses to current injection protocols were recorded to determine the reobase, input resistance and the relationship between the injected current and the frequency of action potentials.

For morphometric analysis, the number of Purkinje cells, their largest diameter and smallest diameter and the diameter of their nucleus were analyzed. We did not detect any significant difference between groups in the number or density of Purkinje cells. However, measurements of cell diameters revealed a modest (7%) but statistically significant reduction in the size of Purkinje cell soma, principally along its minor axis, in thiamine deficient animals. The size of the nucleus was also reduced proportionally. The observed reduction in size was not, however, sufficient to alter membrane input resistance, as this parameter was not different between groups. The frequency of spontaneous action potentials and the relationship between action potential firing rate and current injection were also not significantly different between groups. However, rebase was strongly (55%) reduced in thiamine deficient animals compared to control or to recovered groups. We conclude that thiamine deficiency changes the electrophysiology properties of Purkinje neurons without causing marked morphological alterations.

Keywords: Thiamine deficiency, cerebellar Purkinje cell, Patch clamp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas das diferentes formas da tiamina.....	21
Figura 2 - Representações das partes externas e internas do cerebelo.....	27
Figura 3 - Esquema ilustrativo do circuito neural do cerebelo.....	29
Figura 4 - Representação esquemática do delineamento experimental.....	42
Figura 5 - Montagem do cerebelo para cortes no micrótomo de lâmina vibratório.....	44
Figura 6 - Esquema do cronograma dos experimentos eletrofisiológicos.....	45
Figura 7 - Identificação das células de Purkinje.....	50
Figura 8 - Variação do peso dos animais durante o tratamento de deficiência de tiamina e durante o período de recuperação.....	57
Figura 9 - A deficiência de tiamina não altera a frequência do disparo espontâneo das células de Purkinje.....	59
Figura 10 - A deficiência de tiamina diminui a reobase das células de Purkinje.....	61
Figura 11 - A deficiência de tiamina não varia a resistência de entrada nas células de Purkinje.....	63
Figura 12 - A deficiência de tiamina causa alterações na relação entre a frequência dos potenciais de ação e a quantidade de corrente injetada.....	65

Figura 13 - Relação entre a frequência dos potenciais de ação e o incremento da corrente.....	66
Figura 14 - O número das células de Purkinje não diminui nos animais deficientes.....	68
Figura 15 - A deficiência de tiamina diminui o diâmetro das células de Purkinje.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da ração produzida no laboratório.....	38
Tabela 2 - Composição da mistura de sais.....	39
Tabela 3 - Composição da mistura de vitaminas.....	40
Tabela 4 - Compostos e concentrações da solução de Acfs.....	46
Tabela 5 - Solução de Pipeta.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSF	<i>Artificial Cerebrospinal Fluid</i>
B1	Tiamina
NO	Oxido nitrico
TMP	Tiamina monofosfato
TDP	Tiamina difosfato
TTP	Tiamina trifosfato
α-KGDH	α cetrogrutarato-deshidrogenase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Tiamina.....	19
1.2 Deficiência de tiamina	22
1.3 Cerebelo.....	23
1.4 Células de Purkinje	28
1.5 Parâmetros eletrofisiológicos a serem avaliados	31
1.5.1 Reobase	31
1.5.2 Resistencia de entrada.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Fármacos, reagentes e soluções	36
4.3 Deficiência de tiamina	36
4.4 Eletrofisiologia	43
4.4.1 Preparação das fatias.....	43
4.4.2 Equipamento	47
4.4.3 Pipetas	47
4.4.4 Sistema de perfusão e câmara de registro	49
4.4.5 Identificação da célula de Purkinje	49
4.5 Registro Eletrofisiológico	51
4.6 Histologia.....	52
4.7 Plano de análises de Resultados	53
4.8 Análises Estatísticas	54
5. RESULTADOS.....	56
5.1 Caracterização do modelo de deficiência de tiamina em camundongos C57/Black adultos.....	56

5.2 Parâmetros eletrofisiológicos	58
5.2.1 A deficiência de tiamina não altera a frequência do disparo espontâneo das células de Purkinje	58
5.2.2 A deficiência de tiamina altera a reobase das células de Purkinje	60
5.2.3 A deficiência de tiamina não altera os valores da resistência de entrada	62
5.2.4 A relação entre a frequência dos potenciais de ação e a quantidade de corrente injetada foi alterada pela deficiência de tiamina	64
5.3 Parâmetros morfológicos	67
5.3.1 A deficiência de tiamina não afetou o número de células de Purkinje.....	67
5.3.2 A deficiência de tiamina alterou o tamanho das células de Purkinje	69
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÃO	78
8. AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO	79
9. REFERENCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho descrevemos os efeitos da deficiência de tiamina utilizando um modelo experimental baseado na modificação da dieta e aplicação de pirritiamina, uma droga que bloqueia a conversão de tiamina em tiamina difosfato, a sua forma ativa. Este estudo foi feito em camundongos adultos com o fim de estudar as alterações causadas pela deficiência de tiamina em parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos das células de Purkinje da vermis cerebelar. A introdução apresentará um breve resumo do papel da tiamina e seus derivados no organismo, em especial no cérebro, os efeitos da sua deficiência e os modelos que têm sido usados para estudar a deficiência de tiamina em animais. Em seguida, será feita a descrição da morfologia do cerebelo, e das células de Purkinje. Por último serão apresentadas informações sobre as propriedades passivas e ativas da membrana que serão avaliadas em células de Purkinje de animais deficientes em tiamina.

1.1 Tiamina

A tiamina, conhecida também como Vitamina B1, é uma vitamina essencial e, portanto, deve ser adquirida pela dieta. Em animais, a captação de tiamina no corpo ocorre nas paredes intestinais, onde é absorvido na sua forma catiônica, denominado T^+ , e transferido para o sangue por meio de eritrócitos, plasma, leucócitos e plaquetas (CASIROLA et al., 1990). Esse transporte é feito por transportadores de cátions orgânicos (OCTs), o sistema de transporte de fosfato alcalino (ALP), pirofosfacinases e proteínas transportadoras de soluto (RINDI; LAFORENZA, 2000). A tiamina atravessa a barreira hematoencefálica por meio de um processo saturável mediado por transportadores ou por difusão passiva (GREENWOOD; LOVE; PRATT, 1982).

A tiamina na sua forma catiônica (T^+) é fosforilada extracelularmente para a tiamina monofosfato (TMP), e transportada ao citosol (GANGOLF et al., 2010). A TMP é uma forma neutra da tiamina que funciona como um depósito de tiamina para a formação das outras formas fosforiladas TDP e TTP (Figura 1). Dentro da célula, a TMP sofre

adição de grupos fosfato e se converte em tiamina difosfato (TDP), que funciona como um cofator de enzimas que participam do metabolismo de carboidratos como a piruvato desidrogenase, α cetogruarato-desidrogenase (α -KGDH) e transetolase. A TDP pode ser convertida em tiamina trifosfato (TTP), cuja função te tem sido relacionada com a condução elétrica de sinais, a ativação de canais para Cl^- e a excitabilidade da membrana (BETTENDORFF; KOLB; SCHOFFENIELS, 1993; COOPER; PINCUS, 1979; SCHOFFENIELS; DANDRIFOSSE; BETTENDORFF, 1984).

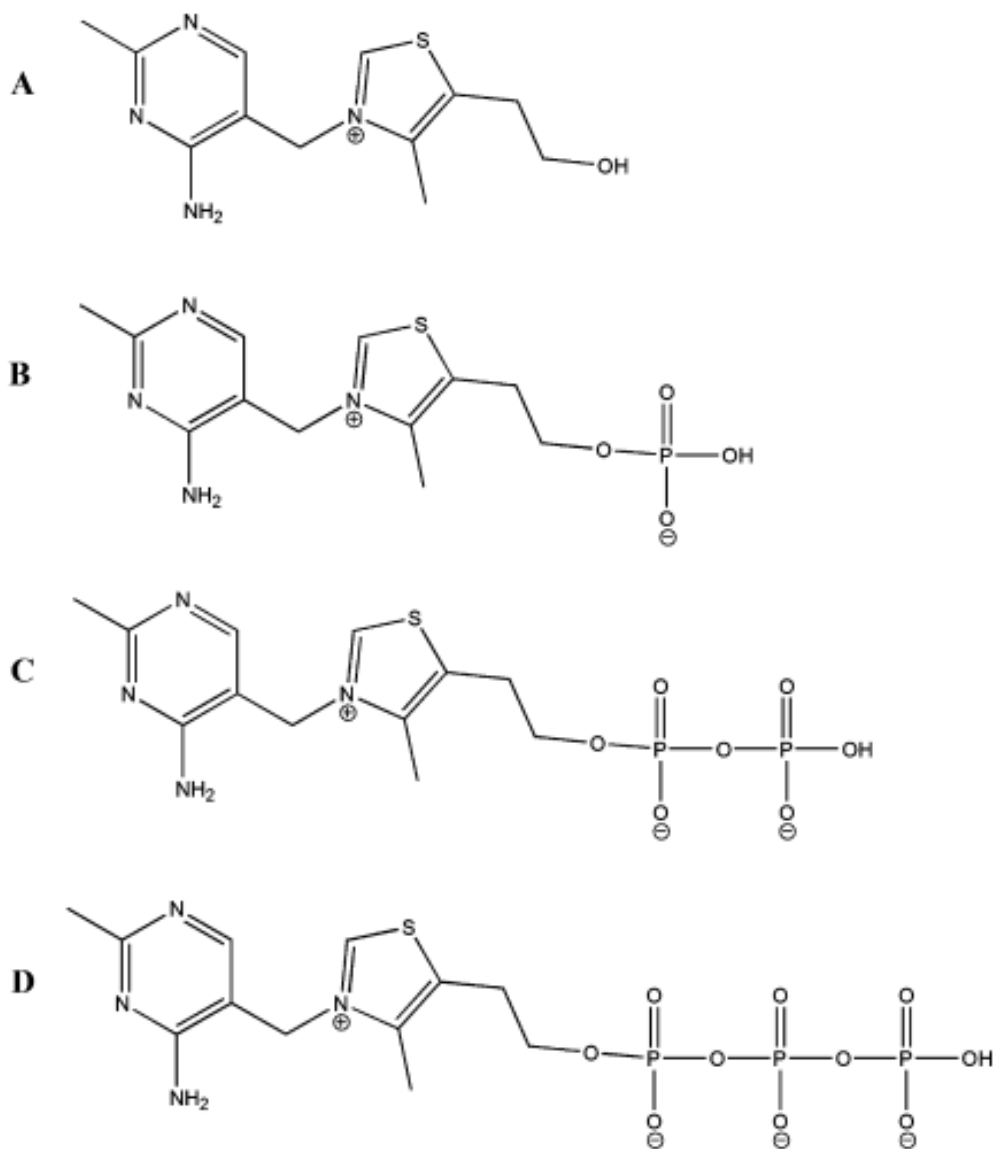


Figura 1: Estruturas das diferentes formas da tiamina. (A) Tiamina catiônica (T⁺). (B) Tiamina monofosfato. (C) Tiamina difosfato. (D) Tiamina trifosfato (adaptado de MANZETTI et al., 2014).

1.2 Deficiência de tiamina

A deficiência de tiamina é induzida pela diminuição da ingestão ou da absorção como ocorre, por exemplo, na desnutrição associada ou não ao abuso de álcool (HARPER, 2009; KOPELMAN et al., 2009). Também é comum em pacientes obesos após cirurgia bariátrica ou com nutrição parenteral e na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (ALCAIDE et al., 2003; OGUZ et al., 2011).

No sistema nervoso central dos seres humanos, a deficiência de tiamina leva ao desenvolvimento da Síndrome de Wernicke-Korsakoff, uma doença neurodegenerativa que se caracteriza por apresentar comprometimentos neuropatológicos em regiões do cérebro como o tálamo, corpos mamilares, substância cinza periaquedutal, colículos inferiores e superiores e o cerebelo, especialmente na vermis anterior. Todas estas alterações podem desencadear déficits neurológicos característicos desta doença que incluem danos oculomotores, disfunção cognitiva, perda de memória e ataxia (ANDERSEN, 2004a; FERREIRA-VIEIRA et al., 2016; ROGER, 2016).

Existem diferentes modelos da deficiência de tiamina que têm sido usados em animais como camundongos ou ratos. A maioria deles consiste na utilização de dietas sem tiamina ou a combinação da dieta com a administração de piritiamina (BOWYER et al., 2018; INABA et al., 2016; LEE, R ET AL., 1985; WATANABE, 1978), um antagonista central da tiamina que inibe a pirofosfoquinase de tiamina (enzima que contribui na síntese de TDP) no cérebro, levando a níveis reduzidos desta isoforma da tiamina (BUTTERWORTH; GIGUÈRE; BESNARD, 1986). Esses modelos têm sido amplamente utilizados pois recapitulam algumas das características clínicas e neuropatológicas da síndrome em humanos. Nos roedores a deficiência de tiamina se caracteriza pela presença de sinais clínicos neurológicos, como perda de peso, ataxia, perda do reflexo de endireitamento, opistótono e convulsões (ZHANG; HENDERSON; CORSO, 1995). Os cérebros desses roedores deficientes em tiamina mostram alterações neuropatológicas semelhantes àsquelas encontradas na síndrome de Wernicke-Korsakoff em várias regiões

do cérebro, incluindo o tálamo, corpos mamilares, colículos inferiores e núcleos vestibulares e cerebelo (BUTTERWORTH; HEROUX, 1989; INABA et al., 2016).

Outro dos achados importantes causados pela deficiência de tiamina é a diminuição na atividade de certas enzimas (por exemplo, piruvato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e transcetolase) que usam a TDP como cofator (BUTTERWORTH, 1986; BUTTERWORTH; GIGUÈRE; BESNARD, 1986). Esta deficiência enzimática pode ser mimetizada pela injeção de piritiamina que como foi mencionado anteriormente inibe a formação dessa forma ativa da tiamina. As enzimas afetadas pela falta de TDP são essenciais para o metabolismo de carboidratos e a produção de energia para a célula. A piruvato desidrogenase é necessária para converter o piruvato da glicose em acetil-CoA para entrada no ciclo de Krebs; a α -cetoglutarato desidrogenase (α -KGDH) participa da descarboxilação do α -cetoglutarato para succinil-CoA e produz NADH e a transcetolase é uma enzima chave para a via das pentoses fosfato, necessária para a síntese de neurotransmissores, ácidos nucleicos, lipídios, aminoácidos e glutatona (COLLIE et al., 2017; LEITE et al., 2017). Níveis baixos dessas enzimas estão relacionados com diminuição do estado energético em áreas vulneráveis do cérebro, devido a alterações no metabolismo de glicose, que é um fator crucial que contribui para a perda da função neuronal, incluindo a neurotransmissão glutamatérgica (BUTTERWORTH; HEROUX, 1989; TRETTER; ADAM-VIZI, 2005)

1.3 Cerebelo

O cerebelo se encontra na fossa posterior do crânio, localizado dorsalmente à ponte e ao bulbo, sobre os lobos occipitais dos hemisférios cerebrais (MACHADO, 2014). O cerebelo participa do controle do equilíbrio e da postura, controle do tônus muscular, controle da coordenação dos movimentos voluntários, e do aprendizado motor (BERNE; LEVY, 1998). O cerebelo exerce o controle dos movimentos de forma ipsilateral durante a realização do movimento. O cerebelo cumpre suas funções principais durante o movimento voluntário que consiste em comparar o movimento que está sendo realizado

com o que foi planejado e corrigi-lo na medida em que está sendo executado (CURI; PROCOPIO, 2009).

O córtex cerebelar possui uma estrutura organizada, que consiste em três camadas celulares denominadas Camada Molecular, Camada das células de Purkinje e Camada Granular. A Camada Molecular é a mais externa e contém as células estreladas e as células em cesto que atuam como interneurônios inibitórios sobre as células de Purkinje. Nesta camada também se localizam os axônios das células granulares, formando as fibras paralelas que tem ação excitatório sobre as células de Purkinje.

A Camada das células de Purkinje está localizada no intermeio das outras duas camadas. Estas células apresentam corpo celular grande e uma árvore dendrítica extensamente ramificada, que se estende na Camada Molecular, e seus axônios formam a única saída do córtex cerebelar, passando para os núcleos profundos do cerebelo e, em menor grau, para os núcleos vestibulares. Estas células têm uma ação inibitória sobre os núcleos profundos, usando o neurotransmissor GABA.

A Camada Granular é a camada mais profunda do córtex cerebelar, se localiza adjacente à substância branca e contém as células granulares que atuam por meio das fibras paralelas e as células de Golgi, que têm ação inibitória sobre estas células.

Além das camadas celulares do córtex cerebelar, no centro da substancia branca se encontram três núcleos profundos, denominados núcleo Denteado, núcleo Fastigial e Núcleo Interpósito (Emboliforme e Globoso). As células desses núcleos recebem sinapses inibitórias provenientes das células de Purkinje e sinapses excitatórias dos colaterais das fibras musgosas e trepadeiras. Portanto, a saída final do cerebelo consiste no resultado final da interação entre essas entradas excitatórias e inibitórias (BERNE; LEVY, 1998; POCOCK; RICHARDS, 2006).

Os neurônios do núcleo denteado se projetam pelo pedúnculo lateral superior, para os neurônios no tálamo contralateral e, de lá, para o córtex pre-motor e motor

primário. O núcleo interpósito projeta para o núcleo rubro e para o córtex motor. E o núcleo fastígal se projeta para os núcleos vestibulares e formação reticular (POCOCK; RICHARDS, 2006).

O cerebelo apresenta três divisões funcionais, cada uma consiste de uma porção de córtex cerebelar e um ou mais núcleos profundos do cerebelo. Estas divisões correspondem a regiões do cerebelo dominadas por aferências vestibulares (vestibulocerebelo), por aferências da medula espinhal (espinocerebelo) e por aferências indireta do prosencéfalo por meio de núcleos pontinhos (cérebro-cerebelo).

A divisão vestibulo-cerebelo corresponde ao lobo flóculo-nodular, associado ao núcleo fastigial. Esta parte do cerebelo tem conexões com os núcleos vestibulares localizados no tronco encefálico que, por sua vez, recebem aferências sensitivas das porções vestibulares da orelha interna, trazendo informações sobre a posição da cabeça e de áreas visuais do córtex cerebral. Esta divisão do cerebelo envia fibras para os núcleos vestibulares e para a formação reticular, portanto contribui com a manutenção do equilíbrio e controle dos movimento da cabeça e dos olhos (CURI; PROCOPIO, 2009).

A divisão espino-cerebelo se relaciona anatomicamente com a vermis cerebelar e região paravermica. Esta divisão recebe aferências sensoriais somáticas da medula espinhal, incluindo vários tratos espino-cerebelares. Essas vias ascendentes trazem informações proprioceptivas inconscientes, que são de grande importância para que o cerebelo possa aferir a execução de movimentos, avaliando o grau de concentração muscular e a tensão em tendões e cápsulas articulares. A região parevermiana recebe informação do córtex motor por meio do trato cortiço-espinhal, informando qual é a intensão do movimento. A vermis cerebelar manda suas eferências, através do núcleo fastigial, para os núcleos vestibulares e a formação reticular, contribuindo para o controle da musculatura axial e proximal dos membros e o tônus muscular. Outra projeção desta área do cerebelo envia informação dos núcleos interpósitos para o núcleo rubro e para o controle da musculatura distal dos membros. O espino-cerebelo tem a importante função

de comparar os movimentos que estão sendo realizados com os movimentos que foram planejados e corrigi-los no decorrer do movimento (CURI; PROCOPIO, 2009).

A vermis cerebelar está composta por 10 lóbulos, e as aferências para cada lóbulo são diferentes, trazendo informação sobre distintas partes do corpo. Por exemplo, os lóbulos III-V são encarregados de receber a informação proveniente do trato espino-cerebelar, que traz informação sobre os membros posteriores e o lóbulo X, que faz parte do vestibulo-cerebelo, que está envolvido na coordenação de uma resposta temporal precisa para uma ampla gama de movimentos da cabeça (LARSEN; HANSEN, 1972).

Por último, a divisão cérebro-cerebelo se refere anatomicamente aos hemisférios cerebelares laterais que se encontram associados ao núcleo denteado. As aferências desta divisão do cerebelo chegam de todos os lobos e, principalmente, do córtex frontal (regiões cognitivas e motoras), do córtex parietal (regiões somestésicas e associativas) e do córtex occipital (área relacionada à percepção visual de movimentos). Esta informação chega ao cerebelo por meio da via córtico-ponto-cerebelar, e por meio dessas informações, participa de forma ativa do planejamento motor, pois assim é informado da intensão do movimento (CURI; PROCOPIO, 2009).

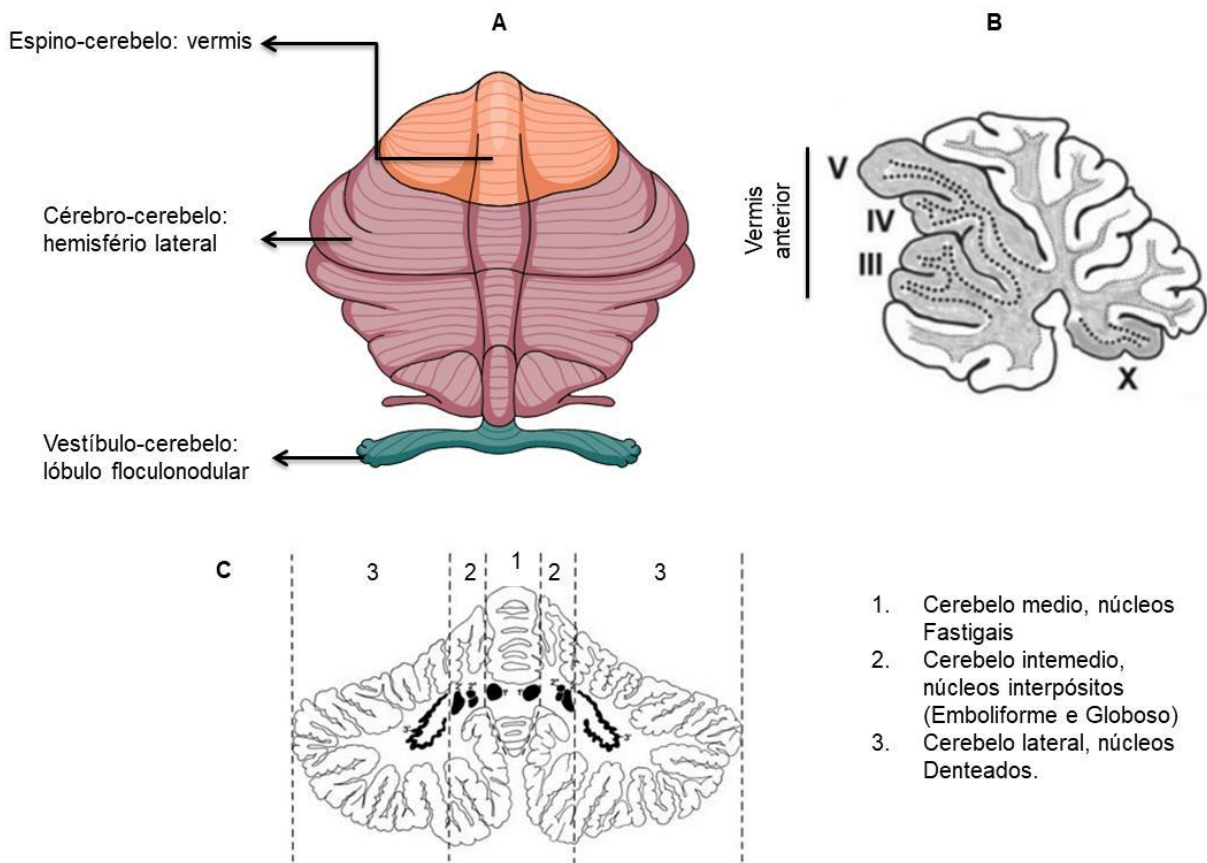


Figura 2: Representações das partes externas e internas do cerebelo. (A) Divisão funcional do cerebelo humano. **(B)** Esquema ilustrativo da vermis cerebelar de camundongo (plano sagital), mostrando os lóbulos que formam a parte anterior da vermis (adaptado de KIM et al., 2012). **(C)** Esquema ilustrativo do corte frontal do cerebelo, indicando a localização dos núcleos profundos cerebelares em humano (adaptado de NAIDICH et al., 2009).

1.4 Células de Purkinje

As células de Purkinje se destacam por serem os maiores neurônios do sistema nervoso central. Sua forma é piramidal e seus dendritos contêm uma grande quantidade de espinhos. No cerebelo existem dois tipos de fibras que influenciam a atividade das células de Purkinje: as fibras trepadeiras e as fibras musgosas. As trepadeiras fazem sinapses excitatórias com as células de Purkinje, enquanto as musgosas excitam as células granulares que, por meio dos seus axônios (as fibras paralelas), também tem uma ação excitatória sobre as células de Purkinje. Os demais tipos celulares cerebelo possuem ação inibitória. As células em cesto e estreladas inibem as células de Purkinje, as células de Golgi também tem atividade inibitória sobre as células granulares e, assim, reduzem a excitação das células de Purkinje (Figura 3) (POCOCK; RICHARDS, 2006).

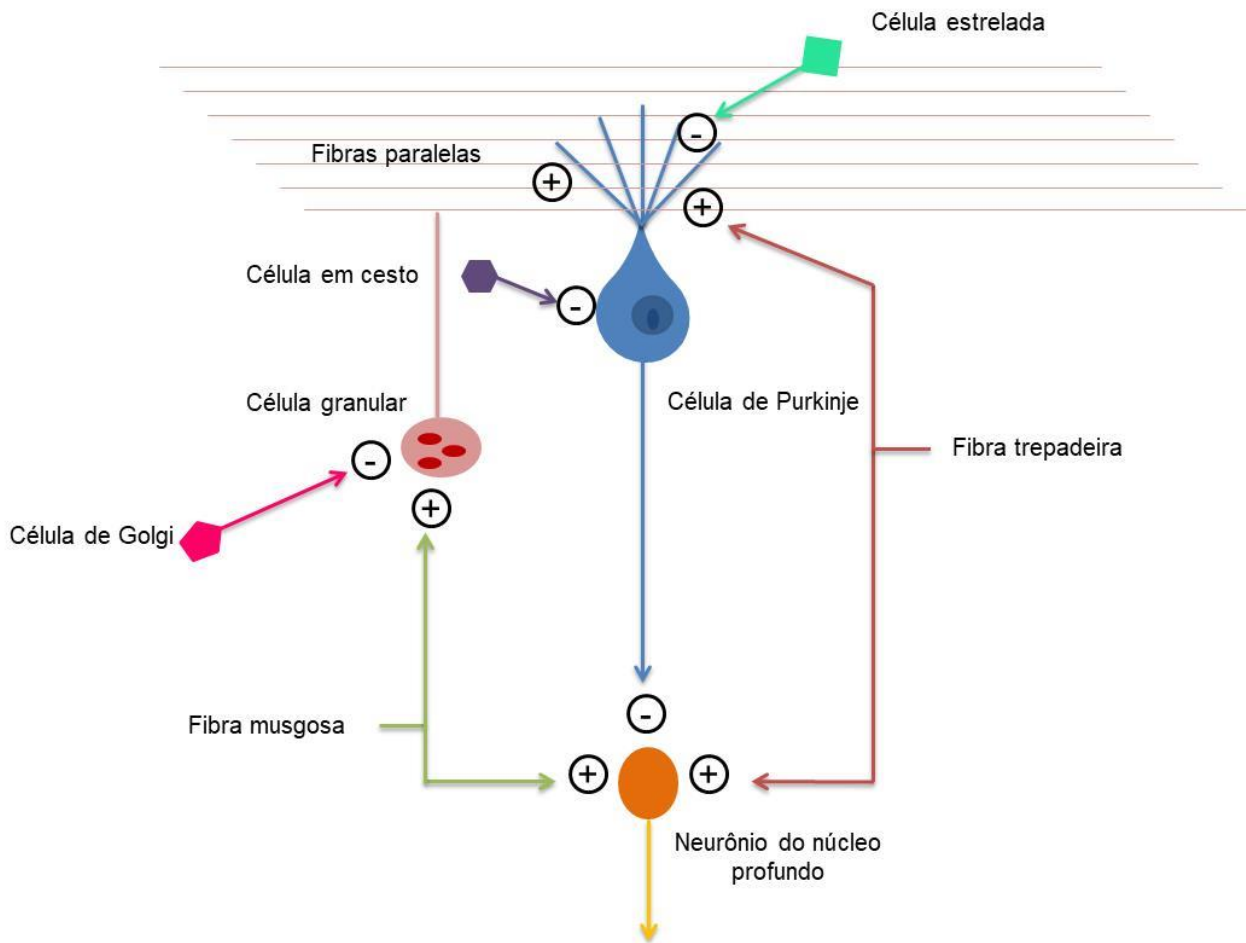


Figura 3: Esquema ilustrativo do circuito neural do cerebelo. O esquema mostra o circuito cortical que ocorre no cerebelo de forma esquemática. As informações aferentes chegam ao cerebelo por meio das fibras trepadeiras e das fibras musgosas que influenciam diretamente (trepadeiras) e indiretamente (musgosas por meio das células granulares) de forma excitatória os neurônios de Purkinje. Os outros tipos celulares do córtex cerebelar apresenta ação inibitória sobre as células de Purkinje. As projeções da células de Purkinje inibem os neurônios presentes nos núcleos profundos do cerebelo, cujas projeções se redirecionam ao córtex cerebral ou tronco encefálico.

As células de Purkinje cumprem o papel de inibir, por meio do neurotransmissor GABA, os neurônios dos núcleos profundos do cerebelo e como as células de Purkinje formam a saída do córtex cerebelar, todas as entradas excitatórias para o cerebelo se convertem em inibição, o que tem por efeito remover a influência excitatória da entrada cerebelar e assegura que os neurônios dos núcleos profundos estejam prontos para processar uma nova entrada (POCOCK; RICHARDS, 2006).

As células de Purkinje apresentam dois tipos de disparos espontâneos: o simples, que se deve a ação das fibras musgosas, e o disparo complexo, por ação das fibras trepadeiras. O disparo espontâneo destas células depende, principalmente, da corrente de Na⁺, que é sensível a tetrodotoxina (TTX). A sua capacidade de disparar em alta frequência se deve pela expressão de grandes correntes de K⁺, que desativam rapidamente durante a fase de repolarização, evitando uma forte hiperpolarização e resultado em uma alta resistência de entrada, deixando pronta a célula para uma posterior despolarização (RAMAN; BEAN, 1999).

Nas células de Purkinje a densidade de corrente de Na⁺ é importante na determinação da excitabilidade neuronal. Os disparos espontâneos iniciam perisomaticamente, portanto, uma redução na disponibilidade de canais de Na⁺ nessa região, por aplicação dos bloqueadores desses canais como a TTX, pode causar um aumento do limiar dos potenciais da ação e diminuição da frequência de disparo (KHALIQ; RAMAN, 2006). As células de Purkinje expressam duas isoformas da subunidade α do canal de sódio: canais Nav1.1, localizados no soma e dendritos apicais e canais Nav 1.6, que distribuem-se em corpos celulares, dendritos e no segmento inicial do axônio (SCHALLER; CALDWELL, 2003).

Como foi mencionado anteriormente, os canais para K⁺ também cumprem um papel importante no disparo espontâneo das células de Purkinje, pois a atividade desses canais determina a frequência dos potenciais de ação e contribui com um ajuste no potencial de membrana (HILLE, 1992).

Os potenciais de ação gerados pelas células de Purkinje localizadas no vermis cerebelar apresentam uma menor duração, maior rapidez durante a despolarização e maior amplitude, comparado com os potenciais de ação gerados por estas células nos hemisférios cerebelares. As células de Purkinje expressam três tipos de corrente de Na⁺: corrente transitória, corrente persistente e corrente resurgente. Todos esses tipos de corrente interagem para determinar propriedades críticas dos potenciais de ação. Pode-se sugerir, então, que o fato da curta duração, maior rapidez e amplitude dos potenciais produzidos pelas células de Purkinje da vermis cerebelar, comparado com os demais regiões, se devem a uma densidade de corrente transitória de Na⁺ relativamente alta (SNOW; ANDERSON; FRY, 2014).

1.5 Parâmetros eletrofisiológicos a serem avaliados.

Neste trabalho, iremos avaliar o efeito da deficiência de tiamina em diferentes parâmetros eletrofisiológicos, descritos e definidos a seguir.

1.5.1 Reobase

A reobase é um indicador de excitabilidade, definido como a quantidade mínima de corrente que é necessária para a produção de um ou mais potenciais de ação. A reobase mede a excitabilidade intrínseca do neurônio. A facilidade com que uma membrana pode ser estimulada depende de duas variáveis: a força do estímulo e a duração com que o estímulo é aplicado. Essas variáveis são inversamente relacionadas: à medida que a força da corrente aplicada aumenta, o tempo necessário para estimular a membrana diminui (e vice-versa) para manter um efeito constante (BOINAGROV; LOUDIN; PALANKER, 2010).

Na prática, para medir a reobase, se usam pulsos quadrados longos de corrente (por exemplo, duração de 1 s), com intensidades cada vez maior, até o neurônio disparar um ou mais potenciais de ação. No caso das células de Purkinje, que disparam potenciais de ação espontaneamente, a reobase descrito em nossos experimentos tem um sentido

um pouco diferente do padrão. Em nossos experimentos, sempre aplicamos uma corrente hiperpolarizante suficiente para levar o potencial de membrana para -80 mV. Neste potencial, nunca observamos potenciais de ação espontâneos. A partir dessa corrente negativa basal, foram aplicados pulsos positivos de corrente de 1 s de duração, com intensidades que aumentaram de 20 e 20 pA, até que o neurônio disparasse um ou mais vezes.

1.5.2 Resistência de entrada

A resistência de entrada é uma medida que relaciona a quantidade de corrente injetada ao aumento do potencial de membrana. Um valor alto na resistência de entrada indica que a membrana celular não permite que a corrente passe facilmente, de modo que correntes relativamente pequenas geram variações de voltagem relativamente grandes. Esta propriedade está determinada, principalmente, pela resistência específica da membrana, pela morfologia da célula, e, pela resistividade intracelular. (MCKAY; TURNER, 2005). Outros fatores sendo iguais, uma célula maior apresenta menor resistência de entrada, pois há mais área de superfície para a corrente fluir. A resistência específica da membrana depende, principalmente, da densidade de canais abertos.

2. JUSTIFICATIVA

Deficiências nutricionais podem causar dano neuronal levando ao possível desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A deficiência de tiamina (vitamina B1) está relacionada à Síndrome de Wernicke-Korsakoff, uma doença neurodegenerativa que produz alterações encefálicas afetando o funcionamento de diferentes áreas cerebrais, principalmente o tálamo, corpos mamilares, amígdala, e cerebelo (ROGER, 2016; VIGIL et al., 2010), especialmente a vermis na parte anterior, que se encarrega do controle da postura e tônus e que recebe as informações provenientes dos membros posteriores (ANDERSEN, 2004b). Alterações nas células de Purkinje presentes nessa área do cerebelo têm sido relacionadas com a ataxia, que é um dos sintomas que fazem parte da triagem para o diagnóstico desta síndrome.

Vários estudos têm sido desenvolvidos sobre os efeitos da deficiência de tiamina, relacionada ao consumo crônico de álcool, sobre o funcionamento do cerebelo e suas diferentes camadas, onde tem sido descritos os graves efeitos que produz a falta de tiamina nessa região. Diminuição da camada de células granulares e alterações no funcionamento dos canais iônicos voltagem dependentes presentes nelas em animais, redução da camada de células de Purkinje com perda do número de células e alterações morfológicas no seu volume em humanos (CRUZ et al., 2012; PHILLIPS; HARPER; KRIL, 1987).

Em modelos de deficiências de tiamina em animais que produzem sinais clínicos parecidos com pacientes, também se tem encontrado alterações cerebrais e cerebelares parecidas com as encontradas em humanos, concordando em que o cerebelo é uma das regiões mais afetadas pela deficiência de tiamina (INABA et al., 2016). Contudo, são poucos os estudos em modelos animais voltados a estudar especificamente as alterações produzidas pela deficiência de tiamina no funcionamento eletrofisiológicos desses neurônios. Portanto este estudo contribuirá com o conhecimento das alterações que ocorrem a nível celular, quando o sistema nervoso central apresenta um déficit de tiamina e pós um período recuperatório da deficiência. Como também para o

conhecimento dos distúrbios motores mais afetados nessas fases da deficiência de tiamina e em períodos posteriores.

3. OBJETIVOS

3.3 Geral

Determinar as alterações causadas pela deficiência de tiamina sobre parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos das células de Purkinje cerebelares em camundongos adultos.

3.4 Específicos

1. Usar um modelo de deficiência de tiamina em camundongos adultos através da modificação da dieta e a administração da pirritiamina, um inibidor da enzima que forma tiamina-difosfato.

2. Avaliar as propriedades elétricas das células de Purkinje cerebelares caracterizando sua atividade espontânea, reobase, resistência de entrada e a relação de frequência versus corrente, através da técnica do *Patch Clamp*, na modalidade *Whole-cell Current Clamp*, em fatias de cerebelo obtidas de camundongos adultos, na fase em que apresentam os sinais clínicos da deficiência e pós período de recuperação com tiamina.

3. Quantificar os parâmetros morfológicos das células de Purkinje da vermis cerebelar: número de células, diâmetro maior, diâmetro menor e diâmetro do núcleo, em camundongos adultos no momento que apresentam os sinais clínicos da deficiência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos, adultos (8 – 9 semanas de idade), com massa corporal de 20-25 g, da linhagem C57/BLACK, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os camundongos foram mantidos no Biotério Experimental do Departamento de Fisiologia e Biofísica no Instituto de Ciências Biológicas, acondicionados em caixas plásticas, com um número máximo de 4 animais por caixa, sobre ciclo de doze horas claro/escuro. Os animais tiveram livre acesso a água e ração *ad libitum* até o início do protocolo de deficiência e durante a fase de recuperação do tratamento. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) com número de protocolo 71/2018.

4.2 Fármacos, reagentes e soluções

Todos os fármacos usados foram de pureza analítica e obtidos das companhias Sigma-ALDRICH (St. Louis, MO, EUA), Merck KGaA, 64271 Darmstadt. e VETEC QUIMICA FINA LTDA.

4.3 Deficiência de tiamina

Os animais foram submetidos a um período de adaptação (água e ração comercial *ad libitum*) ao experimentador, por uma semana antes de começar o tratamento com deficiência de tiamina. Passado esse tempo, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: 1) Controle (CTRL) 2) Deficiente (DEF). Todos os grupos foram alimentados com ração deficiente em tiamina (Tabelas 1-3), durante 13 dias de

tratamento. A alimentação do grupo controle foi restrita para garantir que eles consumam a mesma quantidade de ração (controle pareado) do grupo deficiente.

Tabela 1

Composição da ração produzida no laboratório

Nutriente	g/Kg
Amido de milho	507
Polvilho	169
Caseína*	200
Óleo de soja	50
Mistura de sais ^a	50
Mistura de vitaminas ^b	10
Celulose	10
Colina-HCl	4,0
Tocoferol-vitamina E	0,4
BHT (conservante)	0,1

* A caseína da ração restrita em tiamina foi autoclavada, secada e triturada antes do uso para garantir a ausência de Vitamina B1 na mesma.

^a Ver tabela 2.

^b Ver tabela 3.

Tabela 2

Composição da mistura de sais

Sais minerais	%
NaCl	13,93
KI	0,08
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,73
CaCO ₃	38,14
MnSO ₄ .H ₂ O	0,40
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,70
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02
KH ₂ PO ₄	38,90

Tabela 3

Composição da mistura de vitaminas

Vitaminas	%
Acetato de Retinol	0,40
Colecalciferol	0,06
Menadiona	0,05
i-Inositol	1,00
Niacina	0,40
Pantotenato de Cálcio	0,40
Rivoflavina	0,08
Piridoxina-HCl	0,05
Ácido Fólico	0,02
Biotina	0,004
Vitamina B ₁₂	0,0003
Sacarose	97,49

O tratamento consistia em injeções diárias, via intraperitoneal (i.p), de Piriamina 0,25 mg/kg (um inibidor da enzima responsável pela produção da tiamina difosfato) nos animais do grupo deficiente. O Grupo controle recebeu injeções de tiamina (0,4 mg/kg) (BOWYER et al., 2018; HAMADA et al., 2013; ZHANG; HENDERSON; CORSO, 1995).

Experimentos prévios mostraram que, após 12 ou 13 dias de tratamento, os animais do grupo deficiente apresentavam sinais clínicos da deficiência de tiamina: encurvamento e distensão dos membros inferiores, (ZHANG; HENDERSON; CORSO, 1995). Baseado nisso, no 12º e 13º dias de tratamento, um animal deficiente foi submetido aos estudos eletrofisiológicos. Os experimentos com animais controles foram realizados nos 11º e 14º dias. Cada vez que um animal foi usado para experimentação, outro animal do mesmo grupo recebeu uma única injeção de tiamina (1 mg / kg), ou água mili-q (animais controle) (INABA et al., 2016) para dar início ao período de recuperação. Os animais dos grupos controle recuperados (C-REC) e deficiente recuperados (D-REC) foram mantidos por 7 dias com acesso ad libitum a ração comercial, e em seguida submetidos aos testes eletrofisiológicos (Figura 4).

O tratamento dos animais utilizados para a histologia foi idêntico ao descrito acima para eletrofisiologia.

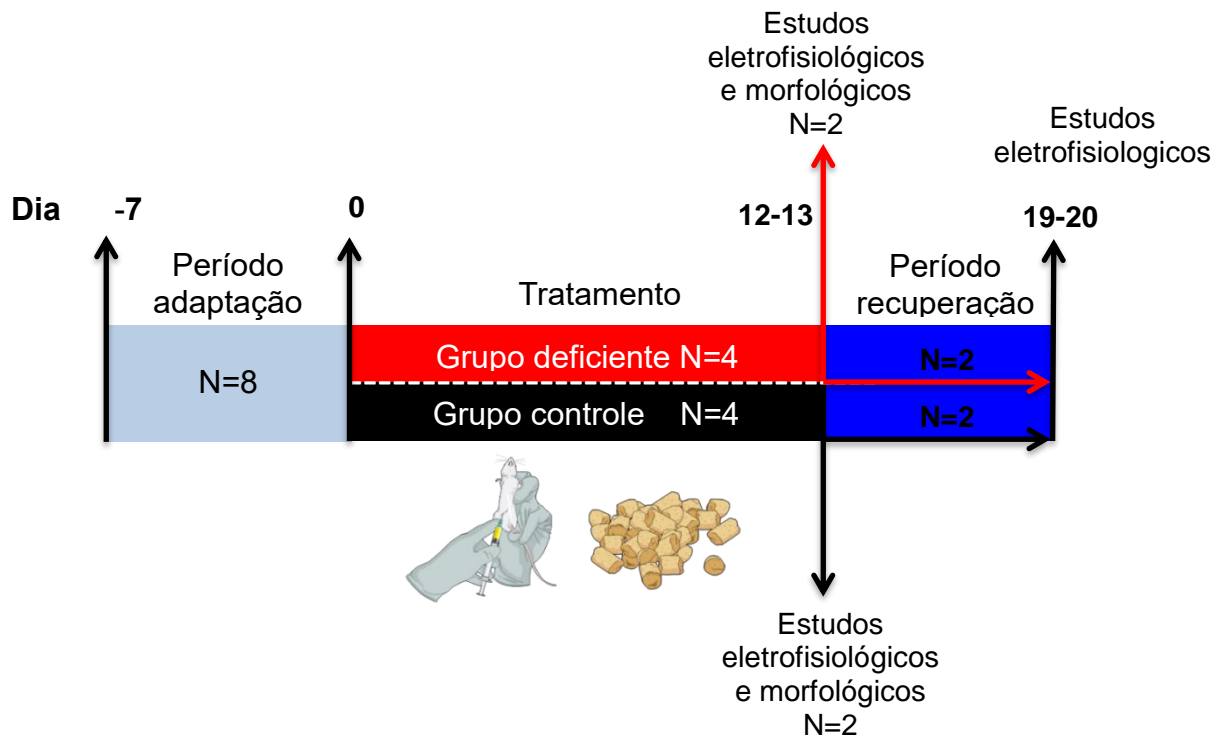


Figura 4: Representação esquemática do delineamento experimental. A partir do período de adaptação ao experimentador. A parte superior da barra representa as etapas do tratamento, as setas indicam a escala do tempo (dias) e os estudos realizados aos animais.

4.4 Eletrofisiologia

4.4.1 Preparação das fatias

Para realizar o corte e registro das fatias, foram utilizados dois tipos de solução de ACSF (do inglês Artificial Cerebrospinal Fluid) identificados com os nomes “ACSF-corte” e “ACSF-registro” (ver Tabela 4). Ambos os tipos de ACSF foram borbulhados com mistura gasosa de “carbogênio” contendo 5% CO₂ / 95% O₂. As soluções eram previamente saturadas com este gás pelo período de, no mínimo, cinco minutos antes de serem utilizadas nos experimentos. Nessas condições, ambas as soluções apresentaram pH de 7.3 – 7.4.

Os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano (89 ng/cm³), e sacrificados por decapitação. O crânio foi aberto usando uma tesoura ao longo da comissura entre os ossos temporais e parietais no sentido caudal – rostral. A porção do encéfalo contendo o cerebelo foi removida e colocada em solução de aCSF-corte na temperatura de 4° C. Nesse momento, parte do encéfalo e do lobo cerebelar esquerdo foi removida com uma lâmina de aço (Figura 5A₁), depois foi feito um corte horizontal para remover outra parte do cérebro, formando uma base estável para colar (Figura 5A₂). A peça foi, então, fixada no prato circular de aço inox do micrótomo de lâmina vibratória (“vibrátomo”, modelo *Leica VT1000S*), com cola a base de éster de cianoacrilato. A câmara estava rodeada por gelo. Durante a cirurgia e após a fixação na plataforma, o tecido permaneceu banhado em solução aCSF-corte em temperaturas próximas de 4 °C. O sentido do corte da lâmina no tecido foi de rostral para caudal (Figura 5B).

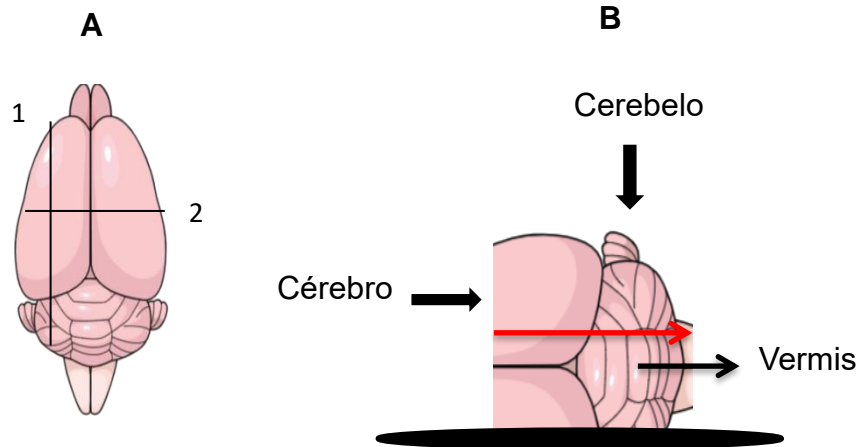


Figura 5: Montagem do cerebelo para cortes no micrótomo de lâmina vibratório. (A) Indicação das partes removidas do encéfalo (1,2). **(B)** forma da montagem do cerebelo para o fatiamento. A seta vermelha indica o sentido do corte da lâmina.

Foram cortadas seis (6) fatias sagitais da vermis cerebelar, com 200 μm de espessura, as fatias em seguida foram incubadas em solução aCSF-registro a 37°C por 45 minutos, visando à recuperação do trauma mecânico sofrido pelo tecido durante o fatiamento, e, em seguida a temperatura ambiente por até 6 horas antes de uso. Para registro eletrofisiológico, uma fatia foi transferida, com auxílio de uma pipeta Pasteur adaptada, e colocada na câmara do setup para fazer o registro das células de Purkinje cerebelares.

Devido à logística dos experimentos eletrofisiológicos, foi possível registrar apenas um animal por dia (Figura 6). De cada animal, registramos, em média três fatias, e, em cada fatia, em média, duas células. Nos resultados apresentados abaixo, o tamanho de amostra, N, representa o número de células.

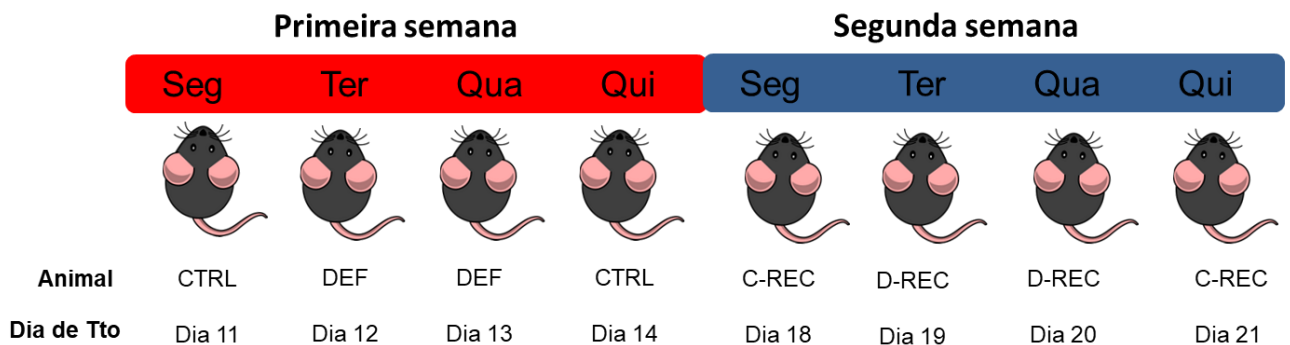


Figura 6: Esquema do cronograma dos experimentos eletrofisiológicos. Cada experimento foi feito durante duas semanas consecutivas, os registros foram feitos nos quatro primeiros dias de cada semana e em cada dia se registrou um único animal. Dois animais deficientes e dois controles eram registrados na primeira semana e os deficientes e controles recuperados na segunda semana. O experimento foi realizado quatro vezes, em cada repetição foram usados quatro animais por grupo.

Tabela 4**Compostos e concentrações da solução de aCSF**

aCSF (Líquido cérebro-espinhal artificial)		
Reagente	Concentração (mM)	
	aCSF-corte	aCSF-registro
NaCl	125	125
KCl	2,5	2,5
NaHCO ₃	25	25
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25
CaCl₂	0,1	2
MgCl₂	3	1
Glicose	25	25
myo-inositol	3	3
Ácido ascórbico	0,4	0,4
Piruvato de sodio	2	2
pH = 7,4 quando saturado com mistura gasosa 95% O ₂ / 5% CO ₂		

4.4.2 Equipamento

Os registros foram obtidos das células de Purkinje utilizando a técnica de *patch clamp* nas configurações *whole-cell current clamp* por meio de um amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Califórnia, USA). Os sinais foram filtrados (passa baixo, 5 kHz) antes de serem digitalizados a cada 24 μ s pelo conversor analógico-digital Digidata 1322A (Axon Instruments, Califórnia, USA), gerenciado pelo software WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, gentilmente fornecido pelo John Dempster, University of Strathclyde). Uma das saídas do amplificador foi dirigida ao osciloscópio Tektronix TDS340 (Tektronix Inc, Oregon, USA) para visualização do sinal original.

Durante o experimento, a fatia e as células foram visualizadas usando objetivas de 4x ou 40x da Olympus, esta última de imersão, e iluminação de contraste diferencial (DIC) infravermelho no microscópio Modular MRK100 (Siskiyou, Oregon, USA). As imagens foram captadas por meio de uma câmera acoplada IR-1000 (DAGE-MTI, Indiana, USA) e visualizadas no PC, usando o software ENLTV-FM3 (Encore Electronics, USA).

4.4.3 Pipetas

As pipetas foram fabricadas a partir de capilares de vidro (Patch Clamp Glass, PG52151-4, World Precision Instruments) usando um estirador vertical de pipetas de dois estágios (PP830 Narishige, Tokyo, Japan). A superfície externa da ponta das pipetas foi coberta com cera dental até aproximadamente 0,1 cm a fim de reduzir a sua capacitância elétrica. Prévio aos experimentos, as pipetas eram preenchidas com solução interna (ver Tabela 5). A resistência da pipeta variou entre 2.0 e 3.0 M Ω .

Tabela 5**Solução de Pipeta**

Solução interna da Pipeta	
Reagente	Concentração (mM)
Gluconato de Potássio	125
KCl	20
Na ₂ -Fosfocreatina	10
EGTA	0,5
HEPES	10
Mg ₂ ATP	4
Na ₂ GTP	0,3
pH = 7,2 (ajustado com KOH)	

4.4.4 Sistema de perfusão e câmara de registro

A fatia foi mantida presa no fundo da câmara de registro com uma “harpa” garantindo a estabilidade mecânica do tecido durante o registro. Uma bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump P-1) foi utilizada para perfundir as fatias continuamente com aCSF a 2.1 ml/min. A temperatura foi mantida em 33 ± 1 °C, com um aquecedor (Warner Instruments modelo TC-324C).

4.4.5 Identificação das células de Purkinje

A região anterior da vermis é a mais afetada pela deficiência de tiamina (BAKER et al., 1999), por este motivo, os registros foram feitos em células de Purkinje localizadas nos lóbulos III, IV e V da vermis (Figura 7A). A identificação dos lóbulos foi feita na vista panorâmica da fatia com a objetiva de 4x.

Passamos para a objetiva de 40x que permitiu distinguir as camadas do córtex cerebelar, da superfície para o interior, sendo: i. Molecular externa, ii. Células de Purkinje, iii. Granular interna (Figura 7B). As células de Purkinje foram identificadas pela morfologia, piriforme e grande tamanho na borda entre as camadas moleculares e granulares (MACHADO, 2014). Neste momento, foi selecionada uma célula de interesse, baseado na morfologia característica das células de Purkinje (Figura 7C).

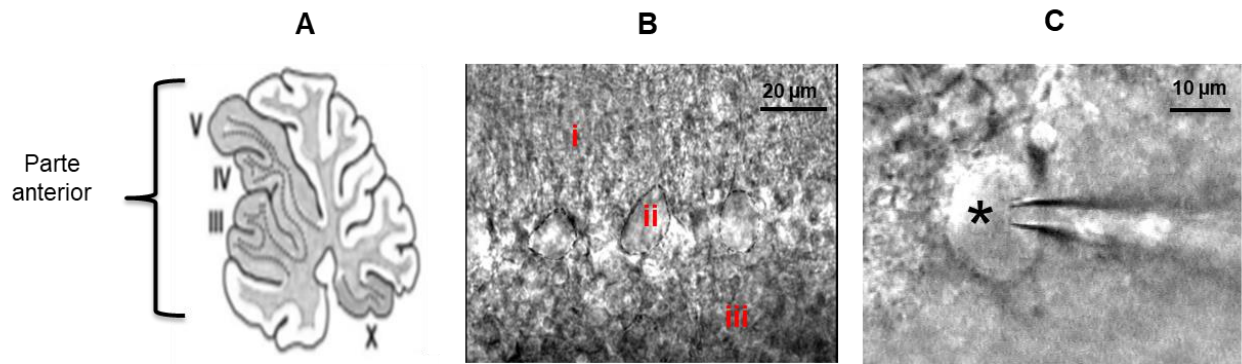


Figura 7: Identificação das células de Purkinje. (A) Ilustração esquemática da vermis cerebelar em um plano sagital, mostrando a parte anterior e os lóbulos III, IV e V (tomado e adaptado de KIM et al., 2012). (B) Fatia do cerebelo, corte sagital evidenciando as camadas celulares: i camada molecular, ii camada das células de purkinje, iii camada granular. (C) Célula de Purkinje (*) sendo registrada com a pipeta de patch clamp. As imagens B e C observadas com o aumento de 40x.

4.5 Registro eletrofisiológico

Após identificar uma célula de Purkinje, a pipeta de registro foi colocada acima dela sem encostar. Nesse momento, o potencial da pipeta foi ajustado para -9 mV, (esse valor foi calculado com a ferramenta *Calculate Junction Potential*, disponível no software Clampex), para compensar o potencial de junção da pipeta. Em seguida, a pipeta era abaixada o suficiente para que a ponta fizesse contato com a membrana da célula, nesse momento, a pressão da pipeta era alterada de positiva para negativa, e o potencial da pipeta alterado para -60 mV, resultando na formação de um “selo” de alta resistência (maior que 1 G Ω) entre a ponta da pipeta e a membrana. Durante esta parte, uma onda quadrada com frequência de 60 Hz e amplitude de 5 mV foi aplicada sobreposta o valor de -60 mV mencionado acima, o que permitiu monitorar a resistência do selo. Neste momento, os transientes capacitivos da pipeta foram compensados.

Para entrar na configuração *whole-cell*, a pressão negativa foi aumentada lentamente até observar o aparecimento dos transientes capacitivos da membrana. Em seguida, a pressão negativa foi interrompida e a célula foi mantida em -60 mV sob *voltage clamp* durante 5 minutos, e em seguida passamos a modo *current clamp*.

Na modalidade *current clamp*, foram avaliados os seguintes parâmetros: Frequência da atividade espontânea, reobase, resistência de entrada e a relação da frequência dos potenciais de ação vs. a amplitude de corrente injetada. Para avaliar as três últimas condições foram desenhados protocolos específicos de injeção de corrente, os quais serão descritos nos resultados. Para manter todas as células no mesmo valor de potencial de membrana, foi realizada uma injeção constante de corrente negativa para assegurar a voltagem em -80 mV. Consideramos apenas os registros das células cujo potencial de membrana inicial (antes de aplicar a corrente mencionada acima) fosse mais negativo que -50 mV, e nos quais a corrente necessária para manter o potencial de membrana em -80 mV fosse menor que -900 pA.

4.6 Histologia

Para os estudos histológicos, os animais foram sacrificados no 12º ou 13º dia de tratamento pela administração intraperitoneal de Tiopental sódico em concentração letal (5 mg/animal). Os animais foram perfundidos via transcardíaca com solução de Ringer e depois com glutaraldeído 0.1N 2.5% e, em seguida, o cerebelo foi extraído e imerso na solução fixadora (glutaraldeído).

Fragmentos da vermis cerebelar foram submersos em PBS contendo 1 % agarose. Em seguida, passaram para um processo de desidratação em álcoois, em concentrações ascendentes [entre 70 – 100%], seguido por inclusão em resina de metacrilato (MORAIS-SANTOS et al., 2015). Secções sagitais da vermis, de 3 µm, foram obtidas utilizando um micrótomo e submetidas à coloração padrão Azul de Toluidina.

Por cada animal, foram preparadas três lâminas, cada lâmina continha cinco cortes. Em cada corte, foi obtida uma imagem panorâmica com objetiva de 4x, onde foram identificados os lóbulos da vermis. Em seguida, foram adquiridas vinte imagens por lâmina distribuídas de forma aleatória entre as regiões retas da camada utilizando objetiva de 40x. No total, foram obtidas 60 imagens por animal. Os parâmetros analisados das células de Purkinje foram: o número de células, o diâmetro maior e menor da célula e o diâmetro do núcleo.

Para ser incluído na contagem de células, foram contempladas apenas aquelas células que estivessem dentro da linha reta da camada, com a membrana celular completa e bem definida. Para ser incluído na medição de diâmetros, além dos critérios descritos acima, foram utilizadas apenas as células cujos núcleo e nucléolo eram visíveis na imagem.

4.7 Plano de análises de resultados

A frequência dos potenciais de ação espontâneos foi avaliada em trechos de 10 s com a célula mantida em seu potencial de repouso (não houve injeção de corrente). Para esse análise, os potenciais de ação foram identificados por meio do detector de eventos “*event detection*” do programa Clampfit (versão 10.7), através do critério de limiar. Alterações estereotípicas no potencial de membrana que alcançavam o valor de 0 mV eram identificadas como sendo um potencial de ação. Uma vez identificados os potenciais de ação, o programa fornecia uma lista do intervalo interevento com o qual foi calculada a frequência dos potenciais por segundo (Hz).

A reobase, a resistência de entrada e a relação entre a frequência de potenciais e a intensidade de corrente injetada (“F vs. I”), foram analisados com ajuda do programa Igor Pro versão 7.0. Para determinar a reobase, o programa fornecia o número dos potenciais de ação gerados em cada pulso de injeção de corrente. A reobase de cada célula foi identificada como a quantidade mínima de corrente necessária para gerar um ou mais potenciais de ação.

Através da lei de Ohm, foi determina a resistência de entrada (R_i) de cada célula usando a equação,

$$R_i = \frac{\Delta V}{\Delta I}, \quad (Eq\ 1)$$

Onde ΔV representa a variação de voltagem produzida pela aplicação de um pulso de corrente ($\Delta I = -1\ nA$). Para reduzir o ruído elétrico presente nos registros, utilizamos a promediação de 10 traços para medir a resistência de entrada.

Para avaliar a relação entre a frequência dos potenciais de ação e a injeção de corrente, foi considerado o valor da inclinação da reta (Hz/pA) ajustada aos 6 primeiros pontos da curva F vs. I, a partir da reobase. Só foram usados os 6 primeiros pontos devido ao fato de que, nos demais registros as células apresentarem uma depressão dos

potencias de ação, portanto foram eleitos os steps onde os potenciais se mostraram uniformes.

O número de células de Purkinje foi quantificado em cada foto usando o sistema de imagem Zeiss AxioCam®. Para obter os valores dos diâmetros, as medidas foram realizadas com auxílio do programa FIJI ImageJ, calibrado com um micrometro com resolução de 100 μm . O corpo da célula de Purkinje é piriforme e, por esse motivo, a medição do diâmetro maior foi feita visando a forma do corpo da célula de Purkinje e a sua projeção para a camada granular, desenhando uma reta que atravessa a soma nesse sentido. Para o diâmetro menor, uma reta perpendicular ao diâmetro maior foi desenhada. O cursor foi colocado de esquerda para a direita e para medir o diâmetro do núcleo da mesma forma. Tanto os valores do número de células como os diâmetros foram expressos em unidades de μm , como o valor médio \pm erro padrão da media (SEM).

4.8 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de D'Agostino. Em seguida os dados que seguiram uma distribuição normal foram analisados utilizando testes paramétricos ou, no caso de não seguir distribuição normal, foram aplicados os testes equivalentes não paramétricos.

O analise do peso corporal dos animais ao longo do tratamento foi feito por meio do teste *Two-way* Anova com pós-teste de Tukey. Para a comparação entre os grupos para os parâmetros de frequência do disparo espontâneo, reobase, resistência de entrada e relação entre a frequência versus corrente, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns. Para os dados do número de células foi aplicado o teste *t* e para os diâmetros foi usado o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas no nível de 5% ($p < 0,05$).

Os gráficos foram feitos com os programas Graph Pad PRISM versão 5.0. e Igor Pro 7.0. Os dados mostrados nos resultados foram expressos como N=número de células. Todos os resultados foram apresentados como o valor médio \pm erro padrão da media (SEM), para cada grupo.

Para alcançar o poder estatístico desejado ($\beta=0.8$), foram feitas quatro repetições do experimento eletrofisiológico, utilizando um total de 28 animais. Em cada experimento foram usados oito animais (quatro controles e quatro deficientes) exceto do último experimento que contou com apenas quatro animais (um por grupo). Para os estudos histológicos um único experimento foi realizado usando três animais para cada grupo.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo de deficiência de tiamina em camundongos C57/BLACK adultos

Quando é combinada uma dieta sem tiamina com injeções sistêmicas de pirritiamina, o progresso das sequelas neurológicas da deficiência de tiamina é acelerado sendo que, num período de 10 a 18 dias, os roedores exibem uma progressão estereotipada dos sinais neurológicos relacionados com o déficit de tiamina. (INABA et al., 2016; ZHANG; HENDERSON; CORSO, 1995).

A curva de peso corporal mostra a variação do peso dos animais ao longo do tratamento. No início do tratamento, os animais dos grupos deficientes e controles apresentavam o mesmo peso (20 ± 3 g), contudo, ao longo dos dias de tratamento, ambos os grupos tiveram redução de peso. Nos dias 10, 11, 12, os animais deficientes diminuíram o consumo de alimento e a atividade motora. Os controles, com consumo de ração pareado, também perderam peso, mas conservaram a atividade motora. Nos dias 12 e 13, os deficientes e controles tiveram a maior perda de peso (Figura 8, seta azul tracejada), (DEF 18.1 ± 0.3 g; 17.9 ± 0.6 g CTRL), mas somente os animais do grupo deficiente manifestaram os sinais clínicos da deficiência de tiamina: encurvamento e distensão dos membros inferiores (ZHANG; HENDERSON; CORSO, 1995). Portanto, demonstra-se que as alterações causadas pela deficiência de tiamina são provocadas pela ausência da mesma e não pela perda de peso. Os animais dos dois grupos começam a recuperar o peso no terceiro e quarto dia do período de recuperação e passados os sete dias desse período conseguem superar o peso inicial (Figura 8, seta azul pontilhada). Ao comparar estatisticamente os pesos dos animais não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0.19$).

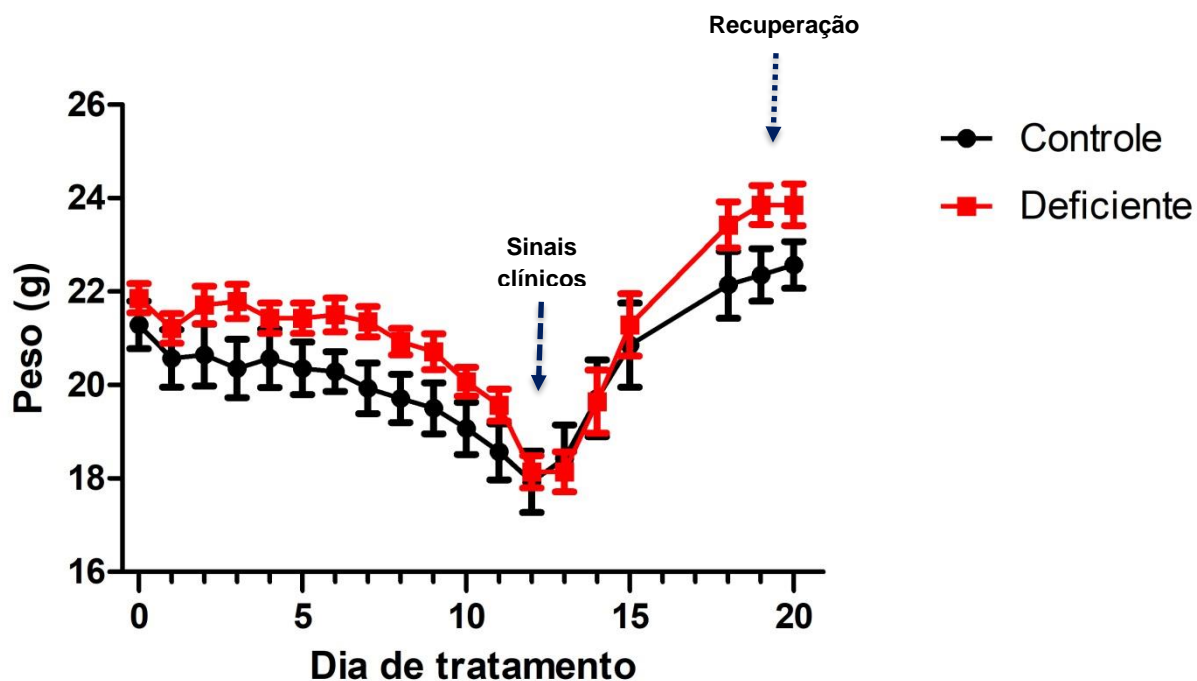


Figura 8: Variação do peso dos animais durante o tratamento de deficiência de tiamina e durante o período de recuperação. A seta azul tracejada indica os dias onde os animais tanto de grupo controle como deficiente apresentaram a maior perda de peso no tratamento e também o começo da aparição dos sinais clínicos da deficiência nos animais. A seta azul pontilhada indica o final do período de recuperação dos animais, no qual os animais recuperam ou ultrapassaram o peso inicial. N=14 por grupo teste Two-way Anova com pós-teste de Tukey.

5.2 Parâmetros eletrofisiológicos

5.2.1 A deficiência de tiamina não altera a frequência do disparo espontâneo das células de Purkinje.

Como mencionado na Introdução, as células de Purkinje se caracterizam por apresentar atividade espontânea que é formada pela informação que recebem das células corticais, vestibulares e sensoriais e retransmitida por mais de 150.000 entradas sinápticas excitatórias e inibitórias (WOMACK et al., 2006). Esta atividade é mantida *in vitro* em fatias de cerebelo.

A primeira hipótese testada neste trabalho foi que a deficiência de tiamina altera o disparo espontâneo dos potenciais de ação das células de Purkinje. Para testar essa hipótese foram feitos registros da atividade espontânea na modalidade *Whole-cell, current clamp*. Foi visto que as células conservam um potencial de membrana entre -56 e -60 mV (Figura 9A), e que não há diferença significativa na frequência do disparo espontâneo entre os grupos (CRTL 113 ± 12.9 Hz, N=10; DEF 130 ± 12.4 Hz, N=11; C-REC 119 ± 10.2 Hz, N=12; D-REC 112 ± 12.6 Hz, N=15, $p=0.51$) (Figura 9B). Portanto, não detectamos nenhum efeito estatisticamente significativo da deficiência de tiamina na frequência de disparo das células de Purkinje.

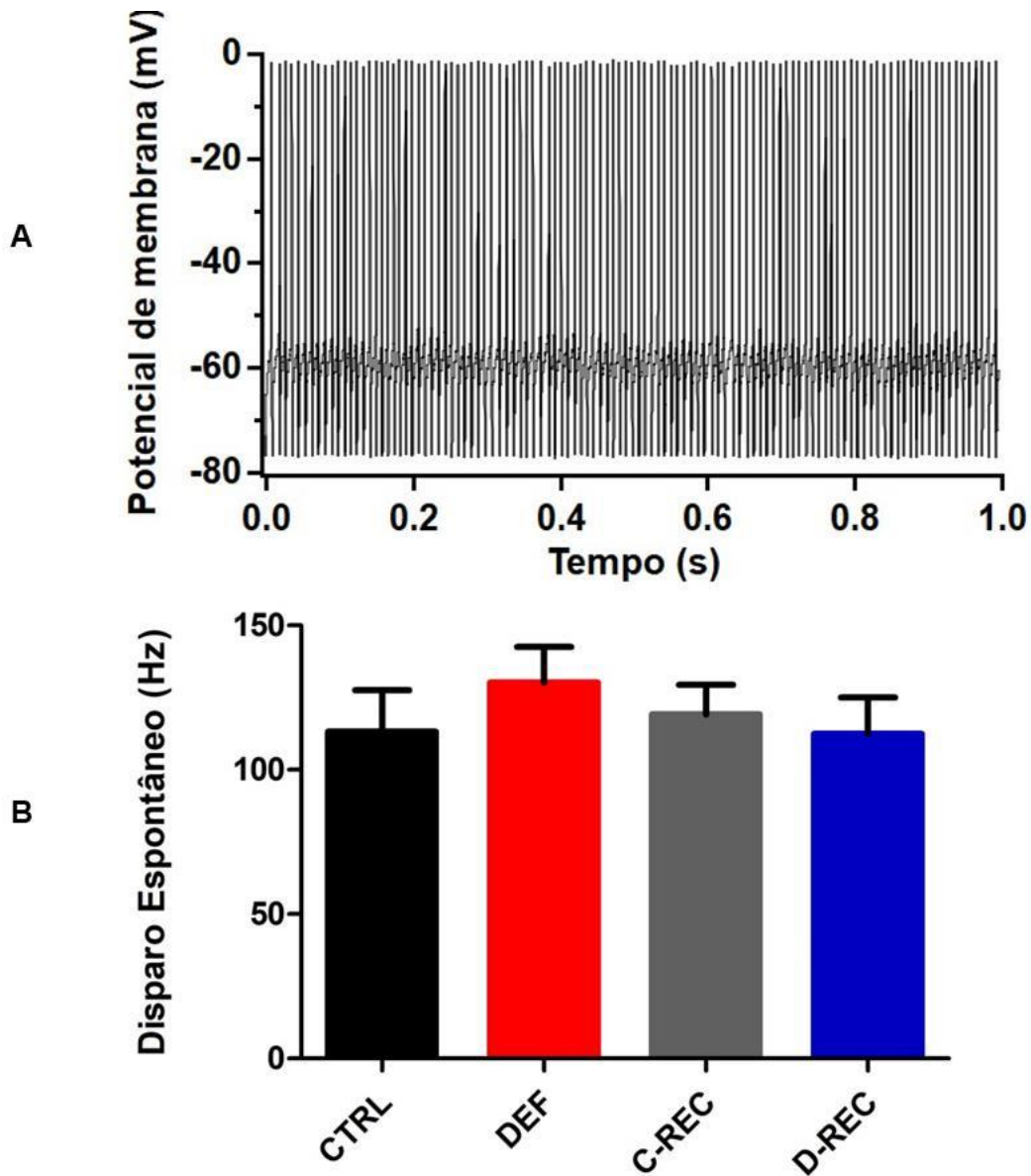


Figura 9: A deficiência de tiamina não altera a frequência do disparo espontâneo das células de Purkinje. (A) Trecho representativo de um registro mostrando a atividade espontânea das células de Purkinje, (disparo simples). **(B)** Gráfico de barras das médias da frequência do disparo espontâneo para cada grupo. (CTRL: N=10; DEF: N=11; C-REC: N=12; D-REC: N=15). Teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunns.

5.2.2 A deficiência de tiamina altera a reobase das células de Purkinje.

A reobase, definida como a corrente mínima necessária para deflagrar um potencial de ação, mede a excitabilidade intrínseca do neurônio. Com o objetivo de verificar se a deficiência de tiamina exerceu algum efeito sobre a reobase dos neurônios de Purkinje, foram feitos registros na modalidade *Whole-cell* em *current clamp*. O potencial de membrana das células foi mantido em -80 mV através da injeção constante de corrente. Sobrepostos a essa corrente constante, foram aplicados pulsos de corrente com duração de 1 s e amplitude que variou de -20 a 370 pA, em passos de 10 pA (Figura 10A). As figuras 10 B e C mostram exemplos representativos da resposta de uma célula de Purkinje ao protocolo. Pode-se ver que as células de Purkinje dos animais deficientes precisam de menos corrente para gerar um potencial de ação, comparado com as células do grupo controle. A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis mostrou diferença entre os grupos ($p=0,0019$). Após aplicação do pós teste de Dunns foi encontrada diferença significativa entre a reobase do grupo deficiente comparada com o controle (DEF 164 ± 20.1 vs 363 ± 49.5 pA, N=16 CTRL, $p<0.05$) e entre o grupo deficiente e o deficiente recuperado (DEF 164 ± 20.1 pA , N=20 vs. 291 ± 43.1 pA, N=21 D-REC, $p<0.05$) (Figura 10D). Concluímos que o déficit de tiamina diminui, de forma reversível (para o período de recuperação estudado), a reobase das células de Purkinje dos animais deficientes.

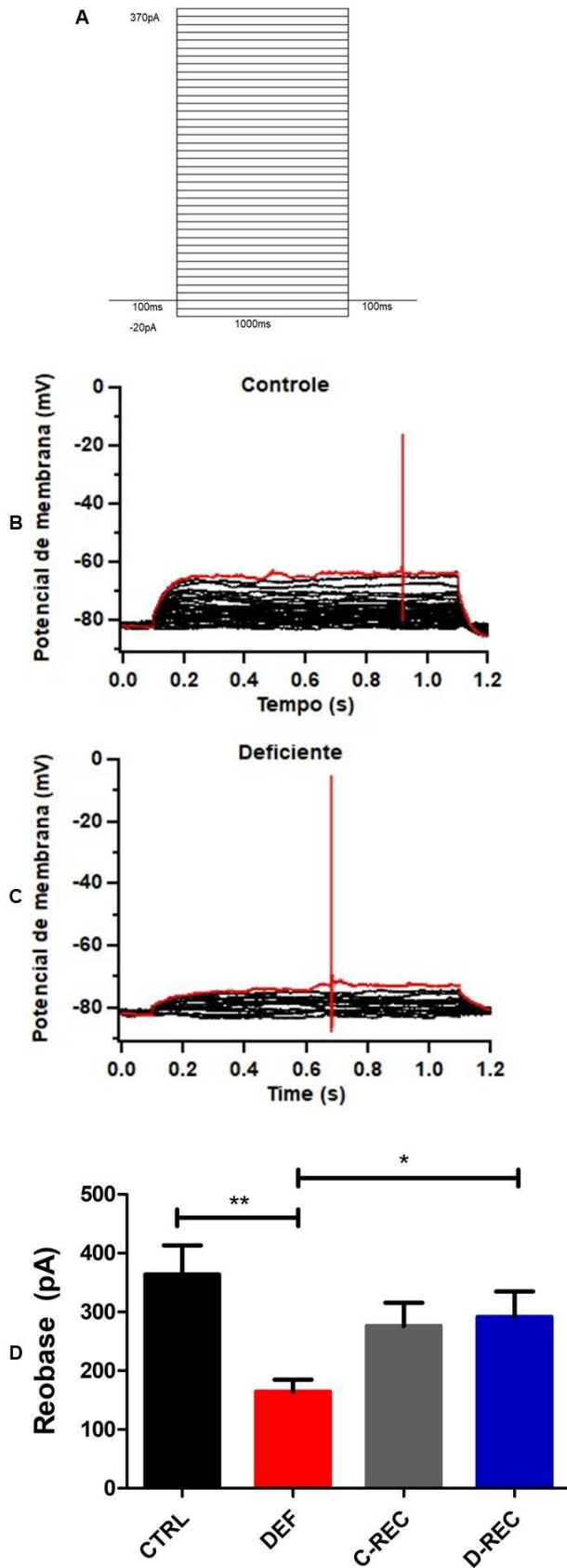


Figura 10 : A deficiência de tiamina diminui a rebase das células de purkinje. **(A)** Protocolo de injeção de corrente utilizado para determinar a rebase. **(B)** Resposta representativa de uma célula do grupo controle **(C)** Resposta representativa de uma célula do grupo deficiente. **(D)** Rebase dos quatro grupos (CTRL: N=16; DEF: N=20; C-REC: N=17; D-REC: N=21 $p < 0,05$). Teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunns. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.2.3 A deficiência de tiamina não altera os valores da resistência de entrada.

Outra das propriedades elétricas da membrana dos neurônios é a resistência de entrada, determinada principalmente pela resistência da membrana e que está relacionada ao tamanho da célula e condutância da membrana em repouso (MCKAY; TURNER, 2005).

Sabendo que a deficiência de tiamina causa uma diminuição na reobase das células quisemos comprovar se o motivo poderia ser uma possível alteração na resistência de entrada. Para determinar se a deficiência de tiamina alterava a resistência de entrada das células de Purkinje, foi aplicado durante o registro da célula, na modalidade *current clamp*, um pulso de corrente negativa (-1 nA) com duração de 500 ms. Este pulso foi injetado enquanto a membrana se encontrava ajustada em -80 mV (Figura 11A). A resposta gerada pela célula a este tipo de protocolo é conhecida como resposta passiva da membrana (Figura 11B), após ser analisada não foi encontrada diferença significativa na resistência de entrada dos diferentes grupos experimentais (CTRL $27 \pm 1.9 \text{ M}\Omega$, N=17; DEF $28 \pm 1.2 \text{ M}\Omega$, N=24; C-REC $26 \pm 1.20 \text{ M}\Omega$, N=19; D-REC $25 \pm 1.1 \text{ M}\Omega$, N=23, $p=0.66$), (Figura 11C). Baseado no resultado é possível inferir que o modelo de deficiência de tiamina pela modificação da dieta e injeção de Pirritiamina não causa alterações na resistência de entrada nas células de Purkinje.

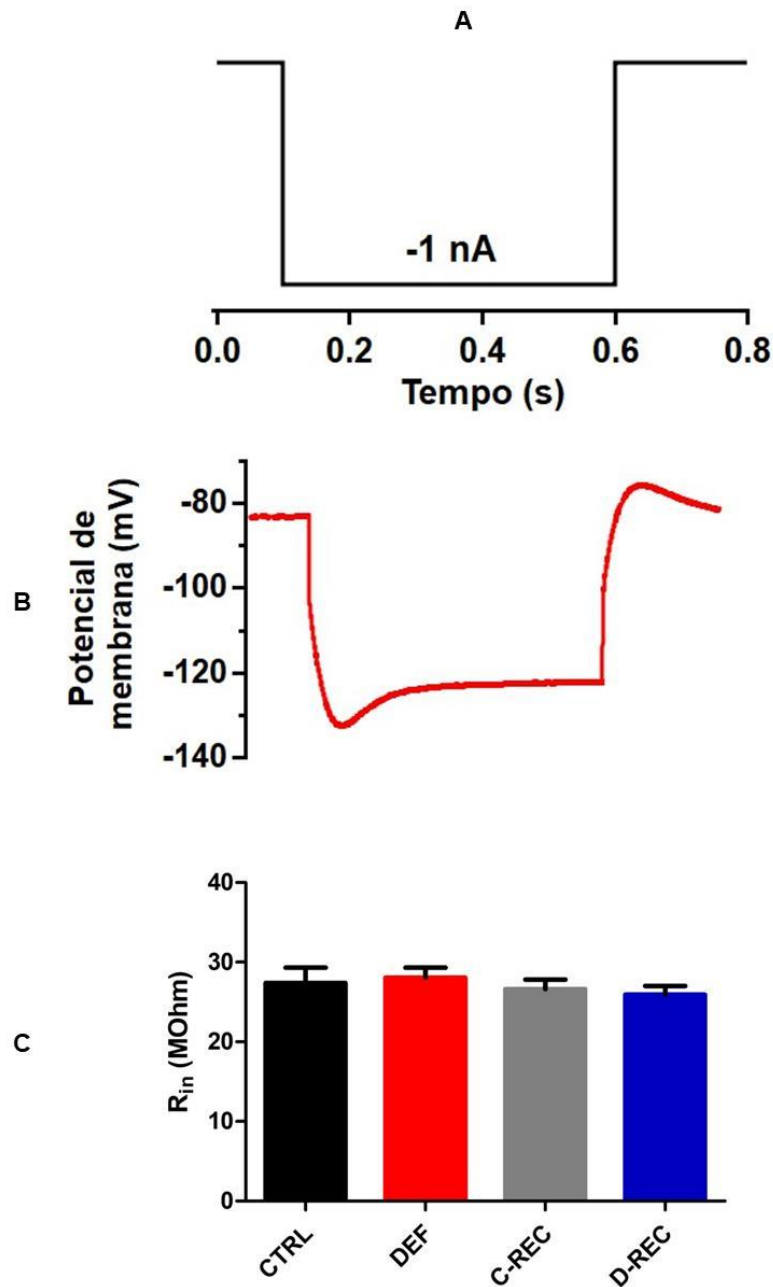


Figura 11: A deficiência de tiamina não varia a resistência de entrada nas células de Purkinje. (A) Protocolo de um pulso hiperpolarizantes de corrente para avaliar a resistência de entrada. **(B)** Resposta passiva das células ao protocolo descrito em A. **(C)** Gráfico representativo dos valores de R_{in} para os diferentes grupos experimentais (CTRL: N=17; DEF: N=24; C-REC: N=19; D-REC: N=23). ($p=0.66$), teste Kruskal-Wallis com pós- teste de Dunns.

5.2.4 A relação entre a frequência dos potenciais de ação e a quantidade de corrente injetada foi alterada pela deficiência de tiamina.

Vistos os efeitos da deficiência de tiamina sobre os parâmetros anteriores, quisemos saber se o déficit de tiamina também causava alterações na relação entre a frequência dos potenciais de ação e a corrente injetada. Para isso, as células foram mantidas em um potencial de membrana de -80mV com injeção constante de corrente. Em seguida foi aplicado um protocolo de injeção de corrente, foram aplicados pulsos de corrente com duração de 1 s e amplitude que variou de -100 a 1850 pA em incrementos de 50 pA (Figura 12 A). Com o fim de avaliar a sensibilidade das células à corrente injetada, o número de potenciais de ação disparados para cada amplitude de corrente injetada, foram contados e estes dados foram plotados a partir da reobase de cada célula. Os primeiros 5 pontos acima da reobase foram usados para ajustar uma reta, cuja inclinação foi medida e comparada entre os grupos. Observamos uma diferença significativa entre os grupos ao aplicar o teste de Kruskal-Wallis ($p=0.0046$). Com o pós teste de Dunns foi encontrada diferença significativa somente entre o grupo deficiente e deficiente recuperado (DEF 0.49 ± 0.03 Hz /pA, N=20 vs. 0.33 ± 0.02 Hz/pA, N=18, D-REC, $p<0.05$), (Figura 12D). A inclinação para os outros grupos foi CTRL 0.50 ± 0.08 Hz /pA (N=14); C-REC 0.38 ± 0.03 Hz /Pa (N=19). Finalmente sabendo que as células de Purkinje apresentam diferentes tamanhos e, portanto, diferentes reobases, para separar o efeito do tamanho da corrente do tamanho da célula, os dados foram reanalisados, para isso a corrente foi expressada na abscissa em termos da reobase de cada célula, (Figura 13). Encontrou-se diferença significativa entre o grupo controle e o deficiente, quando foi injetada corrente que corresponde a 3,5-5 vezes a reobase.

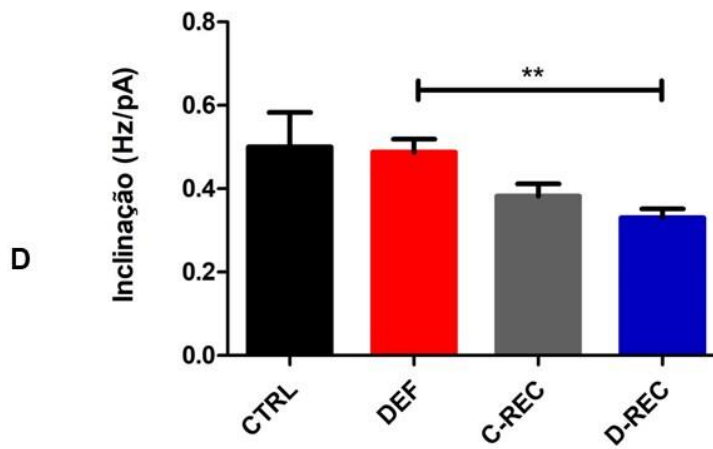
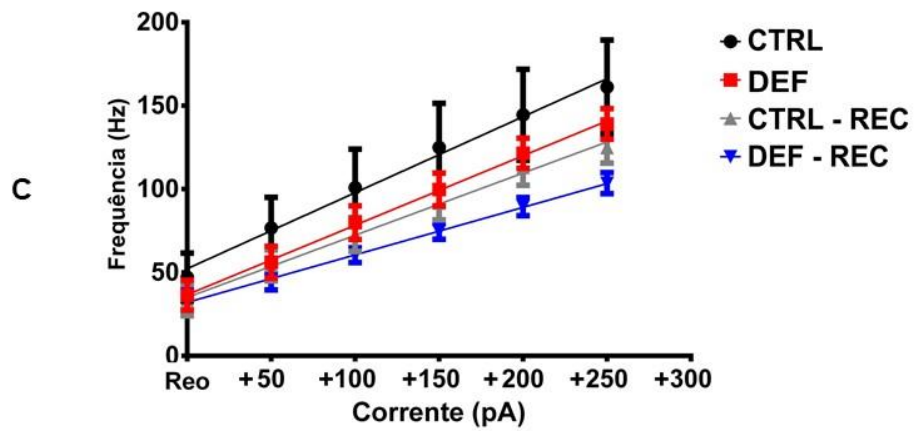
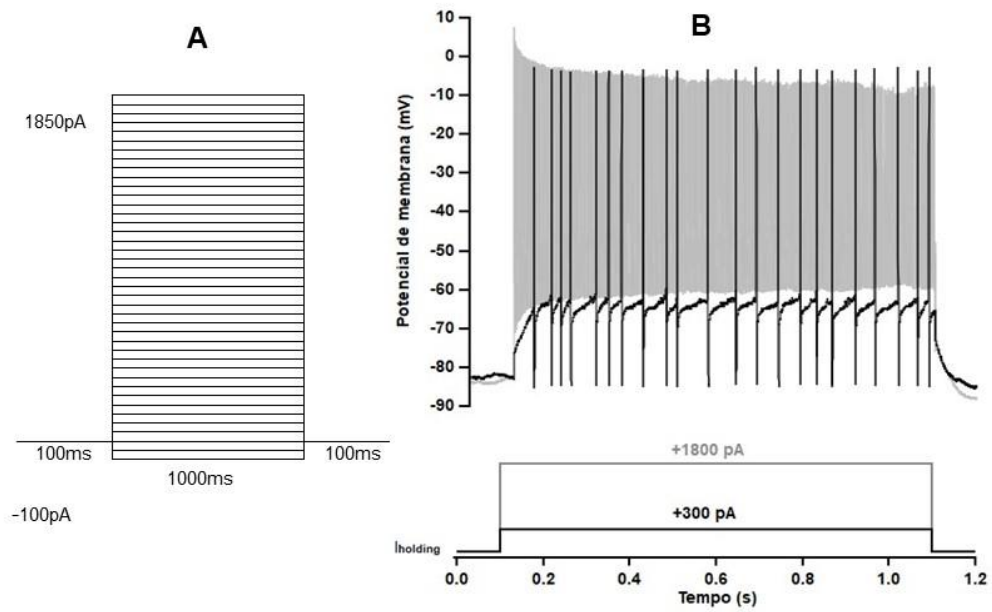


Figura 12: A deficiência de tiamina causa alterações na relação entre a frequência dos potenciais de ação e a quantidade de corrente injetada. (A) Protocolo de injeção de corrente aplicado às células de Purkinje. **(B)** Resposta da célula a diferentes pulsos de corrente (+300 e 1800 pA). **(C)** Representativo da inclinação da reta da relação entre o ganho dos potenciais de ação e a corrente aplicada para os diferentes grupos. **(D)** Gráfico indicando a média e o erro padrão para cada um dos grupos (CTRL: N=14; DEF: N=20; C-REC: N=17; D-REC: N=18). Teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. *P<0.05, **p<0.01.

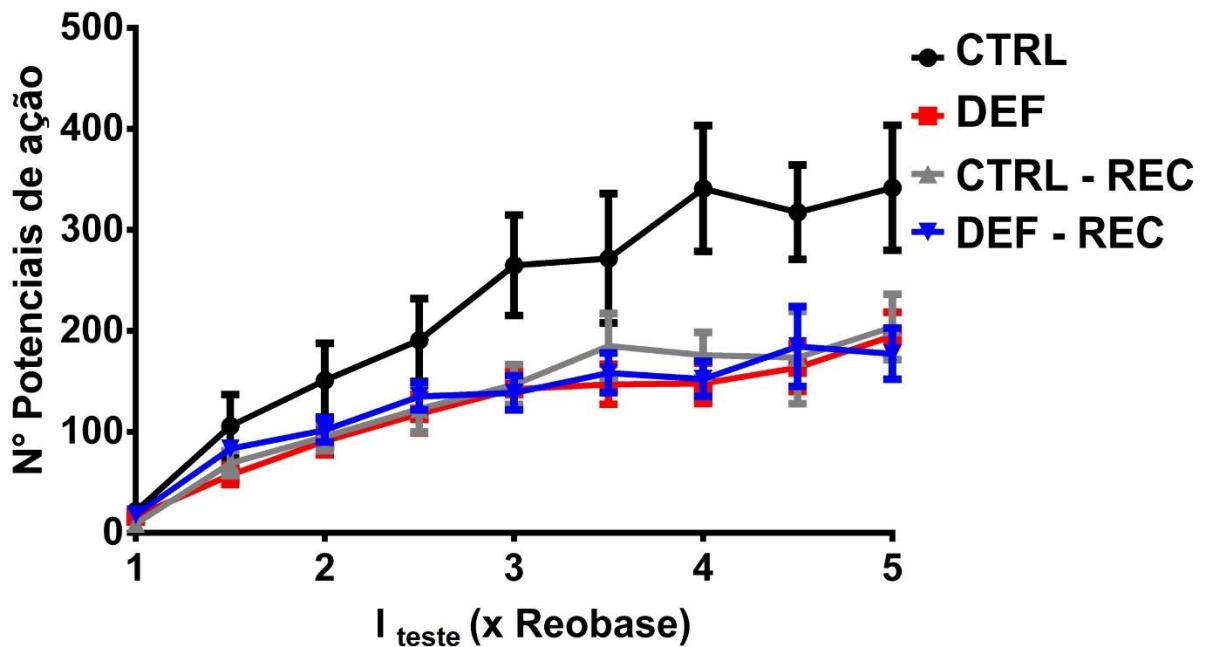


Figura 13: Relação entre a frequência dos potenciais de ação e o incremento da corrente. As células foram estimuladas por injeções de corrente (I_{teste}) a 1-5 vezes a sua reobase e a frequência dos potenciais medido. Teste t. *p<0.05.

5.3 Parâmetros morfológicos

Os dados apresentados acima indicam que a deficiência de tiamina causa alterações eletrofisiológicas das células de Purkinje. Quisemos verificar se parâmetros morfológicos seriam também afetados. Com o propósito de responder essa hipótese foram feitos estudos histológicos das células de Purkinje da região da vermis cerebelar de animais controle e deficientes (dias 12 e 13 do tratamento). Os parâmetros avaliados foram o número de células, o diâmetro maior e menor do soma, e o diâmetro do núcleo.

5.3.1 A deficiência de tiamina não afetou o número de células de Purkinje.

A figura 14A mostra uma imagem panorâmica da fatia da vermis cerebelar (4X), onde foram identificadas as três camadas do córtex cerebelar, a camada molecular, a camada de células de Purkinje e a camada granular (Figura 14B). Seguindo os critérios para a seleção das células a serem quantificadas: célula localizada dentro da camada com membrana celular completa e bem definida (Figura 14C), foi visto que não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de células de Purkinje por campo (Figura 14D) entre os grupos controle e deficiente (DEF: 7.2 ± 0.44 N=3 animais ; CTRL: 7.0 ± 0.38 N=3 animais, $p=0.78$) o que nos permite inferir que a deficiência de tiamina não causa diminuição do número de células de Purkinje

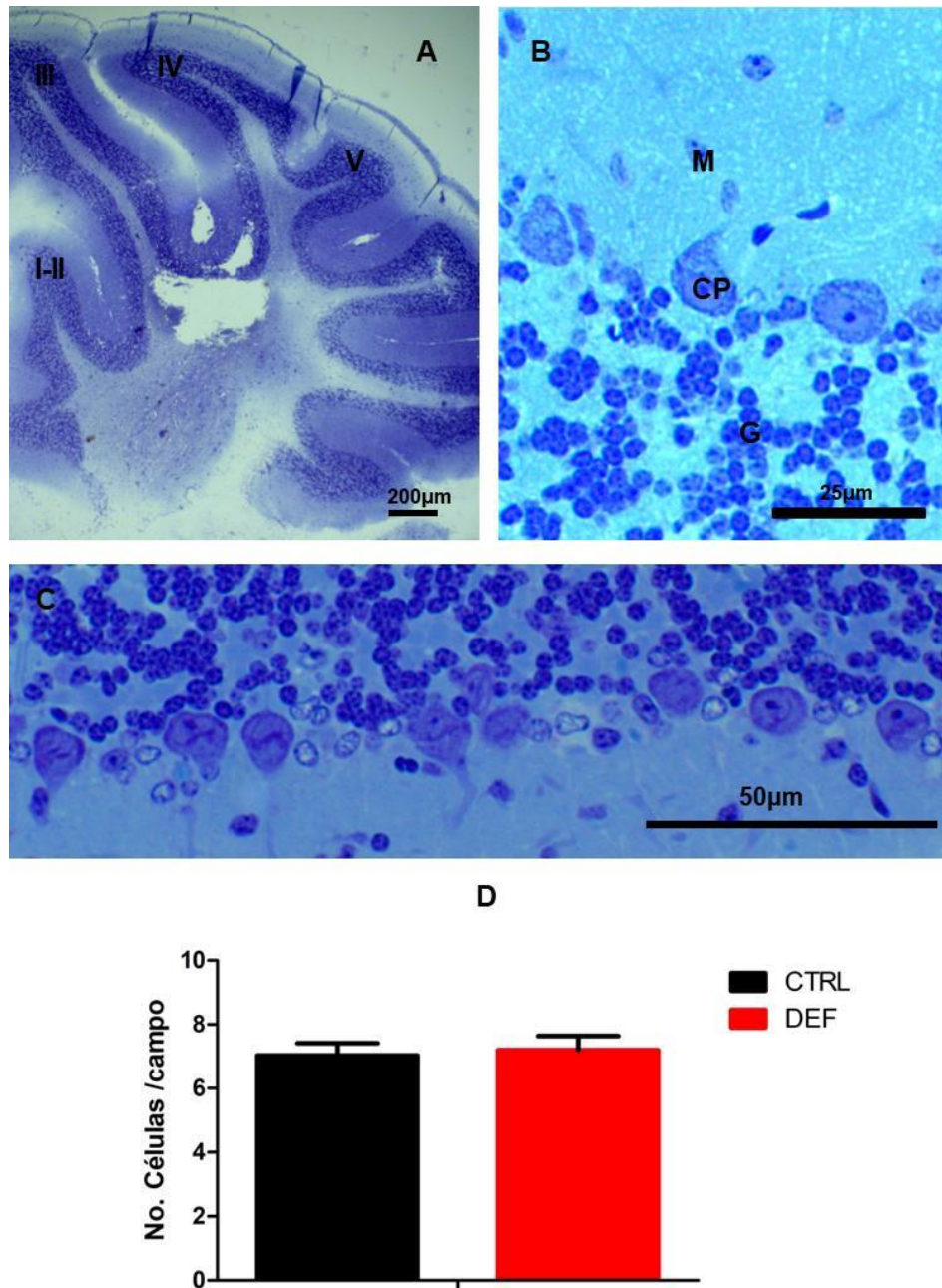


Figura 14: O número das células de Purkinje não diminui nos animais deficientes. (A) Panorâmica (4x), da fatia da vermis cerebelar e identificação dos lóbulos III, IV, V localizados para parte anterior da vermis. **(B)** Camadas do córtex cerebelar: molecular (**M**), células de Purkinje (**CP**), granular (**G**) como objetiva de 40x. **(C)** Quantificação das células por campo. **(D)** Media \pm erro padrão do número de células contadas (CTRL: N=3 animais; DEF: N=3 animais), teste *t*.

5.3.2 A deficiência de tiamina alterou o tamanho das células de Purkinje.

Os outros parâmetros medidos nas células de Purkinje foram os diâmetros maior e menor e o diâmetro do núcleo (Figura 14). Para essa medição, só foram incluídas células localizadas dentro da camada, com membrana celular integral e bem definida, e com núcleo e nucléolo presentes e bem definidos.

A figura 15A mostra a representação esquemática de como foi realizado a medição do diâmetro maior (a), menor (b), e do núcleo (c), nas células de Purkinje. Ao comparar os grupos deficiente com o controle foi encontrada diferença significativa no diâmetro menor (DEF $14.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$, N=3 animais vs $15.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$, N=3 animais CTRL, $p=0.0201$), (Figura 15C) e no diâmetro de núcleo (DEF $7.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$, N=3 animais vs $7.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$, N=3 animais CTRL, $p < 0.0001$), (Figura 15D). Não foi encontrada diferença significativa diâmetro maior (DEF $20.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$, N=3 animais vs $21.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$, N=animais CTRL, $p=0.29$), (Figura 15A). Concluímos que as células de Purkinje estão sutilmente menores nos animais deficientes em tiamina.

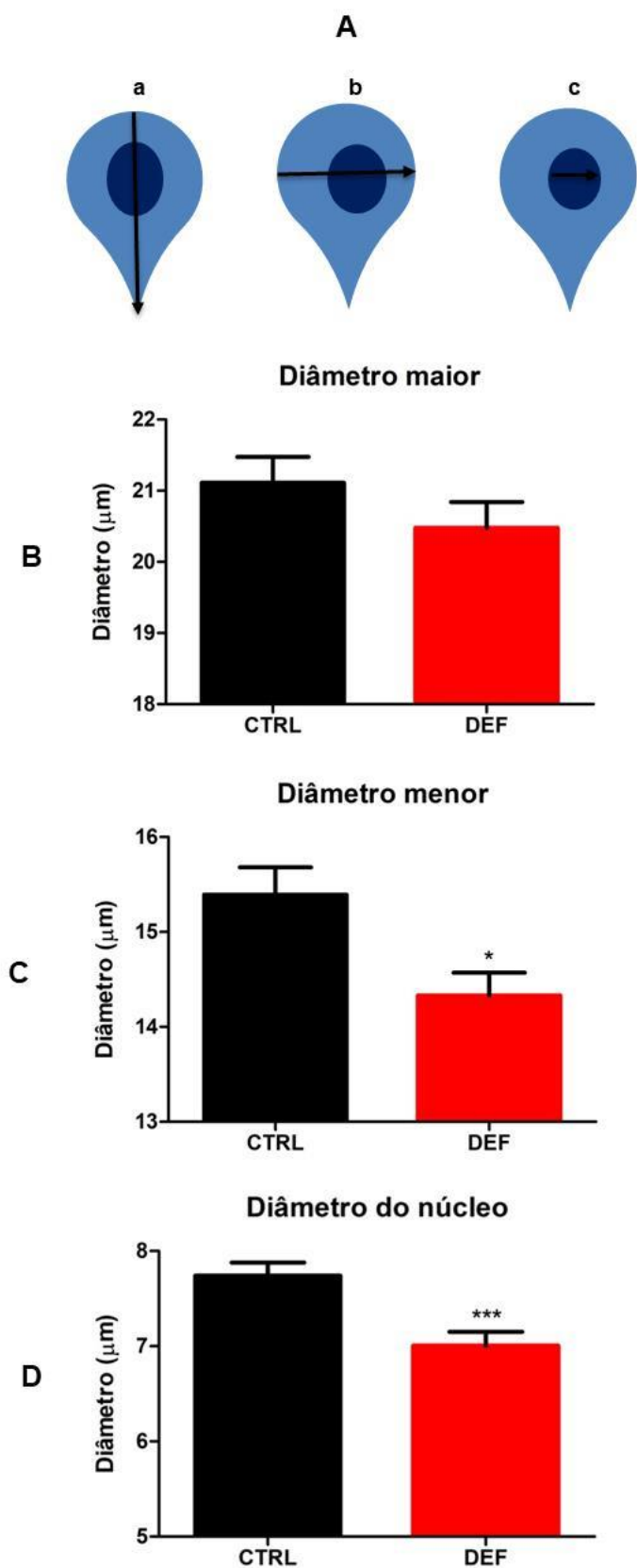


Figura 15: A deficiência de tiamina diminui o diâmetro das células de Purkinje. (A) Esquema representativo das medidas dos diâmetros maior (a), menor (b), do núcleo (c). **(B)** Gráficos de barras representativos das medias e desvio padrão para o diâmetro maior (DEF: N=111 vs N=131 CTRL). **(C)** Diâmetro menor (DEF: N=3 animais vs N=3 animais CTRL). **(D)** Diâmetro do núcleo (DEF: N=3 animais vs N=3 animais CTRL). Foi usado o teste de U de Mann de Whitney para todas as medidas. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

6. DISCUSSÃO

A tiamina é um nutriente essencial e contribui para o funcionamento adequado de vários sistemas do organismo. Uma das funções principais que cumpre é como cofator de um número de enzimas envolvidas em processos como o metabolismo de carboidratos, sínteses de neurotransmissores e produção de ácidos nucleicos. No sistema Nervoso Central, além das funções citados acima, a tiamina participa na transmissão de impulsos nervosos nas sinapses e no processo de mielinização (BETTENDORFF, 1994; COOPER; PINCUS, 1979). A deficiência desta vitamina causada pela ausência na dieta ou por dificuldades na sua absorção pode causar uma série de distúrbios e alterações que levam a manifestação dos sinais próprios da deficiência de tiamina que tem sido relacionados com uma doença neurodegenerativa, o Síndrome de Wernicke-Korsakoff (HAZELL, 2009; INABA et al., 2016).

Diversos modelos de deficiência de tiamina em roedores foram estabelecidos há vários anos em diferentes condições tanto *in vivo* como *in vitro* e tem sido usado por vários autores como o propósito de pesquisar sobre as diversas alterações que podem ser causadas no cérebro (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016; LEE, R ET AL., 1985; MOREIRA-LOBO et al., 2017; NUNES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2007). Estes modelos permitem a reprodução dos efeitos da deficiência em diferentes estágios além de contribuir com uma descrição precisa de mudanças neuroquímicas que ocorrem em regiões particulares do cérebro durante a deficiência e pós recuperação, portanto, a validade desses modelos vem da capacidade de manipular o tempo e a duração do tratamento. Todos esses enfoques têm ajudado para o conhecimento de mecanismos celulares patológicos de doenças relacionadas ao déficit de tiamina como a síndrome de Wernicke – Korsakoff (VETRENO et al., 2012).

Em nosso caso, o modelo de deficiência de tiamina foi baseado numa dieta sem tiamina associada a injeções diárias de Piritiamina, o que resultou em um modelo apropriado para estudar as alterações causadas pelo déficit de tiamina em camundongos adultos. Neste estudo, foram avaliados os efeitos deste modelo sobre parâmetros

eletrofisiológicos e morfológicos em fatias da vermis do cerebelo de camundongos adultos. Os dados obtidos mostraram que ao longo do tratamento o grupo controle e deficiente perderam peso de maneira significativa, especialmente nos 12^o e 13^o dias de tratamento (Figura 8), lembrando que a quantidade de ração disponibilizado para os animais controles foi pareado ao consumo dos animais deficientes, com suplemento diário de tiamina. Durante o tratamento, além da diminuição de apetite, e consequente perda de peso, os animais deficientes apresentaram outros sinais clínicos característicos de deficiência de tiamina o que não aconteceu com o grupo controle. Esse fato indica que os sinais clínicos observados foram consequência do déficit de tiamina e não à perda de peso.

Nesse estudo, os animais foram considerados deficientes quando apresentaram os sinais clínicos de diminuição do apetite, perda de peso, distensão dos membros inferiores e encurvamento, sinais tipicamente associadas com o déficit da tiamina em rato e camundongo (BUTTERWORTH; HEROUX, 1989; HAMADA et al., 2013; SARKAR et al., 2016; WATANABE, 1978). Segundo os estágios da deficiência propostos por ZHANG et al. (1995), os animais estudados são classificados no estágio mais brando da deficiência. Para o presente estudo foi decidido não deixar a deficiência evoluir para sinais mais severas como convulsões, devido às múltiplas alterações que isto pode causar nos registros eletrofisiológicos (DINGLELINE; VARVEL; DUDEK, 2014).

Existem evidências de que as alterações causadas pela deficiência de tiamina ocorrem bem antes que qualquer efeito mensurável no metabolismo intermediário seja detectável, sugerindo, assim, um efeito mais específico da tiamina na bioeletrogênese (BETTENDORFF; WINS; SCHOFFENIELS, 1988).

As células de Purkinje disparam de maneira espontânea potencias de ação que podem ser potenciais de ação simples ou complexos, estes últimos dependem da estimulação das fibras trepadeiras (ECCLES; LLINAS; SASAKI, 1964). Durante este estudo avaliamos a frequência de disparos espontâneos simples e não foi observada variação entre os grupos (Figura 9B). Este tipo de disparo depende em maior parte da

ativação de canais para sódio dependentes de voltagem (Nav 1.1, 1.2 e 1.6) (ARANCILLO et al., 2014; RAMAN; BEAN, 1999; SCHMOLESKY et al., 2002), por este motivo podemos determinar que a deficiência de tiamina não altera a condutância através destes canais. Este resultado corrobora um estudo realizado por LEE et al. (1985) quem avaliou a sensibilidade das células de Purkinje de ratos deficientes em tiamina e controles à aplicação 5-hidroxitriptamina (5-HT) iontoforicamente e também não identificaram alterações na frequência de disparo espontâneo.

O próximo passo foi avaliar se a excitabilidade das células de Purkinje tinha sido alterada por causa do déficit de tiamina, para isto foram avaliados os parâmetros de reobase e resistência de entrada destes neurônios. Como estas células apresentam disparos espontâneos, foi necessária a injeção de uma corrente negativa que mantivesse o potencial de membrana das células em -80 mV, desta forma todas seriam avaliadas a partir do mesmo potencial de “repouso”. Sob estas condições, vimos que o grupo deficiente apresentou redução da reobase, que foi parcialmente recuperada após o protocolo de recuperação (injeção de uma única dose de tiamina e a restituição ao alimento comercial durante os sete dias) (Figura 10D). São poucos os estudos feitos avaliando parâmetros eletrofisiológicos da deficiência de tiamina nas células de Purkinje, no entanto, há algumas evidências do efeito deste tratamento sobre células das diferentes camadas do córtex cerebelar, particularmente na camada granular. Nas células granulares foi vista uma redução na espessura da camada (OLIVEIRA, 2006), uma diminuição na magnitude das correntes de potássio tipo A (CRUZ et al., 2012) e um incremento na densidade de corrente de Ca^{+2} , causada por um aumento na expressão dos canais Ca_v 1.2, por meio de um modelo *in vitro* (MOREIRA-LOBO et al., 2017).

De acordo com estes antecedentes, podemos inferir que, provavelmente a redução da reobase no grupo dos animais deficientes foi provocada por uma alteração na corrente de potássio tipo A, pois isto já foi visto em células granulares (CRUZ et al., 2012) e em neurônios do gânglio dorsal, a redução da corrente de potássio tipo A causa aumento na excitabilidade (vista na diminuição da reobase) (XU et al., 2006). Como descrito por MOREIRA-LOBO et al. (2017) a corrente de Ca^{+2} aumenta em animais

deficientes, no entanto, estas correntes em células de Purkinje têm sido mais relacionadas à manutenção do disparo espontâneo complexo (ARANCILLO et al., 2014; SCHMOLESKY et al., 2002), um parâmetro que não foi avaliado neste trabalho.

A resistência de entrada de uma célula determina a variação de voltagem que a célula apresenta como resposta a uma injeção de corrente (KANDEL et al., 2012). Medimos a resistência de entrada e não encontramos diferenças significativas entre os grupos (Figura 11C). A manutenção da resistência de entrada sugere que a densidade de canais presentes e o tamanho da célula também não foi alterado (KANDEL et al., 2012). Trabalhos prévios tem mostrado que a deficiência de tiamina diminui o volume das células de Purkinje (ANDERSEN, 2004b) no cerebelo; mas a nossa análise histológica mostrou diminuição de apenas 7% no diâmetro menor das células de Purkinje, sem nenhuma alteração significativa do diâmetro maior. Aparentemente, uma redução desta magnitude não é suficiente para causar grandes alterações na resistência de entrada das células.

O último parâmetro que consideramos foi a relação entre o aumento na frequência de disparo por corrente injetada, com unidades de Hz/pA. A partir da reobase de cada célula, foi ajustada uma reta aos seis primeiros pontos da curva e foi determinada como a inclinação da reta. Este valor, que mede a sensibilidade das células a corrente injetada, não apresentou diferenças significativas entre os grupos controle e deficientes, mas identificamos diminuição significativa no valor desta inclinação no grupo dos deficientes recuperados (Figura 12D).

Análise destes dados da sensibilidade nos levaram a pensar que pode existir um fator a mais que esteja modulando a sensibilidade destas células, pois apesar do grupo controle recuperado ter recebido o suprimento diário de tiamina (0.4 mg/kg) eles também mostraram uma tendência de sensibilidade reduzida quando comparado com os controles, pensamos que uma das causas possa ter sido a alimentação que eles tiveram durante os sete dias posteriores ao pico da deficiência ou a diferença de idade entre os dois grupos (CTRL: 10 semanas vs. C_REC: 11 semanas).

Com esses dados foi também plotado o aumento na frequência por variação da corrente de acordo com a reobase de cada célula e pudemos observar que o animal deficiente apresenta uma frequência reduzida em injeções superiores a 3x a Reobase (Figura 13), esse dado mostra que além da reobase reduzida, os animais deficientes também apresentam uma frequência de disparo menor.

Como citado acima, foi visto que deficiência de tiamina pode alterar correntes iônicas (CRUZ et al., 2012; MOREIRA-LOBO et al., 2017) devido, provavelmente, a modulação direta ou indireta sobre os canais, ao respeito, sabe-se que a TTP está amplamente relacionada ao processo de condução elétrica (BETTENDORFF; KOLB; SCHOFFENIELS, 1993; SCHOFFENIELS; DANDRIFOSSE; BETTENDORFF, 1984) e Bettendorf et al. (1988) demonstraram que a atividade da tiamina trifosfatase (precursora da TTP) é controlada por ânions (BETTENDORFF; WINS; SCHOFFENIELS, 1988), e que, ao mesmo tempo, a ativação de canais de cloreto pode ser favorecida tanto pela despolarização da membrana como pela ação do TTP intracelular (BETTENDORFF et al., 1989; BETTENDORFF; KOLB; SCHOFFENIELS, 1993). Da mesma forma, foi visto que a TTP pode modificar o transporte do Na⁺ (GIBSON; ZHANG, 2002; ITOKAWA, 1976).

Os resultados eletrofisiológicos deste trabalho indicam que a deficiência de tiamina altera a excitabilidade intrínseca das células de Purkinje, provavelmente por alteração na condução iônica de diferentes íons (Na⁺, K⁺, Ca⁺², Cl⁻). Para determinar de forma direta se há variações na condutância destes íons, novos experimentos devem ser formulados com protocolos específicos e bloqueadores que permitam isolar a corrente de cada tipo de canal.

A Deficiência de tiamina leva à ruptura de várias vias enzimáticas que são cruciais para a função celular e metabólica adequada, especificamente das que usam como cofator a tiamina difosfato (BUTTERWORTH; GIGUÈRE; BESNARD, 1986; GIBSON et al., 1984; RF. BUTTERWORTH, JF. GIGUÈRE, 1987). Uma delas é a enzima alfa-cetoglutarato desidrogenase (α -KGDH), que catalisa uma importante reação

regulatória do ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs) convertendo o cetoglutarato em succinil-CoA e gerando NADH. Existem várias evidências de que a deficiência de tiamina causa diminuição nos níveis desta enzima tanto em indivíduos com síndrome de Wernicke-Korsakoff, bem como no modelo animal da deficiência (BUTTERWORTH; GIGUÈRE; BESNARD, 1986; GIBSON et al., 1984).

GIBSON et al. (1984) e BUTTERWORTH et al. (1986) demonstraram que o tratamento com pirritiamina resultou em uma maior diminuição na atividade de α -KGDH do que das outras enzimas dependentes de tiamina difosfato. Em apoio a esta afirmação, estudos do efeito do tratamento com Pirritiamina nas atividades da α -KGDH em diferentes regiões do cérebro mostraram, consistentemente, diminuições severas, porém reversíveis (três dias pós reversão da deficiência), de α -KGDH no hipocampo, na ponte e no cerebelo. Sabe-se também que a deficiência de tiamina aumenta a densidade das correntes de Ca^{2+} (MOREIRA-LOBO et al., 2017) e que concentrações de Ca^{2+} maiores ou iguais a 100 μM , inibem a atividade da α -KGDH (LAI; COOPER, 1986). A deficiência de tiamina também contribui com a produção excessiva de óxido nítrico (NO) e quando este interage com o superóxido de radical livre forma o peroxinitrito, um poderoso oxidante associado à toxicidade e dano celular e tanto o NO quanto o peroxinitrito inibem a atividade da α -KGDH (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

Nesse estudo, não foi encontrada uma diferença significativa no número de células de Purkinje entre o grupo deficiente e o controle, mas sim foram observadas diminuições no diâmetro menor das células e no diâmetro do núcleo, esses achados podem ser correlacionados com o estudo feito por BAKER et al. (1999), onde não foi observada diminuição do número de células de Purkinje ao comparar pacientes alcoólatras deficientes em tiamina de pessoas não alcoólatras. ANDERSEN (2004) tampouco achou diferença no número de células de Purkinje, mas sim uma redução significativa no volume do corpo e núcleo das células de Purkinje em pacientes alcoólatras deficientes em tiamina. As alterações vistas nos diâmetros poderiam estar relacionadas à diminuição na atividade da α -KGDH. Esta enzima, sendo um indicador de dano celular, poderia contribuir com as alterações apresentadas nas células que levaram

a uma possível diminuição nos diâmetros. Reduções nos níveis desta enzima no cérebro conduzem a uma diminuição da oxidação da glicose (piruvato), perturbando a função mitocondrial, devido à alteração do funcionamento do ciclo de Krebs e, concomitantemente, provocando uma diminuição da síntese de ATP (GUBLER, 1961) o que representa uma causa provável da diminuição do estado de energia das células, que pode contribuir para perda da função neuronal, sendo um possível início de morte das células, manifestando-se numa possível diminuição dos diâmetros tanto nuclear como do corpo dos neurônios.

Os animais deficientes foram classificados em um estado inicial da deficiência de tiamina (ZHANG; HENDERSON; CORSO, 1995), no qual, segundo os estudos de BUTTERWORTH et al. (1986), a atividade da α KGDH já apresenta uma diminuição significativa, mas sendo um estado inicial, talvez ainda não exista uma perda neuronal grave, mas as diminuições nos diâmetros poderia ser um fator preditivo do começo da morte dos neurônios.

7. CONCLUSÕES

Baseando-se nos nossos resultados podemos concluir que:

1. O modelo de deficiência de tiamina em camundongos, feito por uma dieta sem tiamina e injeções de Piritamina é apropriado para o estudo de alterações eletrofisiológicas e morfológicas das células de Purkinje cerebelares.
2. A deficiência de tiamina diminui a reobase das células de Purkinje e a frequência dos potenciais de ação gerados quando estimuladas a 3,5 – 5,0 vezes sua reobase. Todos os dois efeitos foram revertidos depois da aplicação de tiamina e de um tempo de recuperação de 7 dias com água, e alimento *ad libitum*.
3. A deficiência de tiamina alterou o diâmetro menor e do núcleo da célula de Purkinje.

8. AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho foi realizado com recursos da **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), do **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da **FAPEMG** (Fundação de Amparo à Pesquisa de MG).

9. REFERENCIAS

ALCAIDE, M. L. et al. **Wernicke ' s encephalopathy in AIDS : a preventable cause of fatal neurological deficit.** p. 712–713, 2003.

ANDERSEN, B. B. **Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics.** Brain Research, v. 1007, n. 1–2, p. 10–18, 2004a.

ANDERSEN, B. B. **Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics** Brain Research, 2004b.

ARANCILLO, M. et al. **In vivo analysis of Purkinje cell firing properties during postnatal mouse development.** Journal of Neurophysiology, v. 113, n. 2, p. 578–591, 2014.

BAKER, K. G. et al. **Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy.** Neuroscience, v. 91, n. 2, p. 429–438, 1999.

BERNE, R.; LEVY, M. **Fisiologia.** 5. ed ed. [s.l: s.n.]

BETTENDORFF, L. et al. **Thiamine Triphosphatase in the Membranes of the Main Electric Organ of Electrophorus electricus: Substrate-Enzyme Interactions.** Journal of Neurochemistry, v. 53, n. 3, p. 738–746, 1989.

BETTENDORFF, L. **Thiamine in excitable tissues: Reflections on a non-cofactor role.** Metabolic Brain Disease, v. 9, n. 3, p. 183–209, 1994.

BETTENDORFF, L.; KOLB, H. A.; SCHOFFENIELS, E. **Thiamine triphosphate activates an anion channel of large unit conductance in neuroblastoma cells.** The Journal of membrane biology, v. 136, n. 3, p. 281–8, dez. 1993.

BETTENDORFF, L.; WINS, P.; SCHOFFENIELS, E. **Thiamine triphosphatase from *Electrophorus electricus* organ is anion-dependent and irreversibly inhibited by 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2' disulfonic acid.** BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, n. 3, p. 942–947, 1988.

BOINAGROV, D.; LOUDIN, J.; PALANKER, D. **Strength–Duration Relationship for Extracellular Neural Stimulation: Numerical and Analytical Models.** Journal of Neurophysiology, v. 104, n. 4, p. 2236–2248, 2010.

BOWYER, J. F. et al. **Microglial activation and vascular responses that are associated with early thalamic neurodegeneration resulting from thiamine deficiency.** NeuroToxicology, v. 65, p. 98–110, 2018.

BUTTERWORTH, R. F. **Cerebral thiamine-dependent enzyme changes in experimental Wernicke's encephalopathy.** Metabolic Brain Disease, v. 1, n. 3, p. 165–175, 1986.

BUTTERWORTH, R. F.; GIGUÈRE, J. F.; BESNARD, A. M. **Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy. 2. alpha-Ketoglutarate dehydrogenase.** Neurochemical research, v. 11, n. 4, p. 567–77, abr. 1986.

BUTTERWORTH, R.; HEROUX, M. **Effect of pyriethamine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes.** Journal of Neurochemistry, v. 52, n. 4, p. 1079–1084, 1989.

CASIROLA, D. et al. **Thiamin transport by human erythrocytes and ghosts.** v. 18, n. 125482, p. 11–18, 1990.

COLLIE, J. T. B. et al. **Vitamin B1 in critically ill patients: needs and challenges.** Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), v. 55, n. 11, p. 1–17, 2017.

COOPER, J. R.; PINCUS, J. H. **The role of thiamine in Nervous tissue.** *Neurochemical research*, v. 239, n. 4, p. 223–239, 1979.

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

CURI, R.; PROCOPIO, J. **Fisiologia basica.** 1.ed. ed. [s.l: s.n.].

DINGLEDINE, R.; VARVEL, N. H.; DUDEK, F. E. **Issues in Clinical Epileptology: A View from the Bench.** v. 813, 2014.

ECCLES, J.; LLINAS, R.; SASAKI, K. **Excitation of cerebellar purkinje cells by the climbing fibres.** *Nature*, v. 203, p. 245–6, 18 jul. 1964.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. **Perinatal thiamine restriction affects central GABA and glutamate concentrations and motor behavior of adult rat offspring.** *Neuroscience Letters*, v. 617, p. 182–187, 2016.

GANGOLF, M. et al. **Thiamine triphosphate synthesis in rat brain occurs in mitochondria and is coupled to the respiratory chain.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 1, p. 583–594, 2010.

GIBSON, G. E. et al. **Correlation of enzymatic, metabolic, and behavioral deficits in thiamin deficiency and its reversal.** *Neurochemical Research*, v. 9, n. 6, p. 803–814, 1984.

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

GREENWOOD, B. Y. J.; LOVE, E. R.; PRATT, E. **Kinetics of thiamine transport across the blood-brain barrier in the rat.** p. 95–103, 1982.

GUBLER, C. J. **Studies on the Physiological Functions of Thiamine.** The Journal of biological chemistry, v. 236, 1961.

HAMADA, S. et al. **Thiamine deficiency induces massive cell death in the olfactory bulbs of mice.** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, v. 72, n. 12, p. 1193–1202, 2013.

HARPER, C. **The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage.** v. 44, n. 2, p. 136–140, 2009.

HAZELL, A. S. **Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy.** Neurochemistry International, v. 55, n. 1–3, p. 129–135, 2009.

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

HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes.** Second edition. Cell, v. 69, n. 4, p. 579, maio 1992.

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

ITOKAWA, Y. **Thiamine and nerve membrane.** v. 22, p. 17–19, 1976.

KANDEL, E. et al. **Principles of Neural Science**, Fifth Edition. 5th editio ed. [s.l: s.n.].

KHALIQ, Z. M.; RAMAN, I. M. **Relative Contributions of Axonal and Somatic Na Channels to Action Potential Initiation in Cerebellar Purkinje Neurons**. J Neuroscience, v. 26, n. 7, p. 1935–1944, 2006.

KOPELMAN, M. D. et al. **The Korsakoff Syndrome : Clinical Aspects , Psychology and Treatment**. p. 1–7, 2009.

LAI, J.; COOPER, A. **Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors**. J Neurochem, v. 47(5):1376, 1986.

LARSEN, O.; HANSEN, J. **The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum**. Vol. 3. The Human Cerebellum, Cerebellar Connections, and Cerebellar Cortex. In: The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum. Minnesota ed. Minnesota, United States: University of Minnesota Press, 1972.

LEE, R ET AL., 1985. **Enhanced Sensitivity of Cerebellar Purkinje Cells to Iontophoretically-Applied Serotonin in Thiamine Deficiency**. v. 327, p. 249–258, 1985.

LEITE, H. et al. **Effect of blood thiamine concentrations on mortality: influence of nutritional status**. Nutrition, 2017.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 3ed. ed. [s.l: s.n.].

MCKAY, B. E.; TURNER, R. W. **Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell**. J of Phisiology, v. 3, p. 829–850, 2005.

MORAIS-SANTOS, M. et al. **Changes in estrogen receptor ER β (ESR2) expression without changes in the estradiol levels in the prostate of aging rats** PLoS ONE, 2015.

MOREIRA-LOBO, D. C. et al. **Thiamine Deficiency Increases Ca²⁺ Current and CaV1.2 L-type Ca²⁺ Channel Levels in Cerebellum Granular Neurons.** Cellular and Molecular Neurobiology, v. 37, n. 3, p. 453–460, 2017.

NUNES, P. T. et al. **Thalamic Proteome Changes and Behavioral Impairments in Thiamine-deficient Rats.** Neuroscience, v. 385, p. 181–197, 2018.

OGUZ, S. S. et al. **A rare case of severe lactic acidosis in a preterm infant : lack of thiamine during total parenteral nutrition.** v. 24, p. 843–845, 2011.

OLIVEIRA, F. **Efeitos neurodegenerativos causados pela deficiência de vitamina B1.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

OLIVEIRA, F. A. et al. **Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K⁺ channels.** Brain Research, v. 1134, n. 1, p. 79–86, 2007.

PHILLIPS, S. C.; HARPER, C. G.; KRIL, J. **A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients.** Brain : a journal of neurology, v. 110, p. 301–314, 1987.

POCOCK, G.; RICHARDS, C. **Fisiologia humana.** 2.ed ed. [s.l.: s.n.].

RAMAN, I. M.; BEAN, B. P. **Ionic Currents Underlying Spontaneous Action Potentials in Isolated Cerebellar Purkinje Neurons.** v. 19, n. 5, p. 1663–1674, 1999.

RF. BUTTERWORTH , JF. GIGUÈRE, A. B. . **Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine deficiency encephalopathy: 3. Transketolase.** Neurochemical Research, v. 12, n. 3, p. 305–310, 1987.

RINDI, G.; LAFORENZA, U. **Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), v. 224, n. 4, p. 246–55, set. 2000.

ROGER, F. B. **Pathophysiology of Cerebellar Dysfunction in the Wernicke-Korsakoff Syndrome.** Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques, v. 20, n. S3, p. S123–S126, 2016.

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

SCHALLER, K. L.; CALDWELL, J. H. **Expression and distribution of voltage-gated sodium channels in the cerebellum.** Cerebellum., p. 2–9, 2003.

SCHMOLESKY, M. T. et al. **The making of a complex spike: Ionic composition and plasticity.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 978, p. 359–390, 2002.

SCHOFFENIELS, E.; DANDRIFOSSE, G.; BETTENDORFF, L. **Phosphate Derivatives of Thiamine and Na⁺ Channel in Conducting Membranes.** p. 269–271, 1984.

SNOW, W. M.; ANDERSON, J. E.; FRY, M. **Regional and genotypic differences in intrinsic electrophysiological properties of cerebellar Purkinje neurons from wild-type and dystrophin-deficient mdx mice.** Neurobiology of Learning and Memory, v. 107, p. 19–31, 2014.

TRETTNER, L.; ADAM-VIZI, V. **Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: A target and generator of oxidative stress.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 360, n. 1464, p. 2335–2345, 2005.

VETRENO, R. P. et al. **Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff syndrome.** Brain Research, v. 1436, n. June 2018, p. 178–192, 2012.

VIGIL, F. A. B. et al. **Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats.** Behavioural Brain Research, v. 210, n. 1, p. 140–142, 2010.

WATANABE, I. **Pyriithiamine-induced acute thiamine-deficient encephalopathy in the mouse.** Experimental and Molecular Pathology, v. 28, n. 3, p. 381–394, 1978.

WOMACK, M. D. et al. **Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia.** v. 9, n. 3, p. 389–397, 2006.

XU, G.-Y. et al. **Enhanced excitability and suppression of A-type K⁺ current of pancreas-specific afferent neurons in a rat model of chronic pancreatitis.** American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 291, n. 3, p. G424–G431, 2006.

ZHANG, S.; HENDERSON, S.; CORSO, T. **Excitotoxic Cytopathology, Progression, and Reversibility of Thiamine Deficiency-induced Diencephalic Lesions.** J Neuropathology and experimental Neurology, v. 54(2), p. 255–67, 1995.