



UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Déficit cognitivo espacial está relacionado com alteração na concentração do Canal Aniônico Dependente de Voltagem no tálamo de ratos deficientes em tiamina

Kenia de Oliveira Bueno

Belo Horizonte
2015



Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Kenia de Oliveira Bueno

Déficit cognitivo espacial está relacionado com alteração na concentração
do Canal Aniônico Dependente de Voltagem no tálamo de ratos
deficientes em tiamina

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutora em Neurociências

Orientadora: Prof.^a Dra. Angela Maria Ribeiro

Belo Horizonte
2015

043 Bueno, Kenia de Oliveira.
Déficit cognitivo espacial está relacionado com alteração na concentração do canal aniônico dependente de voltagem no tálamo de ratos deficientes em tiamina [manuscrito] / Kenia de Oliveira Bueno. – 2015.

113 f.; il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Angela Maria Ribeiro.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Deficiência de vitamina B1 - Teses. 2. Tálamo - Teses. 3. Aprendizagem espacial. 4. Neurodegeneração. 5. Wernicke - Korsakoff, Síndrome de - Teses. 6. Canal aniônico dependente de voltagem. 7. Neurociências – Teses. I. Ribeiro, Angela Maria. 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

Déficit cognitivo espacial está relacionado com alteração na concentração do Canal Aniônico Dependente de Voltagem no tálamo de ratos deficientes em tiamina

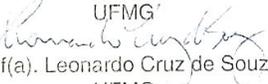
KENIA DE OLIVEIRA BUENO

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

Aprovada em 18 de setembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Angela Maria Ribeiro - Orientador
UFMG


Prof(a). Paulo Caramelli
UFMG


Prof(a). Leonardo Cruz de Souza
UFMG


Prof(a). Daniel Moreira Santos
UFMG


Prof(a). Patricia Martins Freitas
UFBA


Prof(a). Fernando Machado Vilhena Dias
UFOP

Belo Horizonte, 18 de setembro de 2015.

Agradecimentos

À Deus, meu reconhecimento de que sem o Senhor teria sido muito difícil.

À minha orientadora, Dra. Angela Maria Ribeiro, pela forma acolhedora com que me recebeu no laboratório. Através do nosso convívio aperfeiçoei minha forma de lidar com a vida acadêmica. Sua acessibilidade me permitiu compartilhar com você minhas dificuldades e vivências.

Aos meus Amigos do Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular, pelo trabalho em equipe que me fez amadurecer e crescer profissionalmente.

Aos Colegas do ICB, que me receberam em seus laboratórios para realizar partes dos experimentos. O auxílio de vocês foi muito importante.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Neurociências, pela convivência e pelo conhecimento compartilhado.

À Dra. Leonor Bezerra Guerra, pela convivência e ensinamentos durante o estágio docente em Neuroanatomia.

À CAPES, pela bolsa CAPES/REUNI que além de me auxiliar financeiramente, me permitiu ter um contato amplo com a docência na disciplina de Neuroanatomia.

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

Aos Colegas do Instituto Multidisciplinar em Saúde/ Campus Anísio Teixeira/ UFBA, pelo afastamento das atividades acadêmicas para que eu pudesse me dedicar integralmente ao doutorado. Em especial, agradeço à Gilvanéia Silva Santos e ao Robson Amaro Augusto Silva que me substituíram em sala de aula para que o meu afastamento fosse possível.

À minha família, por ter me apoiado e assumido os cuidados com Thales em muitos momentos.

À minha mãe, Cleusa de Oliveira Bueno, por ter me amparado durante todo o tempo, em diferentes aspectos da minha vida.

Ao Thales Bueno Sathler, meu amado filho, por todo amor e carinho que me faz sentir feliz independente das situações que atravesso.

Sumário

Lista de Tabelas, figuras e quadros.....	ix
Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
Dados parciais apresentados em encontros científicos.....	xvii
INTRODUÇÃO CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	18
INTRODUÇÃO REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
OBJETIVOS.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS.....	65
DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXO.....	106

Listas de figuras, tabelas e quadros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil proteômico do tálamo de ratos Wistar.....	20
Figura 2. Imagem tridimensional gerada pelo programa <i>Image MasterTM 2D Platinumv. 6.0</i> das proteínas do tálamo.....	21
Figura 3. Gráficos de dispersão mostrando a correlação entre o volume relativo de cada proteína e a latência para encontrar a plataforma na terceira sessão do Labirinto Aquático de Morris.....	22
Figura 4. Esquema indicando a Via das Pentoses e do Ciclo de Krebs.....	25
Figura 5. Classificação dos sistemas de memória.....	33
Figura 6. Desenho esquemático da sala de teste contendo o Labirinto Aquático de Morris.....	36
Figura 7. Representação esquemático da disposição espacial dos grupos nucleares do tálamo.....	40
Figura 8. Esquema das principais vias que permitem a codificação da informação episódica e fundamentam os aspectos subjacentes da recordação.....	42
Figura 9. Etapas de processamento do espectrômetro de massa.....	46
Figura 10. Modelos propostos para o papel de VDAC na mitocôndria.....	77
Figura 11. Modelo para sinais apoptóticos que induzem oligomerização de VDAC1 com liberação de Citocromo C.....	78
Figura 12. Delineamento experimental.....	52
Figura 13. Foto da sala onde foram realizados os testes do Labirinto Aquático de Morris.....	54
Figura 14. Imagem mostrando um rato sobre a plataforma submersa Após encontrá-la ou ser conduzido a ela.....	55
Figura 15. Esquema mostrando o LAM e o desempenho do animal no LAM.....	56
Figura 16. Esquema apresentando as etapas para separação de uma mistura de proteínas por Eletroforese Bidimensional.....	58
Figura 17. Curvas de aquisição da tarefa no Labirinto Aquático de Morris. Expressão dos dados em Latência.....	65

Listas de figuras, tabelas e quadros

Figura 18. Imagem do gel 2-DE retratando o perfil de proteínas do tálamo....	66
Figura 19. Espectrogramas gerados pelo <i>MALDI / TOF-TOF</i> da proteína correspondente ao <i>spot</i> 8105.....	68
Figura 20. Imagem da captura de tela (<i>print screen</i>) da página de acesso ao <i>MASCOT</i>	69
Figura 21. Histograma do nível de significância do resultado do <i>peptide mass fingerprint</i> obtido no <i>MASCOT</i> do <i>Spot</i> 8105.....	70
Figura 22. Imagem representativa da análise por <i>Western Blot</i>	72
Figura 23. Resumo gráfico dos métodos e resultados obtidos.....	73
Figura 24. Figura esquemática do processo de ubiquitização de proteínas.....	88

Listas de figuras, tabelas e quadros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da ração produzida no laboratório.....	52
Tabela 2. Composição da mistura de sais da ração produzida no laboratório.....	53
Tabela 3. Composição da mistura de vitaminas da ração padrão produzida no laboratório.....	53
Tabela 4. Comparação dos níveis de RNAm entre os grupos experimentais.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição dos parâmetros referentes à proteína identificada (<i>MASCOT</i>) (<i>Spot</i> 8105) submetido à análise por <i>MALDI-TOF-TOF</i> . Proteína VDAC1.....	30
Quadro 2. Avaliação dos pares de iniciadores através do programa NetPrimer.....	62
Quadro 3: Descrição dos parâmetros referentes à identificação da proteína, <i>spot</i> 8105, submetido à análise por <i>MALDI-TOF-TOF</i> e <i>Mascot</i> . Proteína VDAC1.....	71

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA - Análise de Variância

ANT- Transportador de nucleotídeos adenina (*Adenine Nucleotide Translocator*)

ATP - Adenosina trifosfato (*Adenosine TriPhosphate*)

cm - Centímetros

C7BzO - Heptil fenil hidroxipropil dimetilamoniopropanosulfonato

CHAPS - Colamidopropil dimetilamonio propanosulfonato (3-[3-

CHolAmidoPropyldimethylammonio]-1-propaneSulfonate)

DNAc - DNA complementar

DT - Deficiente em tiamina

DTT - DiTioTreitol

ECL - Revelador: acentuador de quimioluminescência (*enhanced chemiluminescence*)

EW- Encefalopatia de Wernicke

IEF- Focalização Isoelétrica (*Isoelectric Focusing*)

g - Gramas

GABA - Ácido γ -aminobutírico (*Gamma Amino Butyric Acid*)

IPG - Gradiente de pH imobilizado (*Immobilized pH Gradient*)

K - Kilo

L - Litro

LAM - Labirinto Aquático de Morris

m - Massa

m - Mili

m - Metro

M - Molar

mg - miligrama

MALDI - Dessorção/ionização de Matriz Assistida por Laser (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

mM - Milimolar

MS - Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry*)

MVH - MiliVolts/Hora

NE - Nordeste

NL - Não linear

nm - Nanômetros

Abreviaturas e símbolos

NTA - Núcleo Talâmico Anterior

NW - Noroeste

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PDH - Piruvato desidrogenase (*Pyruvate DeHydrogenase*)

PMF - Impressão digital de massa da proteína/peptídeo (*Peptide/protein Mass Fingerprinting*)

PTD - Deficiência em tiamina induzida por Pirritiamina (*Inibidor da pirofosfocinase*)

PTP - Poro de Transição de Permeabilidade (*Permeability Transition Pore*)

p/v - peso/volume

RNA_m - Ácido Ribonucléico Mensageiro (*mRNA - Ribonucleic Acid Messenger*)

SDS - Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-PAGE - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) (*Sodium Dodecyl Sulfate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SE - Sudeste

SK - Síndrome de Korsakoff

SPSS - Programa estatístico para Ciências Sociais (*Statistical Package for the Social Sciences*)

SW-Sudoeste

SWK- Síndrome de Wernicke Korsakoff

TBS - Solução Salina Tamponada com Tris (*Tris-Buffered Saline*)

TDP - Tiamina Difosfato

MT - Temperatura de dissociação (*Melting Temperature*)

TMP- Tiamina Monofosfato (*Thiamine MonoPhosphate*)

TOF - Tempo de voo (*Time-of-Flight*)

TPP- Tiamina Pirofosfato (*Thiamine PyroPhosphate*)

TTP - Tiamina Trifosfato (*Thiamine TriPhosphate*)

V - Volts

VDAC - Canal Aniônico Voltagem Dependente (*Voltage-Dependent Anion Channel*)

v/v - Volume por volume

z - Carga

α -KGDH - Alfa-cetoglutarato desidrogenase (*Alpha-KetoGlutarate DeHydrogenase*)

μ - Micro

μ g - Microgramas

Abreviaturas e símbolos

μL - Microlitros

2-DE - Eletroforese Bidimensional (*Two-Dimensional Electrophoresis*)

°C - Graus Celsius

RESUMO

A deficiência em tiamina resulta em disfunções bioquímicas que podem culminar com a morte de neurônios, caracterizando um processo de neurodegeneração, como por exemplo, acontece na Síndrome de Wernicke - Korsakoff. A tiamina, ou vitamina B1, após ser captada pelos tecidos, pode ser fosforilada dando origem às diferentes formas, entre elas, a tiamina pirofosfato (TPP), que atua como cofator de enzimas chaves no metabolismo energético celular. A deficiência em tiamina leva a perdas celulares em várias regiões do encéfalo, sendo o tálamo e corpos mamilares as regiões mais afetadas. Tanto em modelos experimentais como em seres humanos, episódios de deficiência em tiamina causam, entre outros efeitos, hipoatividade motora e prejuízos cognitivos. Vários aspectos comportamentais e neurobiológicos têm sido estudados em condições de deficiência em tiamina. Entretanto, a participação de proteínas específicas nos mecanismos moleculares responsáveis por lesões cerebrais e que podem, como consequência, gerar alterações cognitivas, continua obscura. O presente estudo teve como objetivos: (i) identificar e caracterizar proteínas que têm suas expressões alteradas no tálamo de ratos com deficiência grave de tiamina (ii) avaliar as relações entre as alterações proteicas e o desempenho de ratos em tarefa de aprendizagem espacial. Para isso, foi utilizado o modelo experimental de deficiência em tiamina na dieta associada à piritiamina (PTD – Deficiência em tiamina induzida por piritiamina) em ratos. A piritiamina é um inibidor da cinase que produz TPP a partir de tiamina). O desempenho dos animais em tarefas de navegação espacial foi avaliado em Labirinto Aquático de Morris (LAM). O perfil proteômico do tálamo foi analisado qualitativamente e quantitativamente, após separação das proteínas por eletroforese bidimensional. Esta detectou 320 *spots* e um significativo aumento ou diminuição de sete proteínas. Quatro destas proteínas estavam correlacionadas ao desempenho do rato no LAM. Uma das quatro proteínas que sofreram alterações significativas, relacionadas com o desempenho cognitivo, foi identificada por espectrometria de massa e seu respectivo RNAm quantificado por *PCR* (Reação em cadeia da polimerase/*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real. Além disto, foi incluso na análise ensaios imunoquímicos, usando a técnica de *Western Blot*. Em estudo prévio em nosso laboratório, foi encontrada correlação negativa ($r = -0,83$, $p = 0,009$) entre o volume relativo de uma das proteínas talâmicas e a latência na terceira sessão do treino no LAM. No presente estudo, mostramos que esta proteína corresponde ao Canal Aniônico Voltagem Dependente (VDAC= *Voltage Dependent Anion Channel*). A proteína VDAC

também é conhecida como porina mitocondrial, um grande canal permeável a ânions, a cátions, a ATP, e a outros metabólitos. VDAC possui várias isoformas, sendo as mais estudadas, a VDAC1, a VDAC2 e a VDAC3. A avaliação por *PCR* em tempo real não detectou efeito da deficiência em tiamina sobre os níveis de RNAm dos genes *Vdac1*, *Vdac2* e *Vdac3*, indicando que a diminuição da expressão de VDAC pode estar relacionada a processos pós-transcricionais. Os dados sugerem que o processo de neurodegeneração induzido por deficiência em tiamina envolve diminuição nos níveis proteicos de VDAC no tálamo, os quais se relacionam com o comportamento do animal, na sessão que o mesmo apresenta pior desempenho na tarefa cognitiva no LAM. Esses dados indicam que esta proteína pode fazer parte, como componente molecular importante, no mecanismo neurobiológico associado à etapa inicial do processo de aprendizagem espacial.

ABSTRACT

Thiamine deficiency (TD) results in biochemical dysfunction that can culminate with the death of neurons, characterizing the process of neurodegeneration, such as occur in Wernicke-Korsakoff's syndrome. Thiamine or vitamin B1, after being captured by the tissues, can be phosphorylated giving rise to different forms including, thiamine pyrophosphate (TPP) which acts as a cofactor of key enzymes in cellular energy metabolism. TD leads to cell loss in various regions of the brain, being the thalamus and mammillary bodies the most affected areas. In both experimental models and in humans, episodes of TD causing, among other effects, motor hypoactivity and cognitive impairments. Various behavioral and neurobiological aspects have been studied in conditions of TD. However, the involvement of specific proteins in the molecular mechanisms responsible for brain damage and which may, as a consequence, generate cognitive alterations remains unclear. The present study aims to: (i) identify and characterize proteins that have altered their expression in the thalamus of rats with severe TD (ii) evaluate the relationship between proteic changes and performance of rats in spatial learning task. The experimental model of TD in diet associated with pyrithiamine (PTD, kinase inhibitor that produces TPP from thiamine) in rats was used. The animals' performance on tasks of spatial navigation was assessed in the Morris Water Maze (MWM). The proteomic profile of the thalamus was analyzed qualitatively and quantitatively by two-dimensional electrophoresis. This detected 320 spots and a significant increase or decrease in seven proteins. Four proteins were correlated to rat behavioral performance in the Morris Water Maze.

*One of the proteins that have undergone significant changes was identified by mass spectrometry and their respective mRNAs were quantified by real time PCR. Furthermore, the analysis includes immunochemical assays, using the Western Blot. In a previous study in our laboratory, negative correlation ($r = -0.83$, $p = 0.009$) was found between the relative volume of one thalamic protein and latency in the third training session. In the present study, the data confirmed that this protein corresponds to the Voltage Dependent Anion Channel (VDAC). VDAC is also known as mitochondrial porin, a channel permeable to anions, cations, ATP, and other metabolites. VDAC has several isoforms, being the most studied VDAC1, VDAC2 and VDAC3. The evaluation by real-time PCR showed no effects of TD on the levels of mRNAs of genes *Vdac1*, *Vdac2* and *Vdac3*, indicating that the decrease in VDAC expression may be due to post-transcriptional*

processes. The data suggest that the process of neurodegeneration induced by TD involves serious decrease in VDAC proteic levels in the thalamus, indicating that this protein might play an important role in the initial stage of the spatial learning process.

DADOS PARCIAIS OBTIDOS NO PRESENTE ESTUDO E APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1) **Kenia O. Bueno**, Letícia S. Resende, Evonnildo C. Gonçalves, Fábio A. B. Vigil, Ieda F. Oliveira Silva, Lívia F. Ferreira, Adriano A. M. Pimenta, Angela M. Ribeiro. Spatial cognitive deficits in animal model of Wernicke Korsakoff Syndrome are related to changes in thalamic protein concentrations.

Encontro Científico Local – In: VI Enapebi - Ciência sem Fronteiras- Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia - ICB/UFMG, Belo Horizonte. 2012.

2) **Kenia O. Bueno**, Letícia S. Resende, Daniel M. Santos, Evonnildo C. Gonçalves, Fábio A. B. Vigil, Ieda F. Oliveira Silva, Lívia F. Ferreira, Adriano A. M. Pimenta, Angela M. Ribeiro. Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke Korsakoff Syndrome are related to changes in the thalamic Voltage Dependent Anion Channel 1 concentrations.

Encontro Científico Nacional e Internacional- In: Anais do XXXVII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e VII Simpósio Internacional de Neurociências da UFMG. 2013. Belo Horizonte. MG.

3) **Kenia O. Bueno**, Leticia S. Resende, Andrea F. Ribeiro, Daniel M. Santos, Evonnildo C. Gonçalves, Fabio A.B. Vigil, Ieda F. Oliveira Silva, Livia F. Ferreira, Adriano M.C. Pimenta, Angela Maria Ribeiro. Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke Korsakoff Syndrome are related to changes in the thalamic Voltage Dependent Anion Channel concentrations.

Encontro Científico Nacional – In: Anais do XXXVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências realizada em 10 a 13 de setembro de 2014 em Búzios, Rio de Janeiro.

REFERENCIA DO ARTIGO ORIGINAL COM OS DADOS OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO, PUBLICADO EM PERIÓDICO

Bueno KO, de Souza Resende L, Ribeiro AF, Dos Santos DM, Gonçalves EC, Vigil FA, de Oliveira Silva IF, Ferreira LF, de Castro Pimenta AM, Ribeiro AM. Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome are related to changes in thalamic VDAC protein concentrations. **Neuroscience**. 2015 Mar 9. pii: S0306-4522(15)00212-2. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.001.

INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS – ANTECEDENTES CIENTÍFICOS CENTRAIS

A tiamina é um importante co-fator da enzima piruvato desidrogenase e alfa-cetoglutarato desidrogenase, envolvida no metabolismo de carboidratos e da transcetolase, uma enzima importante da via das pentoses (Bettendorff e Wins, 2013). Considera-se que a deficiência em tiamina leva à diminuição do metabolismo oxidativo, o que, eventualmente, provoca a morte neuronal, uma vez que o cérebro depende fortemente deste para a síntese de ATP (Victor et al., 1971). Entretanto, a razão pela qual algumas regiões do encéfalo serem mais sensíveis à deficiência em tiamina, comparadas com outras regiões cerebrais, permanece pouco esclarecida (Hazell et al., 2013). Em seres humanos, a deficiência em tiamina pode resultar em doenças nas quais os indivíduos apresentam sintomas de déficits cognitivos, como por exemplo, na Síndrome de Wernicke (Navarro et al., 2005).

Para verificar as relações entre disfunções neurobiológicas e aspectos comportamentais, principalmente aqueles relacionados aos distúrbios cognitivos, nosso grupo de pesquisa tem estudado a deficiência em tiamina em modelos experimentais, utilizando roedores, através da administração de uma dieta alimentar deficiente desta vitamina associada ou não ao consumo de etanol, ou associada à inibidores de enzimas responsáveis pela produção da forma ativa da tiamina (piritiamina) (Pires et al., 2001, 2005; Pinto et al., 2006; Carvalho et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Freitas-Silva et al., 2010; Vigil et al., 2010; Resende et al., 2012). Esse modelo tem se mostrado bastante útil nos estudos de mecanismos relacionados à neurodegeneração e também em investigações das bases neurobiológicas de aspectos comportamentais.

Estudos iniciais sobre a deficiência em tiamina em ratos adultos, mostraram que a deficiência em tiamina associada ao consumo de etanol crônico causa prejuízos nos aspectos cognitivos (aprendizagem e memória) e os efeitos nesses processos se correlacionam de forma significativa com a diminuição da liberação de acetilcolina no córtex cerebral. Efeitos distintos desses dois tratamentos – consumo crônico de etanol e deficiência em tiamina - também foram observados sobre as atividades da acetilcolinesterase no neocórtex e hipocampo (Pires et al., 2001, 2005). Ainda foi verificado que a deficiência em tiamina altera a atividade do sistema glutamatérgico no córtex pré-frontal (CPF) e induz um prejuízo no processo de extinção de um

comportamento, em animais submetidos a tarefas cognitivas espaciais (Carvalho et al., 2006; Pires et al., 2005). Esse efeito sobre aspectos cognitivos estava relacionado com o nível de fosforilação de uma proteína, p86, no hipocampo (Pires et al., 2007). Em estudo posterior, foi confirmado que a proteína p86 é uma proteína envolvida com a liberação de neurotransmissores, denominada Sinapsina I (Resende et al., 2012).

Os achados de que a deficiência em tiamina causa disfunções nos processos de liberação de neurotransmissores e afeta proteínas que fazem parte do mecanismo de excitação, nos motivou a estudar a relação entre a expressão de proteínas no tálamo e aspectos comportamentais. Para o presente estudo o tálamo foi escolhido por ser uma das regiões cerebrais mais afetadas pela deficiência em tiamina (Butterworth, 2003) e porque a identificação de alterações na expressão de proteínas nessa região pode contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela neurodegeneração. O estudo foi iniciado pela doutora Letícia Resende, durante a fase final do seu doutorado, que teve como objetivos: (i) avaliar o desempenho cognitivo em tarefa de navegação espacial, (ii) verificar os efeitos da deficiência em tiamina grave sobre o perfil proteômico do tálamo, (iii) avaliar a correlação entre o desempenho do rato na tarefa de aprendizagem espacial e (iv) alterações dos níveis de proteínas no tálamo.

Os fenômenos abordados na maioria dos estudos realizados no nosso laboratório são os processos de aprendizagem e de memória espacial. Desta forma, a medida quantitativa do desempenho dos animais em uma tarefa de navegação espacial tem sido rotina no LaNeC. Embora os animais DT demonstrem desempenho mais lento na aquisição do que os ratos controles, esses são capazes de aprender a tarefa, de forma que nas últimas sessões não existe diferença significativa no desempenho dos animais dos dois grupos. No entanto, um fato que nos chama atenção é que parece existir uma fase crítica do processo, nas primeiras sessões do treino, em que os animais de forma consistente apresentam um pior desempenho, na 3^a. e 4^a. sessões.

O perfil e as alterações em proteínas do tálamo foram estudados através de técnicas proteômicas. Estas permitem a detecção de uma variedade de proteínas expressas diferencialmente em amostras obtidas a partir de vários tipos de tecidos (Verrills, 2006). Os dados do proteoma talâmico, obtidos previamente pelo LaNeC, revelaram 320 *spots* nas condições utilizadas, tanto para as amostras obtidas dos animais deficientes de tiamina (DT), como para os animais controles. Isso significa que não houve diferença entre os números de proteínas expressas no tálamo de animais do grupo controle e DT (Figura 1).

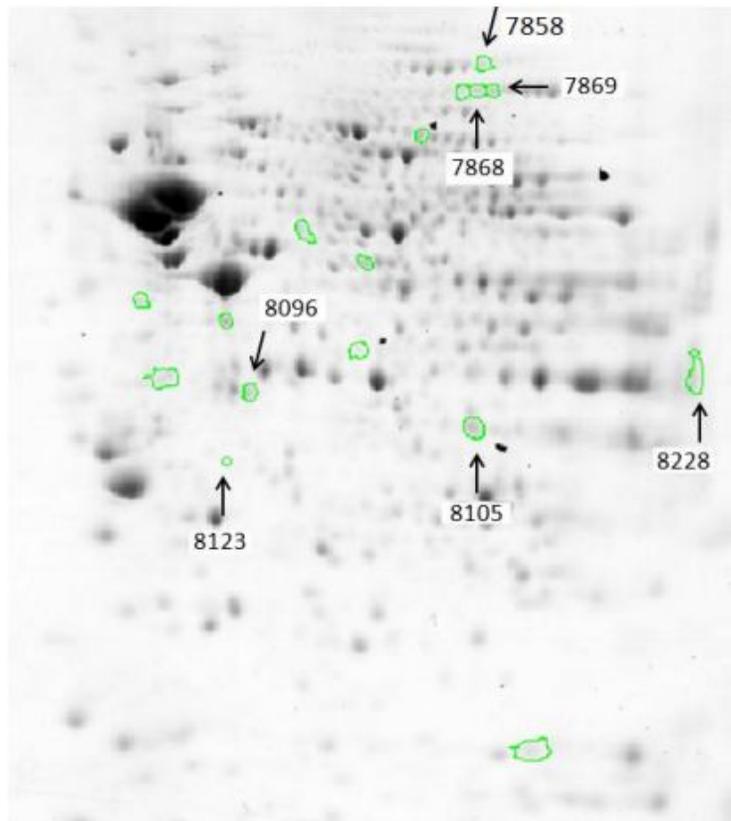


Figura 1. Perfil Protômico do tálamo de ratos Wistar. Spots circundados indicam proteínas expressas de forma significativamente diferente entre os grupos DT e controle ($p \leq 0.05$, unilateral). Setas indicam as sete proteínas com expressão significativamente diferente, $p < 0,05$, quando o teste *t student* é bilateral. (Resende, 2012).

Dessas 320 proteínas, sete apresentaram diferenças nos níveis de concentrações, quando se compara as condições controle e DT. Dentre as sete, três tiveram seus níveis aumentados e quatro delas apresentaram níveis diminuídos (Figura 2).

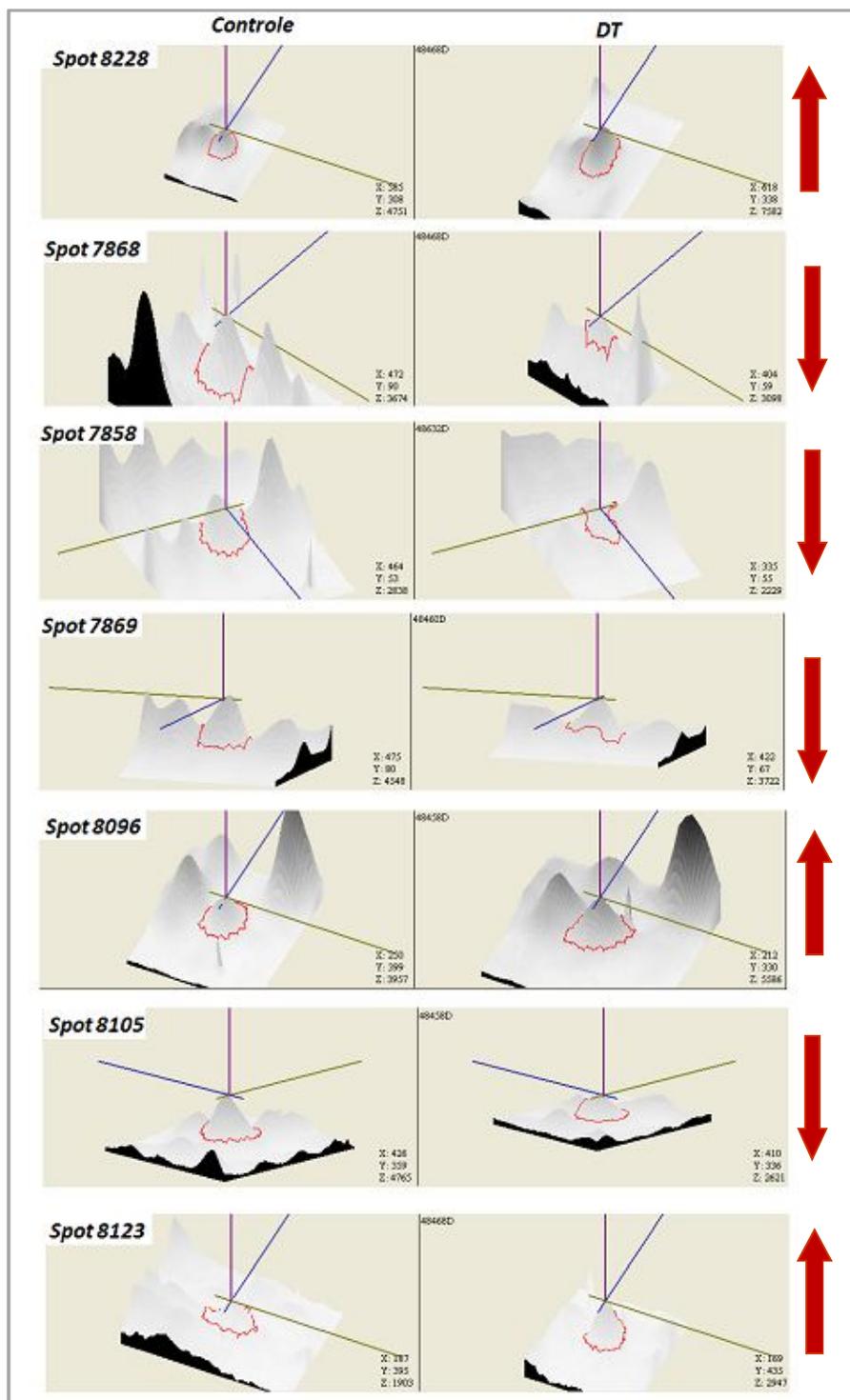


Figura 2. Imagem tridimensional gerada pelo programa Image Master™2D Platinum v. 6.0 das sete proteínas do tálamo, com níveis de concentrações diferentes quando se compara as condições controle (coluna à esquerda) e deficiente em tiamina (DT: coluna à direita). A deficiência em tiamina teve efeito significativo ($p < 0,05$, bilateral), sendo que quatro proteínas os níveis foram reduzidos (*spots* 7868, 7858, 7869, 8105) e três aumentados (*spots* 8228, 8096, 8123) em relação aos controles. (Resende, 2012).

Introdução – Considerações iniciais

Os resultados das análises das relações entre o desempenho dos animais na tarefa do Labirinto Aquático de Morris (LAM) e os níveis de cada uma das sete proteínas talâmicas alteradas indicaram que, quatro das proteínas tiveram seus níveis de expressão correlacionados com a latência para encontrar a plataforma na terceira sessão do LAM (Figura 3), a sessão em que os animais apresentaram o pior desempenho durante o processo de aprendizagem. Foi encontrada correlação negativa entre o volume relativo dos spots 7868 ($r = -0,77$, $p = 0,02$), 7869 ($r = -0,86$, $p = 0,005$) e 8105 ($r = -0,83$, $p = 0,009$) e latência na terceira sessão. Por outro lado, os níveis da proteína 8096 foram positivamente correlacionados com a latência na terceira sessão ($r = 0,90$, $p = 0,002$). Nenhuma correlação significativa foi encontrada para as outras três proteínas (*spots* 7858, 8123 e 8228).

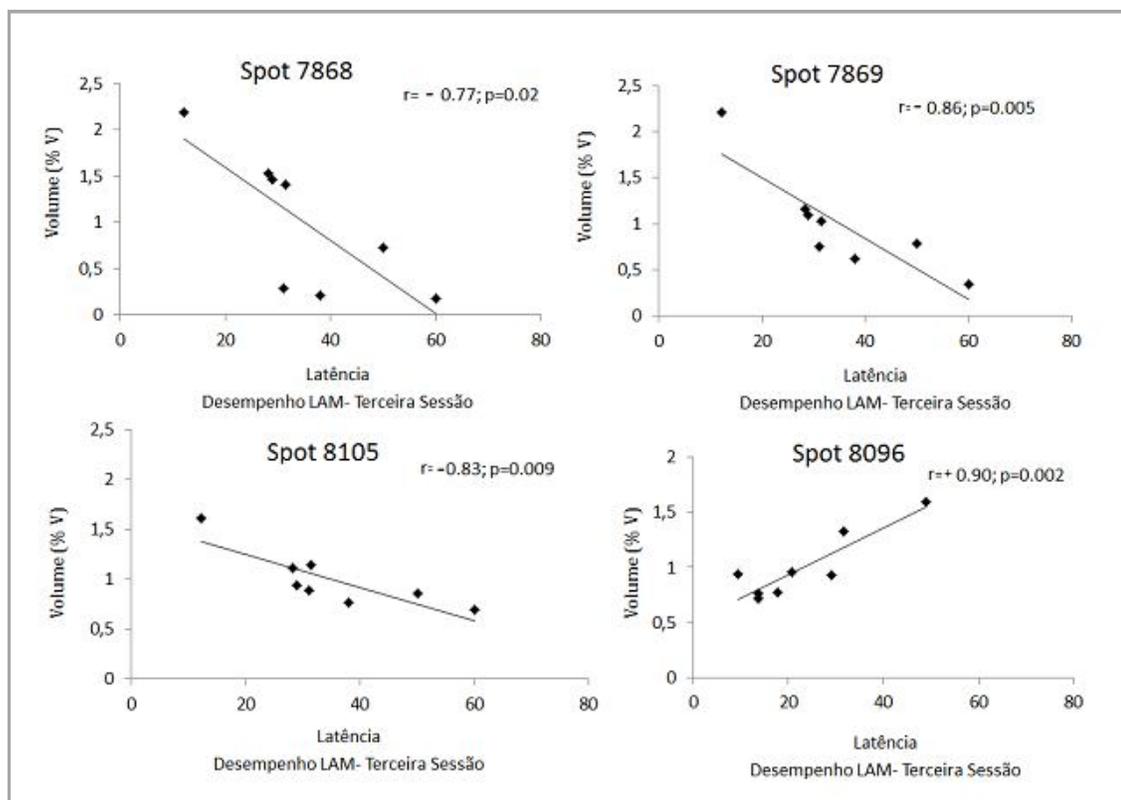


Figura 3. Gráficos de dispersão mostrando a correlação entre o volume relativo de cada proteína (*spots* 7868, 7869, 8105, 8096) e a latência para encontrar a plataforma na terceira sessão do LAM. Em cada painel estão apresentados os valores de R e “p”. (Resende, 2012).

Os dados apresentados no presente trabalho representam uma continuidade dos estudos prévios mencionados. Primeiramente, reproduzimos e complementamos os dados obtidos, referentes aos experimentos comportamentais e bioquímicos. Posteriormente, executamos a identificação e a caracterização de uma das quatro proteínas alteradas pela

deficiência em tiamina, cujos níveis talâmicos se apresentaram relacionados com o déficit cognitivo espacial.

A identificação e a caracterização das proteínas alteradas nos permitem aprofundar no entendimento das relações funcionais destas proteínas com os resultados obtidos no LAM. Além disto, as informações adicionais nos permitem formular hipóteses sobre os mecanismos moleculares associados às lesões causadas pela deficiência em tiamina. A possibilidade de se compreender o papel da tiamina em processos cerebrais específicos, relacionados à cognição espacial, é outra contribuição que justifica a relevância do presente estudo. Devido à associação significativa encontrada nas análises, destaca-se também a possibilidade de esclarecimento sobre as bases neurobiológicas desses processos cognitivos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TIAMINA E DEFICIÊNCIA EM TIAMINA

A tiamina ou vitamina B1 pode ser encontrada nas suas várias formas: Tiamina livre não fosforilada, Tiamina Monofosfato (TMP), Tiamina Difosfato (TDP) ou Tiamina Pirofosfato e Tiamina Trifosfato (TTP). Essas formam um conjunto de coenzimas que constituem parte do sistema de metabolismo da tiamina (Makarchikov et al., 2003).

A tiamina é sintetizada por plantas, bactérias e outros microorganismos. Os animais não podem sintetizar a tiamina e, portanto, eles devem obter esta vitamina dos alimentos (Nosaka, 2006; Rodionov et al., 2002). O fosfato de tiamina oriundo da dieta é hidrolisado por fosfatases intestinais gerando a tiamina livre (Hoyumpa, 1982) que é, então, absorvida em grande parte no duodeno (Rindi, 1984). Após essa absorção, altas concentrações de tiamina são encontradas nos músculos esqueléticos e cardíaco, no fígado, no rim e no cérebro (Singleton e Martin, 2001).

A Tiamina Pirofosfato (TPP) ou TDP, forma ativa da tiamina, é um cofator necessário em duas vias do metabolismo de carboidratos, que são a via das pentoses e o ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico). Na via das pentoses a TDP é cofator da enzima Transcetolase que participa do metabolismo da glicose e auxilia a síntese de ácidos graxos, componentes fundamentais da mielina (Figueira e Laks, 1988; Schenker et al., 1985). Na ausência de TDP a atividade do Complexo Piruvato Desidrogenase é afetada, ocorrendo um bloqueio na entrada do piruvato na fase aeróbica da rota metabólica (ciclo de Krebs) gerando dois efeitos: desvio da via aeróbica para anaeróbica, onde o piruvato é transformado em lactato, e diminuição da produção de energia (ATP), que passa a ser produzida apenas pela via glicolítica anaeróbica. O resultado é uma acentuada produção de ácido láctico no organismo e a deficiência da produção de ATP. O ciclo de Krebs é uma via metabólica que completa a degradação oxidativa da glicose, dos ácidos graxos e dos aminoácidos. Este ciclo ocorre nas mitocôndrias das células que utilizam oxigênio. A figura 4 mostra a participação da TDP na reação que produz acetil-CoA, a partir do piruvato, e no Ciclo de Krebs. Neste ciclo, existem duas principais enzimas, a Piruvato desidrogenase (PDH) e a Alfa-ceto-glutarato desidrogenase (α -KGDH) que requerem TDP como um cofator. A principal função do Ciclo do ácido cítrico é a produção de energia para vários processos e reações celulares (Butterworth, 2006).

As enzimas dependentes de tiamina, além de serem importantes para a manutenção do metabolismo energético da célula, também atuam de forma indireta na síntese de lipídeos e nucleotídeos (Berg et al., 2002). No sistema nervoso central, além da participação da tiamina no metabolismo de carboidratos (Bâ, 2008; Navarro et al., 2008) e na síntese de neurotransmissores (Anzalone et al., 2010), diversos trabalhos têm sugerido outros papéis para a tiamina. Essas funções são: alterações da permeabilidade do canal de sódio durante condução nervosa (Goldberg et al., 1975) e participação em vias de transdução de sinais (Czerniecki et al., 2004). A tiamina também exerce ação protetora contra substâncias citotóxicas como o acetaldeído (Aberle et al., 2004) e ação protetora contra a fluidez da membrana induzida pelo etanol, desempenhando desta forma, um papel importante na regulação da estabilidade da membrana (Bâ et al., 1996). Oliveira et al., (2007) demonstraram a participação de B1 na modulação de canais de K^+ voltagem dependente. O aumento do conteúdo desta vitamina durante a sinaptogênese demonstra o envolvimento da tiamina na condução nervosa (Ramakrishna, 1999).

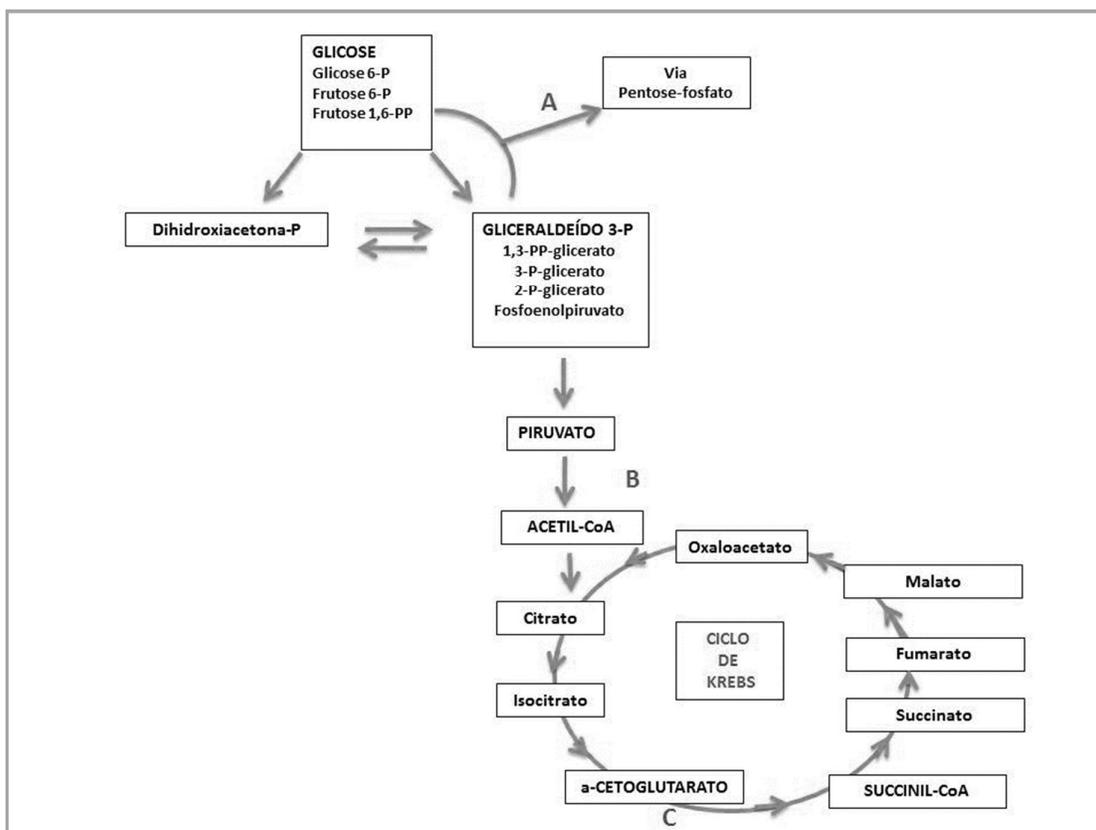


Figura 4. Esquema indicando a via das pentoses e do Ciclo de Krebs. As letras A, B e C indicam as reações onde participam as enzimas dependentes da TPP: A. Transketolase. B. Pyruvate dehydrogenase. C. α -Ketoglutarate dehydrogenase. Fonte. Beltramo et al., 2008.

A deficiência em tiamina pode resultar de condições que restringem a alimentação como na presença de câncer orofacial, de inanição por escolha ou associada à sepse, de complicações cirúrgicas e de coma (Martin et al., 1986; Sechi et al., 2002). A absorção inadequada de B1 que ocorre devido ao alcoolismo, à cirurgia gástrica (Worden e Allen, 2006) e ao câncer de cólon pode também levar a um quadro de deficiência em tiamina. Outras situações envolvem o período da gravidez e amamentação por causa do aumento da demanda de B1 e por causa da hiperêmese (WHO, 1999). Devido a importância da tiamina no organismo, uma redução na sua concentração tecidual pode interferir em numerosos mecanismos celulares desencadeando a neurodegeneração e prejudicando as funções cerebrais (Martin et al., 2003). Na literatura há relatos de morte celular no hipocampo, cerebelo, amígdala, tálamo, colículo inferior e complexo olivar superior (Irle e Markowitsch, 1983; Vortmeyer e Colmant, 1988), além de degeneração de axônios do córtex, extensa perda neuronal e gliose dentro do tálamo medial e corpo mamilar (Langlais e Zhang, 1997). Matsushima et al. (1997) identificaram a ocorrência de morte celular por apoptose no tálamo, umas das áreas cerebrais mais afetadas em ratos e seres humanos DT.

Os mecanismos pelos quais a privação de tiamina provoca neurodegeneração são múltiplos. A morte neuronal pode estar relacionada ao estresse oxidativo gerado por danos mitocondriais (Park et al., 2000) ou por altas taxas de metabolismo oxidativo (Pannunzio et al., 2000). Há associação da diminuição da atividade das enzimas α -cetoglutarato desidrogenase, piruvato desidrogenase e transcetolase com a redução do ATP celular, com o acúmulo de lactato e com a acidose celular (Hakim, 1984). Outro mecanismo envolve a redução da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase que gera um aumento na concentração do glutamato extracelular e induz a excitotoxicidade (Hazell et al., 1993; Hazell e Butterworth, 2009). Os processos apoptóticos desencadeados pelo íon cálcio são outros fatores associados à morte celular (Munujos et al., 1993; Hazell et al., 1998).

Apesar de muitos trabalhos abordarem o mecanismo da neurodegeneração resultante da deficiência em tiamina, ainda é necessário esclarecer os eventos associados à susceptibilidade do tálamo, e demais regiões cerebrais, à morte neuronal decorrente restrição desta vitamina. A morte neuronal, em regiões específicas do cérebro de roedores DT, tem sido associada ao processo inflamatório devido à presença de microglia ativada (Ke e Gibson, 2004), da indução da óxido nítrico sintase endotelial, de alterações na barreira hemato-encefálica e do acúmulo microglial de ferro e ferritina (Calingasan et al., 1998). A expressão alterada de ferritina está associada a um maior dano oxidativo na patogênese da deficiência em tiamina, pois a síntese de ferritina pode ser induzida por dano

oxidativo após hipóxia (Qi et al., 1995). Essa reação inflamatória no tecido nervoso gera lesões no hipocampo, no cerebelo, na amígdala, no tálamo, no colículo inferior e no complexo olivar superior (Irle e Markowitsch, 1983). É provável que a vulnerabilidade seletiva para a deficiência em tiamina em algumas regiões cerebrais seja o resultado de uma interação complexa entre as propriedades neuroquímicas, celulares e metabólicas próprias destas regiões (Witt, 1985).

Os sintomas gerados pelo dano cerebral na deficiência em tiamina podem ser vagos e inespecíficos, o que torna o diagnóstico clínico precoce da doença uma tarefa difícil. Os sintomas iniciais observados são dores de cabeça, fadiga, irritabilidade, desconforto abdominal, e em crianças, declínio na taxa de crescimento (Shikata et al., 2000). Quando a condição é aguda com comprometimento cerebral, ou seja, já está estabelecida a Encefalopatia de Wernicke (EW), há risco de vida com taxa de mortalidade estimada de cerca de 20 por cento (Tallaksen et al., 1993; Cook et al., 1998). Esta condição é marcada por lesões nos núcleos periventriculares, nos núcleos hipotalâmicos, placa tectal e tálamo. O envolvimento dessas regiões resulta nos sinais cardinais da EW que formam a tríade clínica clássica: confusão mental, oftalmoplegia e ataxia (perda da coordenação motora) (Victor et al., 1989). Os movimentos oculares podem consistir em nistagmo horizontal e vertical, fraqueza ou paralisia do músculo reto lateral e do olhar conjugado. Em casos avançados, pode-se encontrar oftalmoplegia completa. A confusão mental é caracterizada por diminuição do estado de alerta e atenção e alteração senso-perceptual e da memória (Schoenenberger e Heim 1994). A EW, se não tratada, leva a uma condição mais debilitante, a Síndrome de Wernicke Korsakoff (SWK) (Zubaran et al., 1997). A EW é uma manifestação cerebral aguda da deficiência grave de tiamina e a SWK é uma consequência comum do alcoolismo crônico (Hass, 1988). Esta última se apresenta como uma amnésia e confabulação (produtos falsos da memória) (Victor et al., 1989). O quadro amnésico é descrito como falha do aprendizado, ou seja, amnésia anterógrada (falha na retenção de informações adquiridas depois de estabelecido o quadro de SWK) e como dano das memórias passadas, ou seja, amnésia retrógrada (perda de informações adquiridas antes de estabelecido o quadro de SWK). A alteração de aprendizado incapacita o paciente a viver socialmente, este executa apenas atividades simples e habituais da vida diária. A disfunção ocorre devido a uma alteração na retenção durante o aprendizado, não se trata de dano no mecanismo de recuperação (Kupfermann, 1991). As disfunções cognitivas e suas relações com alterações morfológicas e/ou neuroquímicas causadas pela deficiência em tiamina têm sido amplamente estudadas pelo nosso grupo de pesquisa (Pires et al., 2005;

Carvalho et al., 2006) e por outros pesquisadores (Mumby et al., 1999; Nakagawasai et al., 2007; Nakagawasai et al., 2007; Vetreno et al., 2008) utilizando-se modelos animais com deficiência em tiamina

MODELOS ANIMAIS DE DEFICIÊNCIA EM TIAMINA

Estudos experimentais dos efeitos da deficiência em tiamina são possibilitados pelo uso de modelos animais. Através destes modelos, é possível a aquisição de dados sobre alterações estruturais, desequilíbrios neuroquímicos e déficits cognitivos associados à doença. Ainda podem ser úteis para a compreensão do aprendizado e memória no cérebro intacto (Vetreno et al., 2012). Os modelos animais de deficiência em tiamina podem ser obtidos através de três protocolos: dieta deficiente em B1; dieta deficiente em B1 associada ao tratamento crônico com etanol e a dieta deficiente em B1 associada à administração parenteral de pirritiamina, um inibidor da pirofosfocinase, enzima responsável pela produção da forma ativa da tiamina, a TDP (Hakim e Pappius, 1983; Langlais et al., 1996), quadro 1. As alterações devido a deficiência em tiamina produzem sinais que funcionam como evidências de que os animais atingiram um estado de deficiência grave de tiamina. São eles: alopecia, hipersensibilidade a estímulos, perda do tônus muscular, ataxia, perda do apetite, perda do reflexo de endireitamento e convulsões; podendo evoluir para a morte caso o processo não seja revertido rapidamente (Mosseau et al., 1996; Ciccia e Langlais, 2000).

O uso de modelos animais da deficiência em tiamina possibilita o estudo da neurodegeneração em diferentes regiões do cérebro e as alterações cognitivas associadas. A restrição de B1 pode ocasionar alterações no aprendizado e memória espacial (Mumby et al., 1999; Pires et al., 2005; Carvalho et al., 2006). Na literatura científica, as alterações no aprendizado e na memória resultante da deficiência em tiamina estão relacionadas às lesões em estruturas diencefálicas e corticais, como tálamo e hipocampo. Além disso, há relação entre a severidade do déficit no aprendizado e memória espacial e o grau de lesão (Langlais et al., 1992; Langlais e Savage 1995, Pitkin e Savage, 2004). O hipocampo exerce função importante na formação da memória (Squire, 1992), principalmente, quando é necessário combinar e relacionar informações de várias fontes visuais na realização de tarefas que exigem memória espacial (O'Keefe e Nadel, 1971). Lesões no hipocampo interferem negativamente no desempenho de tarefas que envolvem aprendizado e memória espacial (Eichenbaum e Cohen, 2001). Ratos DT apresentam alterações morfológicas (Irle

e Markowitsch, 1983) e neuroquímicas (Savage et al., 2003; Savage et al., 2007) no hipocampo. Estas disfunções podem contribuir para os déficits de aprendizado e memória espacial observados nesses animais.

Quadro 1: Modelos de tiaminae resultados associados.

MODELO EXPERIMENTAL	RESULTADOS	AUTORES
<p>Dieta Deficiente em Tiamina</p> <p>Os animais são alimentados com ração* DT.</p> <p>* produzida no próprio laboratório ou adquirida em empresas especializadas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - O tempo para o aparecimento dos sinais neurológicos de deficiência em tiamina varia de semanas a meses. - Diminuição da neurogênese no hipocampo de roedores após 9 dias de dieta DT. - Redução de neurônios colinérgicos no prosencéfalo após 14 dias de dieta DT. - Redução dos níveis de acetilcolinesterase (AChE) e de fibras colinérgicas no córtex e no hipocampo após 30 dias de dieta DT. - Déficits de memória espacial também são detectados após 30 dias de dieta DT. 	<p>Nakagawasai et al. (2000)</p> <p>Nakagawasai et al. (2001)</p> <p>Pires et al. (2001)</p> <p>Pires et al. (2005)</p> <p>Zhao et al. (2008)</p>
<p>Dieta DT + etanol</p> <p>- Permite verificar os efeitos isolados e combinados desses fatores na disfunção e/ou lesão cerebral.</p> <p>A literatura apresenta uma variedade de protocolos.</p> <p>- Etanol 20% + dieta DT → dieta DT deve ser descontinuada antes que os sinais neurológicos apareçam.</p> <p>- Etanol (uso prolongado) + dieta DT (3 períodos descontinuados ao longo do tratamento com etanol)</p> <p>- Dieta DT + etanol + piritiamina → A piritiamina é associada para produzir o Modelo da SWK.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - O sistema colinérgico responde de forma diferenciada à deficiência em tiamina e ao consumo crônico de etanol. - a associação (dieta DT + álcool) induz a inibição da liberação de acetilcolina. - deficiência em tiamina pode causar amnésia anterógrada, sendo este déficit aumentado pelo uso de etanol. - Os sinais clínicos da deficiência em tiamina se desenvolvem mais rapidamente - A interação entre dieta DT e etanol não é sempre sinérgica. - Aprendizagem e memória de referência são sensíveis a interação sinérgica do etanol e dieta DT/memória de trabalho é mais afetada pelo etanol. 	<p>Zimitat et al. (1990)</p> <p>Krile Homewood (1993)</p> <p>Homewood et al. (1997)</p> <p>Ciccica e Langlais (2000)</p> <p>Pires et al. (2001)</p> <p>Pires et al. (2005)</p>
<p>Dieta DT + piritiamina</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Acelera o aparecimento dos sinais neurológicos (entre o 13º e 15º dias de tratamento) - Neurodegeneração ocorre principalmente no tálamo e corpos mamilares. - Alterações neuroquímicas presentes no hipocampo, substância cinzenta periaqueductal, vérmis cerebelar e regiões periventriculares do tronco cerebral. - Evidências de disfunções no sistema límbico e regiões corticais. - Reproduz lesões cerebrais e déficits comportamentais encontrados na SWK. - Ratos DT apresentam déficits motores e cognitivos, incluindo déficits de aprendizagem e memória espacial. 	<p>Witt (1985)</p> <p>Victor et al. (1989)</p> <p>Langlais et al. (1992)</p> <p>Anzalone et al. (2010)</p> <p>Vetreno et al. (2011)</p> <p>Savage et al. (2012)</p> <p>Vetreno et al. (2012)</p>

ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA DEFICIÊNCIA EM TIAMINA

Alterações funcionais nos sistemas de neurotransmissão geralmente antecedem a morte neuronal produzida pela deficiência em tiamina (Calingasan et al., 1998; Hazell et al., 1986; Gibson e Zhang, 2002). Os sistemas afetados são o GABAérgico (Butterworth, 1989; Roland e Savage, 2009), o glutamatérgico (Savage et al., 1999; Kawakami et al., 2010), o serotoninérgico (Vigil et al., 2010), o colinérgico (Pires et al. 2001 e 2005) eo dopaminérgico e noradrenérgico (Nakagawasai et al., 2007). Estudos iniciais sobre a deficiência em tiamina em ratos adultos, realizados pelo nosso grupo, demonstraram que a deficiência em tiamina associada ao consumo de etanol crônico causa prejuízos nos aspectos cognitivos (aprendizagem e memória) e os efeitos nesses processos se correlacionam de forma significativa com a diminuição da liberação de acetilcolina no córtex cerebral. Efeitos distintos desses dois tratamentos – consumo crônico de etanol e deficiência em tiamina - também foram observados sobre as atividades da acetilcolinesterase no neocórtex e hipocampo (Pires et al., 2001, 2005). Também foi observado que a deficiência em tiamina altera a atividade do sistema glutamatérgico no córtex pré-frontal (CPF) e induz um prejuízo no processo de extinção de um comportamento, em animais submetidos a tarefas cognitivas espaciais (Carvalho et al., 2006; Pires et al., 2005).

Poucos estudos têm investigado as alterações proteicas ocorridas em modelo experimental grave de deficiência em tiamina. Apesar disso, tem se observado que alterações na expressão de proteínas estão presentes em alterações cognitivas causadas pela deficiência em tiamina, como demonstram os estudos a seguir. Alexander-Kaufman et al. (2007), através de técnicas proteômicas, verificaram alteração nos níveis de expressão de enzimas dependentes de tiamina, transcetolase e piruvato desidrogenase, no cerebelo de indivíduos alcoolistas. Este grupo de pesquisadores também mostrou expressão diferencial de proteínas, em estudo *post mortem*, entre indivíduos alcoolistas com complicações médicas (cirrose hepática) e sem complicações nas seguintes regiões: substância branca do córtex pré-frontal (Alexander-Kaufman et al., 2006), substância cinzenta do córtex pré-frontal (Alexander-Kaufman et al., 2007). MacKay et al., (2011) identificaram expressão diferenciada da proteína 14-3-3 córtex pré-frontal *post mortem* de indivíduos alcoolistas e controle. 14-3-3 pode desenvolver um papel importante na neurodegeneração gerada pelo alcoolismo crônico, uma vez que desempenha funções importantes como na regulação do metabolismo, na transdução de sinal, no controle do ciclo celular, no tráfego de proteínas e

na apoptose (Dean et al., 2007; Dougherty and Morrison, 2004; Fu et al., 2000; Xiao et al., 1995). Em estudo do hipocampo e espleno do corpo caloso, Kashem et al. (2009) não verificou alterações nos níveis de expressão das enzimas transcetolase e piruvato desidrogenase no cérebro *post mortem* de indivíduos com distúrbios psiquiátricos ou alcoolistas comparados ao controle, o que sugere que a deficiência em tiamina pode não ter influência no mecanismo que leva aos danos induzidos por álcool no hipocampo. Nosso grupo verificou déficit cognitivo relacionado com alteração no nível de fosforilação da proteína p86 no hipocampo (Pires et al., 2007). Também mostrou que a proteína p86 é uma proteína envolvida com a liberação de neurotransmissores, denominada Sinapsina I (Resende et al., 2012).

APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

A definição de aprendizagem e de memória não é uma tarefa fácil, uma vez que, em geral, estes processos não são mensurados diretamente, mas inferidos a partir de alterações comportamentais. Existe uma relação intrínseca entre elas, por isso não existe aprendizado sem memória. Um indivíduo é incapaz de adquirir uma informação, se não tiver capacidade de memorizar. Desta forma, a aprendizagem pode ser definida como uma modificação do comportamento, que resulta da experiência ou aquisição de novas informações acerca do meio, e a memória pode ser definida como uma fixação deste conhecimento por um tempo determinado (Baudry, 1998).

Diferentes trabalhos experimentais e estudos clínicos sobre a variedade de sistemas de memória resultaram em propostas que se basearam distinções dicotômicas em conteúdo, função e tempo de duração. Baddeley e Warrington (1970) propuseram uma diferenciação entre memória de curto e de longo prazo. Honig (1978) fez separação entre memória de referência e operacional. Thomas (1984) fez distinção entre memória disposicional e representacional. Tulving (1972 e 1983) propôs as memórias semântica e episódica. Ainda foram sugeridas outras denominações como os sistemas para memória de habilidades e hábitos (Hirsh, 1974; Mishkin, 1982); a memória procedimental e a declarativa (Cohen e Squire, 1980; Cohen, 1984), o “saber como” e o “saber que” (Ryle, 1949), a memória recente e a remota (Schacter e Moscovitch, 1984) e a memória implícita e a explícita (McDougall, 1923). A memória explícita é a memória declarativa e a implícita a não-declarativa, esses termos são para abranger os outros animais (que não falam e logo não declaram, mas obviamente lembram).

Segundo Smith e Grossman, (2008) na literatura há uma concordância sobre três sistemas de aprendizado e memória: a memória de curto prazo, a memória de longo prazo implícita e a memória de longo prazo explícita. Na figura 5 apresentamos um resumo dos diferentes tipos de memória, considerando esta classificação.

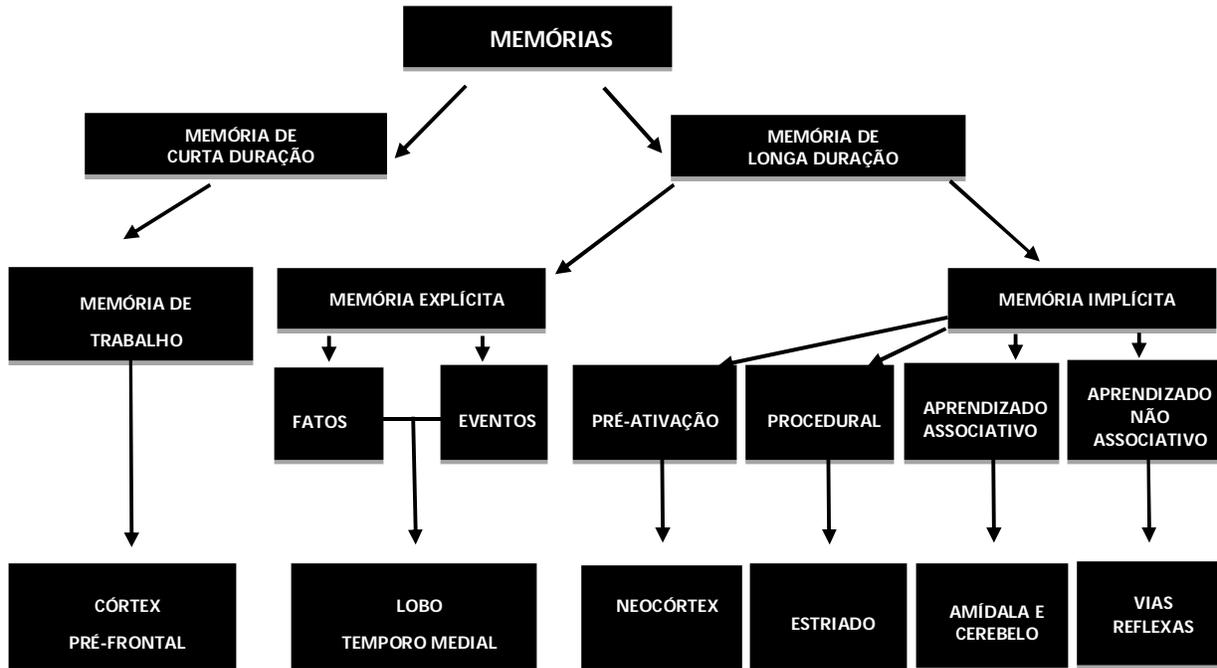


Figura 5. Classificação dos sistemas de memória, de acordo com Gasic et al. (2006). No fluxograma estão indicados os tipos de memórias e as principais estruturas encefálicas relacionadas aos processos centrais.

A memória de curta duração, também denominada memória de trabalho ou operacional, é definida como um sistema de manutenção e manipulação ativa de informações que tem uma capacidade limitada de retenção destas e por um período curto de tempo (Jonides, 1995). De acordo com Alloway (2009), a capacidade limitada da memória de trabalho varia muito entre os indivíduos e está intimamente relacionada com habilidades de aprendizagem durante a infância e, também, com habilidades de compreensão da leitura. A memória de curta duração tem uma relação anatômica com o córtex pré-frontal (Janowsky et al., 1989), com as regiões occipital e parietal (Farah, 1988), com os giros supramarginal e angular (Vallar e Shallice, 1990) e com o cerebelo (Pascual-Leone et al., 1993).

A memória de longo prazo implícita, que equivale à memória não-declarativa, em humanos, envolve o armazenamento de muitas informações por longo período (Smith e

Grossman, 2008). A memória de longo prazo pode ser dividida em pré-ativação (tem associação com estruturas do neocórtex), em procedural (relacionada ao estriado), em aprendizado associativo (tem relação coma amídala e cerebelo) e em aprendizado não-associativo (relacionado às vias reflexas) (Smith e Grossman, 2008).

A memória de longo prazo envolve a codificação e armazenamento de grande quantidade de informação, por um longo período de tempo. Esta é dividida em explícita e implícita (Cohen, 1984; Squire e Zola-Morgan, 1991; Squire, 1992).

A memória explícita, ou memória declarativa, está relacionada ao armazenamento de fatos e eventos como lembrança de datas, fatos históricos e números de telefone. Ela reúne informações que podemos evocar através de palavras, por isso o termo declarativa (Smith e Grossman, 2008). Sua subdivisão é feita pelo componente semântico e pelo episódico. A memória semântica processa ideias e conceitos não relacionados à experiência pessoal. Inclui informações que são do conhecimento comum, tais como os nomes das cores, os sons das letras, as capitais de países e outros fatos básicos adquiridos ao longo da vida. A memória episódica é específica para o indivíduo. É a lembrança de experiências biográficas e eventos específicos a partir dos quais pode-se reconstruir os eventos reais que aconteceram em pontos específicos no tempo, dentro das nossas vidas (Eisenkraemer, 2006). A codificação dessa informação dentro do sistema está relacionada a estruturas do lobo temporal medial e diencéfalo (Squire e Zola-Morgan, 1991).

A memória implícita ou não-declarativa envolve treinamento repetitivo e a aquisição ocorre de forma gradual ao longo de diversas experiências, estando ligada à situação de aquisição original (Mishkin et al., 1984).

A classificação da memória, apresentada aqui, não abrange todos os tipos descritos na literatura, apesar de ser bem estabelecida. Há outras formas de memória que estão localizadas na interface entre outras duas classificações. A aprendizagem e memória espacial, objeto de estudo deste trabalho faz parte deste conjunto presente na interface de outras memórias. Esta pode ser subdividida em um componente de curta duração, a memória espacial de trabalho, e um componente de longa duração, a memória espacial de referência e está associada anatomicamente ao hipocampo (Morris e Frey, 1997). A memória espacial de trabalho envolve codificações de informações espaciais. É um sistema que permite a aquisição transitória de uma quantidade limitada de informação espacial, que a mantém disponível para o acesso imediato (Moscovitch et al., 2005). A memória espacial de referência, definida por Olton et al. (1979), é um sistema envolvido na obtenção de

informação espacial através da repetição de uma tarefa e armazenamento por longo período (Kessels et al., 2001).

A confirmação de que o hipocampo desempenha um papel na cognição espacial, se baseia também em estudos com pacientes portadores de epilepsia, que apresentavam esclerose hipocampal esquerda ou direita; e de estudos com pacientes submetidos à lobectomia, na qual é feita a ressecção da ponta do lobo temporal, juntamente com parte do hipocampo, uncus, giro parahipocampal e amígdala. Indivíduos submetidos à lobectomia temporal direita revelam déficits na capacidade de aprendizagem, de reconhecimento espacial (Abrahamms et al., 1997; Nunn et al., 1999; Johnsrude et al., 1999) e de memória para localização de objetos (Nunn et al., 1999). Golby et al.(2002) apontam a participação do hipocampo no processamento de novas informações ao comparar a intensidade de ativação hipocampal entre estímulos novos e estímulos repetidos. Foi observado que à medida que o estímulo se torna familiar, a ativação do hipocampo diminui o que aponta a participação deste no processo de aprendizagem de informações novas.

A utilização de animais para o estudo de memória espacial proporcionou descobertas como a de Tolman (1948). Ele sugeriu a existência de um mapa cognitivo que é uma representação do ambiente externo no cérebro, funcionando como um “GPS interno” do cérebro. Outra descoberta foi a de O’Keefe e Dostrovsky (1971) sobre ascélulas de lugar (*place cells*), células piramidais presentes no hipocampo, que são ativadas em conjunto dependendo da localização do animal. May-Britt e Edvard Moser reforçaram a teoria dos mapas cognitivos através da existência das células de grade (*grid cells*) presentes no córtex entorrinal de ratos que mantêm um padrão de disparo em locais específicos (Hafting, 2005). Estas descobertas sobre os mecanismos biológicos da memória espacial de roedores reforçaram o papel do hipocampo e do córtex entorrinal na memória espacial. Como será detalhado mais adiante, o tálamo, região alvo desta pesquisa, está envolvido em processos de aprendizagem e memória, isso porque existem conexões entre este e o hipocampo (Aggleton e Brown, 1999; Van der Werf et al., 2003).

A maioria dos testes usados para avaliar memória espacial faz uso de labirintos, nos quais o animal deve aprender a desempenhar um determinado comportamento, que depende do conhecimento espacial (Tolman, 1948; Barnes, 1979; Morris, 1981; Carvalho et al., 2006; Oliveira-Silva et al., 2007). Dentre eles estão o labirinto radial de 8 braços (Oltone Samuelson, 1976), o labirinto em T (Asth et al., 2012) e o labirinto aquático de Morris (Morris, 1981).

O labirinto aquático de Morris (LAM), descrito em 1981, vem sendo utilizado intensamente em estudos envolvendo avaliações dos processos de memória em roedores, sendo uma tarefa bastante útil, pois, avalia simultaneamente aprendizado, memória espacial e atividade motora. Nesta tarefa, o animal aprende a localizar uma plataforma submersa em uma piscina utilizando, para isso, dicas espaciais distribuídas na sala de treino (Clark et al., 1992) (Figura 6). A grande vantagem do labirinto aquático, em relação a outras técnicas de estudo de aprendizagem, é que não depende de privação alimentar nem de apresentação de choques elétricos. Para encontrar o reforço (a plataforma submersa) o animal tem que formar um mapa cognitivo, construído a partir da associação de coordenadas estabelecidas com base em dicas espaciais presentes nas paredes da sala.

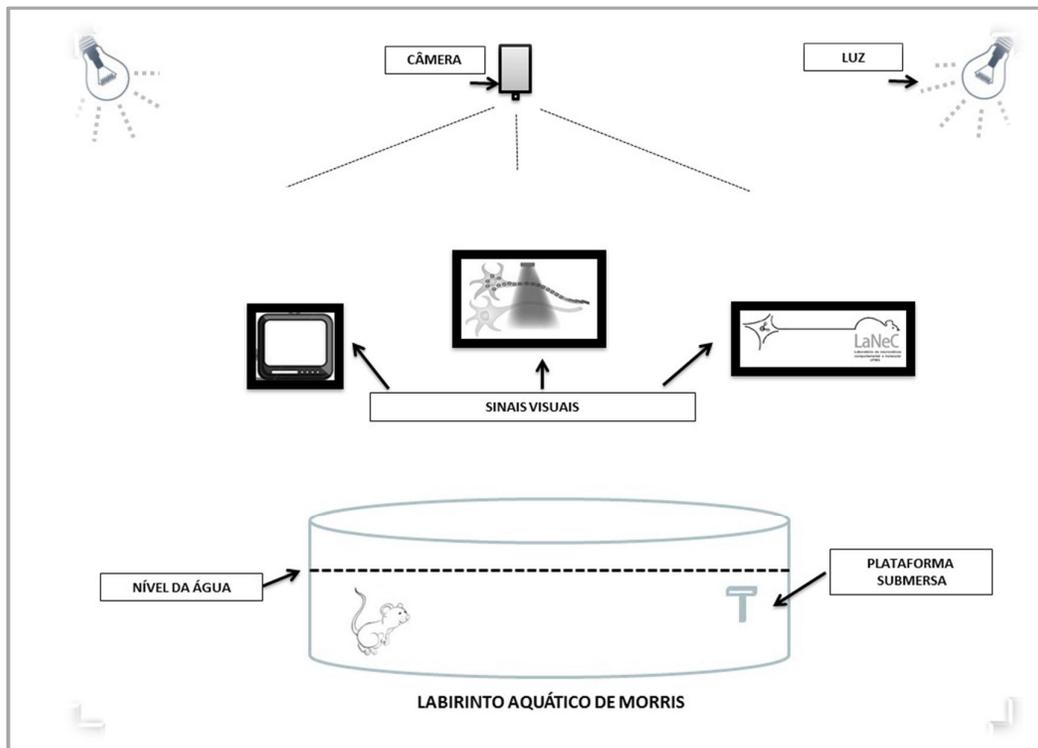


Figura 6. Desenho esquemático de uma sala de teste contendo o Labirinto aquático de Morris.

A navegação neste labirinto pode ser guiada de diferentes maneiras. O' Keefe e Nadel (1978) propuseram três diferentes estratégias utilizadas pelos animais para navegar no ambiente e sugeriram que mais de uma estratégia pode ser utilizada simultaneamente para resolver tarefas espaciais. Dentre as estratégias propostas estão: a estratégia de guiamento, o sistema de orientação egocêntrico e a formação de um mapa cognitivo.

As estratégias de guiamento envolvem a aproximação ou distanciamento de um estímulo particular. Os animais não precisam estabelecer relações espaciais entre os objetos, eles se orientam em relação a uma pista específica. Por exemplo, próximo ao local onde está a plataforma, há um objeto específico, como um quadro ou uma televisão, assim o animal pode orientar-se de acordo com esse estímulo, sem estabelecer qualquer tipo de relação com os demais estímulos do ambiente (O' Keefe e Nadel, 1978).

O sistema de orientação egocêntrico consiste no desenvolvimento pelo animal de rotações no eixo do próprio corpo para atingir um alvo específico. Os animais orientam-se a partir de informações egocêntricas e aprendem uma sequência de movimentos corporais. No caso do LAM, o animal aprenderia que girando para a direita, numa rotação de, por exemplo, 50°, depois deslocando certa distância, ele atingiria a plataforma. Uma estratégia para impedir que o animal navegue a partir desse sistema é colocar o animal no labirinto sempre em uma posição cardinal diferente e com o focinho voltado para a parede da piscina (O' Keefe e Nadel, 1978).

Na estratégia de mapeamento cognitivo, os animais aprendem relações espaciais existentes entre os objetos e utilizam essas relações para se localizarem em um determinado ambiente. Ou seja, um animal parece detectar as múltiplas relações entre os objetos e estímulos do ambiente, independentemente de sua própria localização, como se dispusesse de um mapa aloecêntrico (ou geocêntrico); este é fixado usando como referência um ponto no ambiente externo (O' Keefe e Nadel, 1978).

Existem vários protocolos aplicáveis ao LAM, sendo que o melhor protocolo depende dos objetivos que se deseja alcançar com o experimento. Por exemplo, a plataforma utilizada pode ser submersa ou visível, as pistas para o animal podem estar dentro ou fora da piscina, o número de treinos por dia, bem como o número de sessões podem variar (Morris et al., 1982). O desempenho no LAM pode ser influenciado por fatores como o próprio equipamento ou o protocolo utilizado, bem como pelas características dos animais (sexo, espécie/raça, idade, estado nutricional, exposição ao stress ou infecção). Lesões em diferentes regiões do encéfalo, como o hipocampo, tálamo, estriado, prosencéfalo basal, cerebelo e córtex cerebral alteram o desempenho nesse teste. Além disto, a desconexão de algumas regiões, ao invés de danos neurológicos em uma área específica, pode ser relevante para a aprendizagem espacial (D'Hooge e Deyn, 2001).

A aprendizagem espacial e o desempenho no LAM em particular, parecem depender da ação coordenada de diferentes regiões cerebrais e sistemas neurotransmissores, constituindo uma rede neuronal funcionalmente integrada. Finalmente, a tarefa no LAM

tem sido frequentemente utilizada na validação de modelos de roedores para os transtornos neurocognitivos tornando-se uma das ferramentas de pesquisa mais utilizadas em diversas subáreas do estudo cognitivos, podendo ser considerada como um dos melhores ensaios para a avaliação da aprendizagem espacial e memória em roedores de laboratório (D'Hooge e Deyn, 2001).

Vários estudos utilizando o LAM, realizados por nosso grupo e por outros autores, têm revelado alterações cognitivas em ratos DT similares às alterações encontradas em pacientes com a SWK. Langlais et al. (1992) mostraram que ratos DT apresentaram déficits na habilidade para encontrar a plataforma no LAM. Este resultado é semelhante obtido pelo nosso grupo que observou que animais DT apresentaram um pior desempenho os controles na terceira e quarta sessões do treino no LAM, indicando um atraso no processo de aprendizagem (Pires et al., 2005; Carvalho et al. 2006; Vigil et al., 2010). Os déficits nos ratos DT são detectados apenas nas primeiras sessões do LAM, indicando que não há diferença entre os grupos DT e controle no desempenho da tarefa na última sessão do treino. Esse dado sugere que os animais DT apresentam uma velocidade de aprendizado menor, mas com os treinos que seguem eles se mostram capazes de aprender a tarefa de forma similar aos controles. Langlais et al. (1992), em um estudo em que avaliaram a presença de amnésia retrógrada em ratos DT, observaram que os animais revelaram uma memória normal da localização da plataforma. Entretanto, a localização da plataforma foi inicialmente aprendida durante um período de duas semanas antes do início do tratamento com piritiamina (Langlais et al. 1992).

O PAPEL DO TÁLAMO NA APRENDIZAGEM E MEMÓRIA E AS CONSEQUÊNCIAS DA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA

Butterworth, (2003) utilizando exames por imagem de pacientes que apresentavam deficiência em tiamina observou que algumas estruturas encefálicas apresentam certa seletividade e uma maior susceptibilidade à essa deficiência. Destacando-se o tálamo, corpos mamilares, região periventricular e cerebelo. Portanto, a deficiência em tiamina induz perda de células em várias regiões cerebrais, sendo o tálamo uma das áreas mais afetadas.

O tálamo é uma estrutura bilobulada que pertence ao diencéfalo e constitui o topo do tronco encefálico. Cada lobo localiza-se em um lado do terceiro ventrículo, os dois lobos

são unidos pela aderência intertalâmica, que passa através do terceiro ventrículo. Na superfície do tálamo, podem ser vistas lâminas brancas compostas por neurônios mielinizados. Morfologicamente, o tálamo é organizado por muitos pares diferentes de núcleos, sendo que a maioria destes se projetam para o córtex (Pinel, 2005). A figura 7 apresenta um esquema da organização dos grupos talâmicos.

O tálamo tem funções sensitivas e funções relacionadas à emoção, à motricidade, à ativação cortical (Mazzola et al., 2013; Bosch-Bouju et al., 2013; Cruikshank et al., 2012) e às funções cognitivas (Vigil et al., 2010). Estruturalmente é dividido em cinco subáreas, seguindo a topografia determinada pela lâmina medular interna: regiões anterior, medial, mediana, lateral e posterior. A região anterior tem importante conexão com o sistema límbico, que regula o comportamento emocional (Meneses, 2006). Sua conexão com a substância cinzenta periaquedutal indica um papel no controle da dor (Levy et al., 2010). As conexões eferentes da região medial com o córtex pré-frontal fazem com que o tálamo desempenhe funções relacionadas às emoções, à atenção e à iniciativa. A região mediana relaciona-se a funções viscerais (Meneses, 2006). Os núcleos da região lateral estão ligados às funções de controle dos movimentos, sensibilidade somática do hemicorpo contralateral e gustação. O núcleo mais volumoso da região posterior é o pulvinar do tálamo com funções ainda pouco conhecidas, mas consideradas associativas. O metatálamo é constituído pelo corpo geniculado lateral relacionado à visão e pelo corpo geniculado medial relacionado à audição (Uylings e Van Eden, 1990).

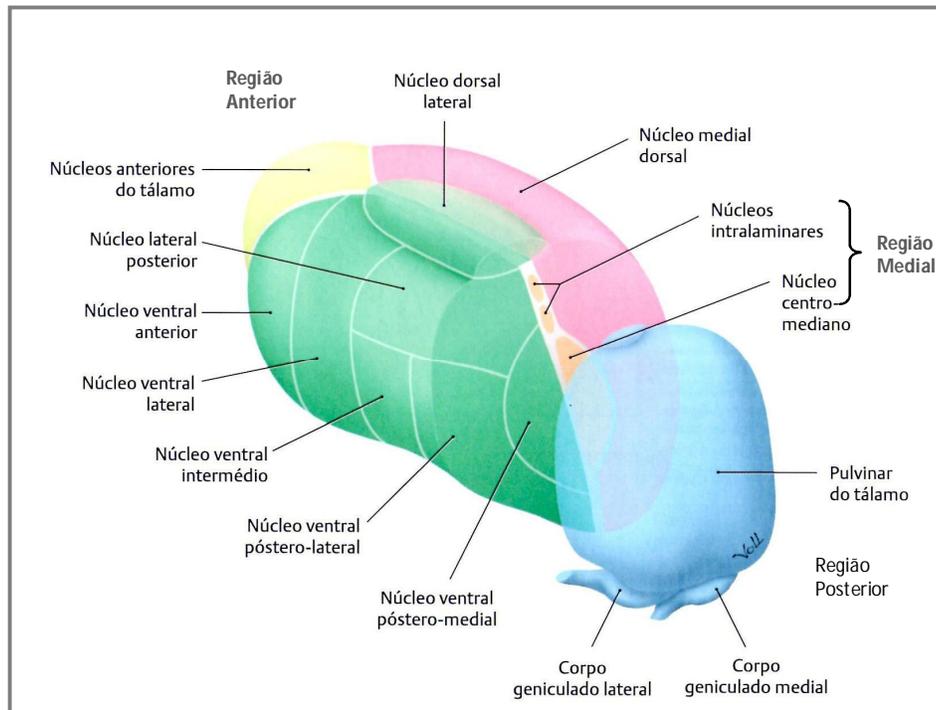


Figura 7. Representação esquemática da disposição espacial dos grupos nucleares do tálamo. Fonte: Schünke et al., 2007.

Estudos têm evidenciado que o tálamo está envolvido em processos de aprendizagem e memória, devido às suas conexões com o hipocampo. As principais eferências do hipocampo destinam-se às estruturas corticais e subcorticais (corpos mamilares, núcleos talâmicos anteriores e área septal). Já as principais aferências (axônios que chegam ao hipocampo) provêm de áreas de associação cortical, cláustro, bulbo olfatório, córtex auditivo, amígdala, septo, tálamo e hipotálamo (Jarrard, 1980, Xavier, 1985). Resumindo, o hipocampo transfere informações, por meio do fórnix, aos corpos mamilares. Destes, as informações seguem pelo feixe mamilo-talâmico para o núcleo anterior do tálamo e daí para o giro do cíngulo, que então se projeta para o córtex. As vias de interligações entre essas áreas estão apresentadas em um esquema na figura 8. As lesões produzidas especificamente nas estruturas que integram esse circuito geram dificuldades nos processos de memória (Vertes et al., 2001). Van der Werf et al. (2003) demonstraram que humanos com lesões talâmicas apresentavam déficit na memória declarativa com relativa limitação de capacidades intelectuais e da memória de curta duração, quando o trato mamilo-talâmico também é lesado.

Embora se tenha evidências que lesões no diencéfalo, principalmente no tálamo, possam produzir déficits cognitivos em humanos e em modelos experimentais, os mecanismos envolvidos nesses déficits ainda não foram completamente elucidados.

Aggleton e Brown (1999), propuseram que as conexões do hipocampo para os corpos mamilares e para os núcleos talâmicos anteriores, através do fórnix, são fundamentais para a memória episódica normal. Como já mencionado sobre aprendizado e memória, a memória episódica é um tipo de memória declarativa que consiste no armazenamento de experiências vividas (Tulving, 1987).

A região diencefálica de indivíduos com SWK foi estudada por Harding et al., (2000), para avaliar as bases neurais da amnésia nesses pacientes. A mesma percentagem de neurodegeneração, tanto no hipotálamo mamilar quanto no núcleo dorsomedial do tálamo, em pacientes amnésicos e não amnésicos foi encontrada. Entretanto, a perda neuronal no núcleo anterior do tálamo foi maior em indivíduos com amnésia. Os núcleos talâmicos anteriores, quando lesados, produzem déficits de aprendizagem espacial (Aggleton et al., 1995, Dumont et al., 2014a). As lesões presentes no tálamo anterior prejudicam o aprendizado espacial aloentríco (Aggleton et al., 1991) e outros tipos de processos espaciais, incluindo a aprendizagem da direção (Frohardt et al., 2006), a formação de vias de integração (dificuldade em traçar e atualizar sua rota no escuro usando sinais interoceptivos) (Frohardt et al., 2006), e a capacidade de discriminação de distâncias relativas (Aggleton et al., 2009; Dumont et al., 2014b). Quando há danos em áreas que apresentam conexão direta com os núcleos talâmicos anteriores, sendo as mais críticas o córtex retro-esplênico e o hipocampo, esses danos podem afetar indiretamente funções no tálamo (Van Groen and Wyss, 1992a, 2003; Vann et al., 2009). Estes dados suportam evidências prévias da importância dos núcleos anteriores do tálamo no processamento de informações.

Os núcleos da linha média do tálamo, outra região do diencefalo que pode estar envolvida em processos relacionados à memória, têm conexões recíprocas com o hipocampo. Evidências desse possível envolvimento vieram de um estudo por Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), em pacientes com lesões nessa região, mostrando hipometabolismo cortical generalizado que pode ser atribuído à perda de núcleos da linha média (Levasseur et al., 1992). Segundo Mair (1994), déficit comportamental, semelhante ao encontrado em modelo animal de deficiência em tiamina, é notado em ratos com lesões talâmicas.

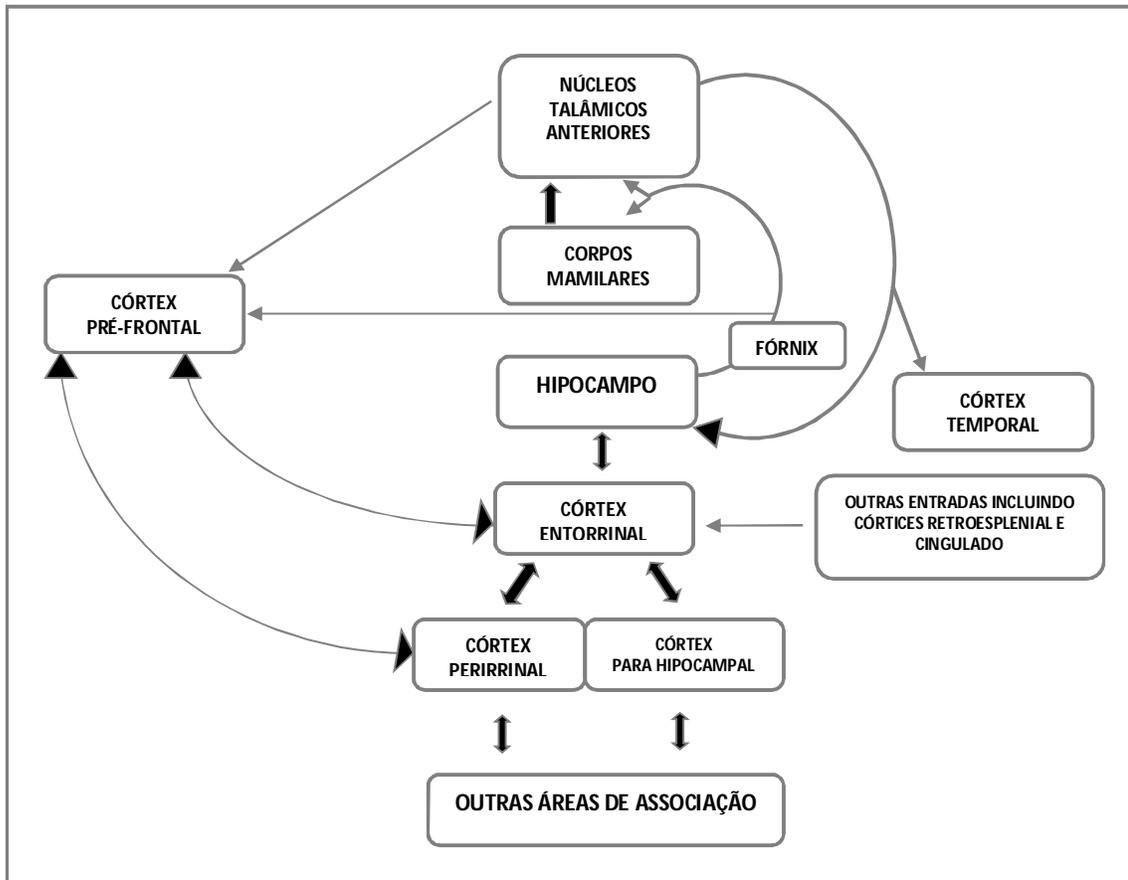


Figura 8. Esquema das principais vias que permitem a codificação da informação episódica e fundamentam os aspectos subjacentes da recordação. A espessura relativa das linhas indica a importância putativa das diferentes ligações. Fonte: Aggleton e Brown, (1999).

Até a presente data, técnicas proteômicas - eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa (MS) - para verificar os efeitos da deficiência em tiamina expressão de proteínas talâmicas não foram empregadas. A proteômica estuda os processos biológicos através da análise sistemática das proteínas expressas em condições fisiológicas ou patológicas. Esses estudos são importantes uma vez que o proteoma reflete o estado de funcionamento das células, em um determinado momento e condição (Tyers e Mann, 2003).

Embora muitos trabalhos têm como foco o estudo da relação da aprendizagem espacial com funções e/ou disfunções no hipocampo, a escolha do tálamo como uma região alvo, se justifica por ser uma região que sofre danos extensos na deficiência em tiamina. Sabe-se que existe uma relação entre lesões estruturais numa determinada área cerebral e alterações funcionais em outras (Savage, 2012). Aggleton e Brown (1999) concluíram que a existência de uma comunicação do hipocampo com os corpos mamilares e com os núcleos talâmicos anteriores, através do fórnix, é fundamental para a manutenção da

memória episódica normal. Além disso, a ocorrência de danos neste eixo produz déficits centrais em memória (Aggleton e Sahgal, 1993; Savage et al., 2011). Alterações na função do tálamo podem causar mudanças em áreas do córtex pré-frontal, refletindo em distúrbios do comportamento, isso porque há inúmeras conexões entre o córtex pré-frontal e diversos núcleos talâmicos (Fuster, 2002).

ANÁLISE PROTEÔMICA – DADOS PROTEÔMICOS NO SNC

O proteoma é a soma dos produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, mas inclui também proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, bem como complexos formados por essas biomoléculas (Ahrens et al., 2010). Esse grupo molecular é altamente complexo e dinâmico e seu perfil se altera de acordo com o estado fisiológico e as fases da diferenciação celular (Pandey e Mann, 2000). Algumas estimativas sugerem que mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas estão presentes nas células, nos tecidos e nos fluidos corporais em condições e/ou momentos distintos (Jensen, 2004). Em resposta a estímulos ou diferentes condições de cultivo, as proteínas podem sofrer alterações em seus padrões de expressão, modificação pós-traducional ou localização celular. Um mesmo genoma pode potencialmente originar um número infinito de proteomas e, desta maneira, a análise do proteoma vem complementar o estudo do genoma (Graves e Haystead, 2002).

O termo proteômica foi criado pela primeira vez em 1995 e foi definida como a caracterização em grande escala da totalidade de proteínas de uma célula, tecido ou organismo (Anderson e Anderson, 1996). Duas definições de proteômica são encontradas com uma frequência maior na literatura. A clássica se restringe a definir a proteômica como uma análise em larga escala dos produtos dos genes, ou seja, estudo apenas das proteínas. A segunda definição, que é a mais utilizada, considera a proteômica como uma combinação de estudos de proteínas, suas modificações pós-traducionais e ainda análise do RNAm (Pandey e Mann, 2000). Sendo assim, diferentes tipos de estudo estão associados à proteômica como a análise da interação proteína-proteína, os estudos de modificações pós-traducionais das proteínas e a identificação da função e localização da proteína. Estes envolvem a participação de diferentes disciplinas como a biologia molecular, bioquímica e bioinformática (Graves et al., 2002).

A proteômica é a principal área da genômica funcional, formando um elo entre os genes e os seus produtos, as proteínas. Os progressos nesta área com a melhoria e o

desenvolvimento de diferentes técnicas analíticas como a eletroforese bidimensional, eletroforese capilar, cromatografia líquida multidimensional e a *MS*, tornou possível o estudo de processos biológicos dinâmicos com a análise sistemática das proteínas expressas pelo genoma (Wilkins et al., 1996).

As características da espectrometria de massa (*MS*) colocaram-na numa posição de destaque entre os métodos analíticos: sensibilidade inigualável, limites de detecção, velocidade e diversidade das suas aplicações. Esta *MS* é utilizada em análises bioquímicas, proteoma e metaboloma, na descoberta de medicamentos, na identificação de vias metabólicas nas diversas etapas celulares, no controle da poluição, no controle de alimentos e produtos naturais, na ciência forense, na física, na geocronologia e análises em química inorgânica (Hoffmann e Stroobant, 2007).

Apesar de que os equipamentos mais modernos para *MS* não dependerem de uma análise por 2-DE que antecede a análise proteômica, a utilização de um método para separação prévia de uma mistura de proteínas pode ser usado em algumas condições, como por exemplo, quando se conhece a faixa de PM que se encontram proteínas que são alteradas por determinado tratamento. Nesses casos se justifica o uso de uma eletroforese 2-DE, como parte do processo de identificar e caracterizar proteínas expressas num determinado sistema biológico. Portanto, a 2-DE, seguida pela digestão trípica da proteína de interesse e a *MS*, associada à análise computacional de imagens e a um banco de dados dos fragmentos peptídicos, são ainda usadas na proteômica (Wildgruber et al., 2000).

A 2-DE foi desenvolvida por O'Farrel (1975) e Klose (1975). Para o método criado, era necessário a preparação de géis cilíndricos de poliacrilamida. Nestes, um gradiente de pH era estabelecido por meio de uma pré-corrída com anfóteros específicos que apresentam alta capacidade tamponante, em pHs próximos aos seus pontos isoeletricos. As proteínas eram focalizadas isoeletricamente e depois submetidas à eletroforese com a utilização de dodecil-sulfato de sódio (SDS), através de um sistema convencional descrito por Laemmli (1970). Os géis cilíndricos, com o passar do tempo, foram substituídos por tiras com gradiente de pH imobilizado, permitindo uma melhor reprodutibilidade dos géis e uma melhor resolução.

A técnica atual consiste na separação de proteínas em duas fases (dimensões) de acordo com as propriedades físico-químicas das proteínas. A primeira dimensão, a focalização isoeletrica (IEF), separa as proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). A segunda dimensão, separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). Para tornar

visíveis os pontos (*spots*) proteicos, os géis são corados com Azul de Coomassie, nitrato de prata ou outros corantes, dependendo do uso posterior desse gel. Nos géis 2-DE podem ser visualizados de 100 a 2.000 *spots*, cada *spot* contendo uma ou algumas proteínas. A técnica permite ainda a obtenção de informações sobre o pI, a massa molecular, o volume relativo e sobre as modificações pós-traducionais (Fey e Larsen, 2001). Após digitalização das imagens dos géis e com a utilização de ferramentas de informática, o material de fundo ou *back-ground* é subtraído. Em seguida, os *spots* ou perfis de *spots* detectados nos géis são comparados. Os dados são normalizados e analisados estatisticamente para quantificação de volumes ou intensidades das proteínas (Dowsey et al., 2003).

Após análise do gel e determinação das proteínas de interesse é possível identificá-las através da *MS*. A primeira etapa desse processo é a digestão da proteína através de enzimas específicas. A combinação do uso de enzimas específicas com a sensibilidade, a velocidade e a acurácia da *MS*, permite a identificação da sequência completa de uma proteína. O padrão de digestão gerado pela ação da protease é comparado com padrões presentes no banco de dados. A digestão da proteína, através da tripsina, produz um grande número de fragmentos ricos em resíduos Arg e Lys. Esse padrão de fragmentação aumenta consideravelmente a probabilidade da identificação precisa da proteína alvo. O sucesso desta estratégia é possível devido à existência de sequências proteicas na base de dados (Kriwacki et al., 1997).

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico que é capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com sua razão massa/carga (m/z), utilizando para isso campos eletromagnéticos. A etapas de processamento do espectrômetro de massa, figura 9, consiste do uso de três componentes sequenciais: o ionizador, o analisador e o detector (Suckau et al., 2003).

A utilização de um método de ionização permite que a massa molecular dos íons gerados seja avaliada em um analisador depois que este atravessa uma câmara de vácuo. Os ionizadores são do tipo ESI (*Electrospray Ionization*) e do tipo *MALDI* (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), o primeiro empregado para amostras em estado líquido e gasoso e o segundo para amostras em estado sólido (Zaluzec et al., 1995).

O *MALDI* é um sistema em que o material de estudo é aplicado em uma placa associado a uma matriz polimérica. A matriz e o material são irradiados com laser o qual provoca a vaporização da amostra ocorrendo ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo à vácuo e levadas a um detector. De acordo com as características das moléculas ionizadas, o tempo de chegada ao detector (*Time Of Flight* – Tempo de vôo) é

diferente (Tanaka et al., 1988). Cada molécula ionizada é quantificada gerando picos relativos às suas características, que são expressos na forma gráfica. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado com a identificação das proteínas contidas na amostra (Benagli et al., 2011).

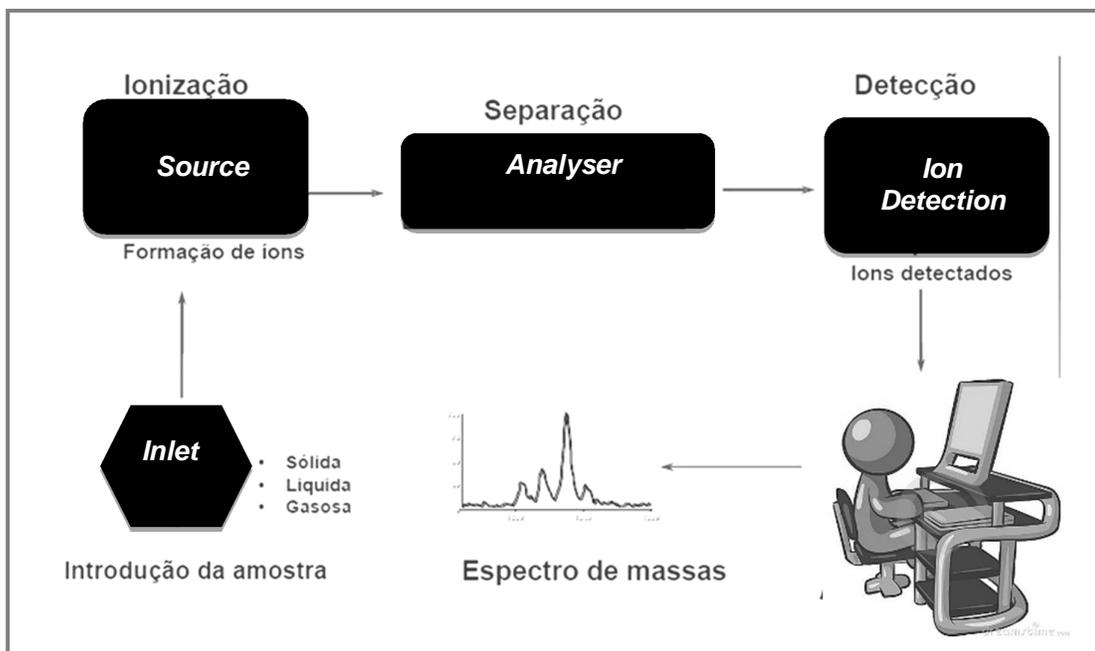


Figura 9. Etapas de processamento do espectrômetro de massa.

Os tipos mais comuns de analisadores são o TOF (*Time Of Flight* – Tempo de voo), o quadrupolo e o *íontrap* (armadilha de íons) e os analisadores associados (*in tandem*) e híbridos TOF/TOF, Q/TOF (May et al., 2011) e *Orbitrap* (Hu et al., 2005). Os analisadores TOF utilizam as diferenças de tempo que levam os íons gerados e acelerados para chegar a um detector. Os íons da fonte são acelerados por um pulso de campo elétrico. As partículas aceleradas passam através de um tubo de voo à vácuo. Quando os íons alcançam o detector, o tempo transcorrido entre a ionização e a detecção é empregado para determinar o valor da razão massa/carga (m/z) (Wollnik, 1993). O princípio essencial do TOF baseia-se em que todos os íons são acelerados com a mesma energia. Suas velocidades são diretamente proporcionais às respectivas razões m/z . Os íons mais leves, de alta velocidade, chegam ao detector antes do que os íons mais pesados, de baixa velocidade (Suckau et al., 2003). Após a determinação da m/z do peptídeo intacto, através da técnica *MS/MS*, é possível fragmentar um determinado íon de forma a obter uma sequência de aminoácidos. Essa etapa representa uma segunda aceleração (Pappin, 1997; Mann et al., 1993). O *LIFT* é utilizado na segunda aceleração e permite a fragmentação dos peptídeos mais abundantes de três formas: 1. *CID-*

LIFT (dissociação induzida por colisão/*collision- induced dissociation*) - o peptídeo de interesse, ou íon, é acelerado em uma câmara de colisão, onde se depara com uma corrente gasosa de um gás inerte, como o nitrogênio ou o argônio, e as colisões entre o gás e o íon provocam a fragmentação do mesmo; 2. *LID-LIFT* (laser de decomposição induzida/*laser - induced dissociation*) - utiliza o laser de decomposição induzida. Este é independente da colisão com um gás. A partir da utilização do método *LIFT* para fragmentação de íons, os espectros gerados apresentarão as informações relacionadas à sequência de aminoácidos que compõe o peptídeo em estudo (Cunha et al., 2006; Suckau et al., 2002). 3. *ISD* (Deterioração na fonte/*in-source decay*) - não é exatamente uma técnica *in tandem*, pois não existe a necessidade de se associar dois analisadores de massa, já que os fragmentos são gerados na fonte, antes de adentrarem o primeiro analisador. *ISD* é frequentemente utilizado como uma etapa adicional de fragmentação *in tandem*, pois é utilizado para proteínas intactas (Walther e Mann, 2010).

Os detectores, sistemas de recolhimento de íons, medem a abundância relativa de fragmentos de cada massa. Diferentes tipos de detectores são disponíveis para espectrômetros de massas. O detector usado para a maioria dos experimentos de rotina é o multiplicador de elétrons. Outro tipo de detector é o de placas fotográficas revestidas com emulsão de brometo de prata, que é sensível aos íons energéticos (Suckau et al., 2003).

O *MALDI LIFT-TOF/TOF*, utilizado neste estudo, é um espectrômetro de massa que combina ionizador *MALDI* e analisador *TOF/TOF*. Esse conjunto é capaz de gerar: 1°. o *peptide mass fingerprint* (PMF) que fornece informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática e 2°. *MS/MS* fornece resultados obtidos pela fragmentação de peptídeos individuais previamente detectados, ou seja, fornece o sequenciamento da proteína adquirido a partir da fragmentação do peptídeo. Essa fragmentação pode ser analisada através do sequenciamento *De Novo* (Cantú et al., 2008).

Ao final do processo, os resultados de massa molecular (MM) dos peptídeos, obtida a partir do PMF, bem como a informação da sequência de aminoácidos dos peptídeos, contida nos espectros de fragmentação (*MS/MS*), são usados pelos *softwares* de busca para "localizar" as proteínas nos bancos de dados. Os *softwares* mais conhecidos e comumente empregados são o *Sequest* e o *Mascot* (Kumar e Mann, 2009). A identificação pode ser feita pelo padrão obtido das massas intactas dos fragmentos trípticos, o PMF, pela sequência específica de fragmentos do *MS/MS* (Sequenciamento *De novo*) ou pela combinação desses (Pappin, 1997; Mann et al., 1993; Henzel, 1993; Yates et al., 1993; James et al., 1993).

Um produto gênico pode se apresentar em diferentes formas como resultado de “*splicing*” alternativo e de modificações pós-traducionais (como fosforilações, glicosilação, acilação, etc). Estudos em eucariotos e procariotos têm demonstrado que o modelo “um gene, uma proteína” não é válido. Múltiplos produtos gênicos podem ser conseguidos de apenas um gene. Em muitos casos os níveis de RNA mensageiro (RNAm) transcritos não apresentam uma relação direta com a expressão proteica (Jensen, 2004). Gygi et al. (1999), realizaram um estudo sobre a correlação entre a abundância de proteínas e de RNAm em leveduras e demonstraram que os níveis de transcrição não indicam a extensão da expressão da proteína. Devido às modificações pós-traducionais são processos um RNAm transcrito não apresenta correspondência direta com a expressão proteica. As modificações pós-traducionais ocorrem em todos os tipos de proteínas, como os fatores de transcrição nuclear para enzimas, as proteínas estruturais e os receptores. Elas afetam as propriedades físico-químicas das proteínas (Bahk et al., 2013).

A Neurociências é uma área que têm utilizado as técnicas proteômicas para esclarecer a participação das proteínas em processos neurobiológicos e de neurodegeneração. Neuroproteômica é o termo utilizado para a o uso da proteômica em estudos do sistema nervoso (Tannu e Hemby, 2006). Esta se dedica à catalogação ou ao estudo do perfil qualitativo e quantitativo do neuroproteoma (O’Brien et al., 2006; Bierczynska-Krzysik et al., 2006). A neuroproteômica funcional aborda as propriedades funcionais de proteínas individuais e sua organização em subestruturas, complexos e redes (Husi et al., 2000, Phillips et al., 2005; Fields e Song, 1989; Giot et al., 2003; Cusick et al., 2005). A neuroproteômica clínica é dedicada à identificação de biomarcadores e dos mecanismos de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, ainda auxilia na descoberta de novas drogas (Lovestone, 2007; O’Brien et al., 2006; Bierczynska-Krzysik et al.2006). E, por fim, a neuroproteômica associada à informática utiliza ferramentas computacionais e bases de dados necessárias para a manipulação e análise dos dados do proteoma (Kumar e Mann, 2009; Huang et al., 2009; Gentleman et al. 2004).

JUSTIFICATIVA

A redução nos níveis de B1 teciduais interfere no metabolismo e pode causar alterações na expressão de proteínas - proteoma – em regiões do SNC, envolvidas em disfunções que podem desencadear processos neurodegenerativos, como, por exemplo, a Encefalopatia de Wernicke. Alexander-Kaufman et al., 2007 mostraram modificações nos níveis de proteínas no Vérnis Cerebelar, dentre estas haviam enzimas dependentes de tiamina. Dados anteriores, obtidos pelo nosso grupo (Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular - LaNeC - UFMG) mostraram que a deficiência em tiamina altera o proteoma talâmico e que algumas das alterações observadas estão relacionadas com o desempenho do animal em tarefas de navegação espacial. Além da importância de reproduzir esses dados preliminares, o presente trabalho representa uma continuidade desse estudo, no sentido de identificar e caracterizar uma das proteínas alteradas. Vários pesquisadores, incluindo o nosso grupo de pesquisa, têm investigado os efeitos deletérios da deficiência em tiamina sobre o sistema nervoso, e os dados obtidos mostram alterações neuroquímicas e cognitivas (déficits no aprendizado e na memória), sendo o tálamo uma das primeiras regiões a ser afetada. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis por essas lesões/disfunções precisam ser estudados detalhadamente.

Ao identificar alterações na expressão de proteínas do tálamo em modelo experimental com deficiência em B1, novas hipóteses podem ser formuladas sobre os mecanismos moleculares que induzem as lesões causadas pela deficiência em tiamina. Além disso, a análise conjunta do perfil proteômico do tálamo e do desempenho de ratos em tarefas que envolvam aprendizagem e memória pode contribuir para compreender o aparato molecular envolvido no déficit cognitivo observado. Outra contribuição que justifica a relevância do presente estudo é a possibilidade de se compreender o papel da tiamina em processos cerebrais específicos, relacionados ou não à cognição espacial. Em casos de uma associação significativa com aspectos da aprendizagem e/ou memória, destaca-se também a possibilidade de esclarecimento sobre as bases neurobiológicas desses processos cognitivos.

OBJETIVOS

GERAL

Estudo do efeito de um episódio de deficiência grave de tiamina sobre o perfil proteômico do tálamo, com identificação e caracterização de proteínas talâmicas cuja expressão esteja associada com aspectos cognitivos espaciais.

ESPECÍFICOS

- Reproduzir os achados obtidos em estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, relacionados aos efeitos da deficiência grave de tiamina sobre o:
 - desempenho dos animais em tarefa de navegação espacial;
 - perfil proteômico do tálamo
- Identificar e caracterizar proteína(s) que apresenta(m) expressão(ões) alterada(s) no tálamo de ratos com deficiência grave de tiamina.
- Avaliar as relações entre a(s) alteração(ões) protéica(s) e o desempenho de ratos em tarefas de aprendizagem e memória espacial.

MATERIAL E MÉTODOS

MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados um total de 28 ratos machos, sendo 14 ratos no primeiro experimento e 14 no segundo experimento, réplica do primeiro. Os dados comportamentais apresentados são referentes aos dois experimentos (N=28). Os dados da análise proteômica e do *Western Blot* são provenientes apenas do 2º experimento (réplica, n=14). Os animais, com aproximadamente três meses de idade, foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O biotério de experimentação localiza-se dentro do Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular- LaNeC. A luminosidade foi controlada com ciclo 12/12h - claro/escuro. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (22x30x40cm³), com 3 ratos cada, dispostas sobre prateleiras em uma estante de aço inoxidável.

O planejamento amostral da pesquisa, em relação ao dimensionamento numérico das amostras, foi realizado de acordo com o descrito por outros autores (Norman e Streiner, 2008; Almeida e Fontelles, 2010). Para o cálculo do tamanho amostral foi adotada a fórmula $N=1+[2C*(s/d)^2]$, onde o poder do teste foi de 95%, *i.e.*, $z\beta= 1,645$ e $z\alpha= 1,96$. O cálculo considerou o poder do teste e o nível de significância $C = (1,96 + 1,645)^2 = 12,996$. O desvio foi de 36% (s) e a diferença entre os grupos foi de 50% ou 0,5 (d). Desta forma, para $N=1+[2C*(s/d)^2]$ temos: $N= 1+[2*12,996*(0,36/0,5)^2] = 14,47$ ou de 14 a 15 ratos/grupo.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: I - controle (C, n = 14): animais tratados com ração padrão e injeções diárias de solução salina, II - deficiente em tiamina (DT, n = 14): animais tratados com ração deficiente em tiamina e injeções diárias de piritiamina (0,25 mg/kg, *Sigma*[®]) que é um inibidor da enzima responsável pela produção da forma ativa de tiamina.

As rações, com e sem tiamina, foram produzidas no próprio laboratório de acordo com os requerimentos descritos por Warner (1962), sendo que a composição da ração deficiente em tiamina difere da ração padrão apenas em relação à ausência de tiamina (Tabelas 1, 2 e 3).

O critério para interromper o episódio de deficiência em tiamina foi a apresentação de sinais neurológicos desta deficiência, ou seja, perda do reflexo de endireitamento e/ou convulsão, o que foi detectado primeiro (Mosseau et al., 1996; Ciccia e Langlais, 2000). Após um período de um mês, para recuperação dos sinais clínicos da deficiência, os animais dos dois grupos foram submetidos ao LAM onde foi avaliado o aprendizado espacial. Finalizados os testes, os animais foram mortos por decapitação para a avaliação dos níveis de proteínas do

tálamo. A figura 12 representa o resumo do delineamento experimental até o momento da eutanásia. Todos os procedimentos experimentais adotados neste trabalho estão em concordância com as normas internacionais de uso de animais em laboratório (*National Research Council*, 1985) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG).

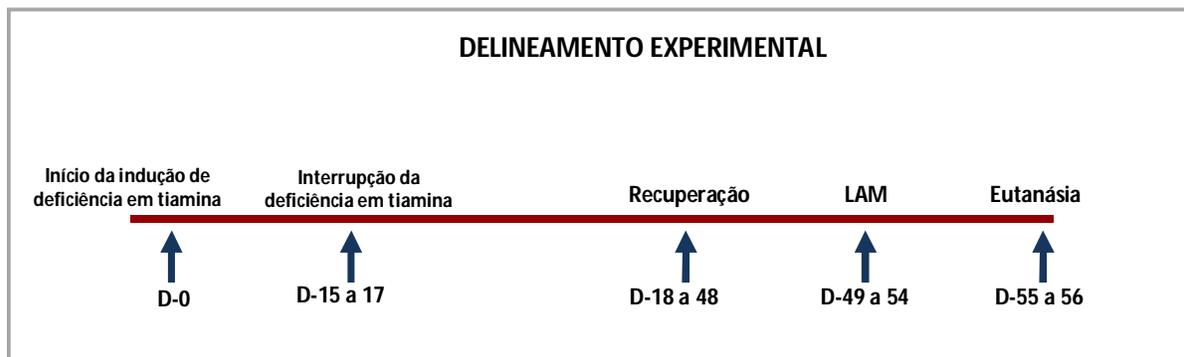


Figura 12. Delineamento experimental: D = Dia, D0: Primeiro dia de experimento. LAM: Labirinto Aquático de Morris. Esse delineamento foi executado em dois experimentos independentes ($N_{\text{total}}=28$), sendo $n=14$ (grupos C: $n=7$ e DT: $n=7$) para cada um deles.

Tabela 1. Composição da ração padrão produzida no laboratório.

Nutrientes	Quantidade em g/Kg de ração
Amido de Milho	507
Polvilho	169
Caseína*	200
Óleo de Soja	50
Mistura de Sais**	50
Mistura de Vitaminas***	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, seca e triturada antes do uso para garantir a ausência de vitamina B1 na mesma.

** A composição da Mistura de Sais da ração produzida no laboratório está apresentada na tabela 2.

*** A composição da Mistura de Vitaminas da ração produzida no laboratório está apresentada na tabela 3.

Tabela 2. Composição da mistura de sais da ração padrão produzida no laboratório.

Sais minerais	% por mistura de sais
NaCl	13,93
KI	0,08
MgSO₄.7H₂O	5,73
CaCO₃	38,14
MnSO₄.H₂O	0,40
FeSO₄.7H₂O	2,70
ZnSO₄.7H₂O	0,05
CuSO₄.5H₂O	0,05
CoCl₂.6H₂O	0,02
KH₂PO₄	38,90

Tabela 3. Composição da mistura de vitaminas da ração padrão produzida no laboratório.

Vitaminas	% por mistura de vitaminas
Acetato de Retinol	0,40
Colecalciferol	0,06
Menadiona	0,05
i-Inositol	1,00
Niacina	0,40
Pantotenato de Cálcio	0,40
Riboflavina	0,08
Tiamina-HCl*	0,05
Piridoxina-HCl	0,05
Ácido fólico	0,02
Biotina	0,004
Vitamina B₁₂	0,0003
Sacarose	97,49

***ESTUDO COMPORTAMENTAL – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO
COGNITIVO DOS ANIMAIS: APRENDIZAGEM ESPACIAL***

Os estudos comportamentais foram realizados através de um experimento e uma réplica, contendo cada um deles 32 animais do primeiro experimento e 14 animais da réplica.

Portanto, os dados comportamentais apresentados se referem ao desempenho de 46 animais, sendo 23 controles e 23 deficientes de tiamina.

Equipamento

A tarefa de navegação espacial foi realizada no Labirinto Aquático de Morris, que consiste em uma piscina circular (labirinto) de fibra de vidro, com aproximadamente 1,80m de diâmetro, contendo água a 25°C até o nível de 30cm, conforme previamente descrito (Morris, 1981) (Figura 13). A piscina é dividida virtualmente em quatro quadrantes denominados noroeste (NO), sudoeste (SO), nordeste (NE) e sudeste (SE). Uma plataforma de escape, circular (15 cm de diâmetro) e de acrílico transparente foi fixada no centro de um desses quadrantes que, por isto, é denominado quadrante alvo (NE), a dois centímetros abaixo do nível da água. Para impedir a localização visual da plataforma, a água foi turvada com a adição de 80 g de leite em pó. A piscina não possui nenhuma pista, marca ou sinal interno. A mesma se encontra alocada numa sala de 3m x 3m, com pistas estáveis visuais extra labirinto que servem de referência para que o animal localize a plataforma. Uma câmera de televisão com lente angular (lente de curto alcance, mas com amplo campo de visão) foi fixada no teto da sala, bem acima da piscina, para registrar o desempenho dos animais durante cada sessão do treino e do teste.

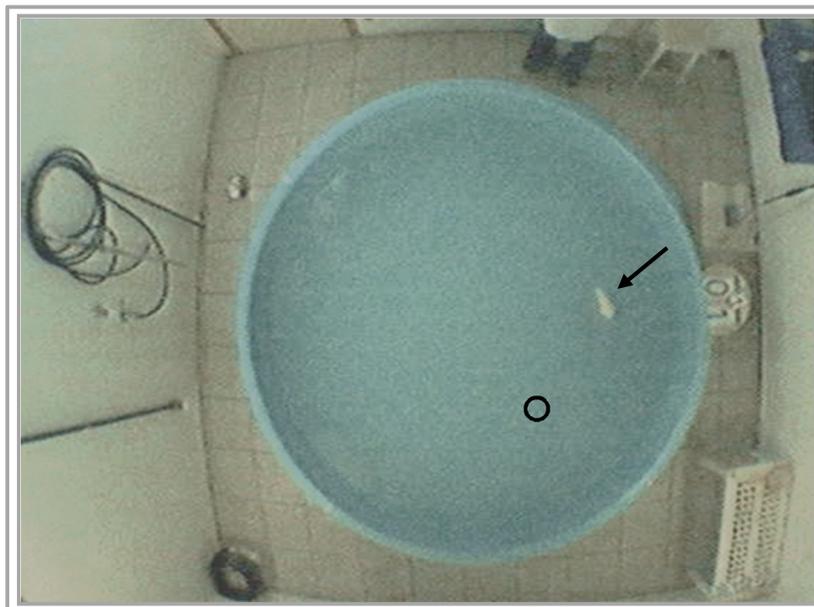


Figura 13. Foto da sala onde são realizados os testes no Labirinto Aquático de Morris. Nessa foto pode-se observar: a piscina=labirinto no centro da sala e algumas das pistas visuais extra labirinto (por exemplo, torneira e mangueira à esquerda, caixa azul à direita). O círculo e a seta preta foram desenhados sobre a foto para indicar a localização da plataforma submersa e um animal nadando, respectivamente.

Experimento: treino - Aprendizagem Espacial

Foram realizadas cinco sessões de treinos, uma por dia em dias consecutivos, sendo que cada sessão foi constituída por 4 tentativas. Cada tentativa teve uma duração máxima (teto) de 60 segundos. Em cada tentativa, o animal foi colocado na piscina em uma posição cardinal diferente, sinalizada na borda (norte, sul, leste, oeste) com o focinho voltado para a parede da piscina. A tentativa era finalizada quando o animal encontrava a plataforma no quadrante alvo (NE), ou quando o tempo de 60" era atingido. Se o tempo máximo fosse atingido o animal era gentilmente conduzido até a plataforma pelo experimentador (Figura 14). Depois de encontrar ou ser guiado até a plataforma, os ratos eram deixados neste local por 15 segundos e, em seguida, retirados da piscina.



Figura 14: Imagem mostrando um rato sobre a plataforma submersa após encontrá-la ou ser conduzido até ela.

O intervalo entre as tentativas foi de aproximadamente 12 minutos. Todas as sessões foram gravadas e, posteriormente, as imagens analisadas em programa de computador (analisador de imagens), obtendo-se, assim, a “latência” (tempo gasto, em segundos, para o animal encontrar a plataforma). Portanto, o desempenho cognitivo do animal foi expresso em latência (s). Quanto menor a latência, melhor o desempenho do animal. A figura 15 exemplifica o desempenho do animal, através do trajeto realizado, no início do treino e após aprender a tarefa. O trajeto, apesar de não ter sido utilizado para avaliar o desempenho, está indicado na figura para demonstrar o motivo da latência ir diminuindo ao longo do aprendizado.

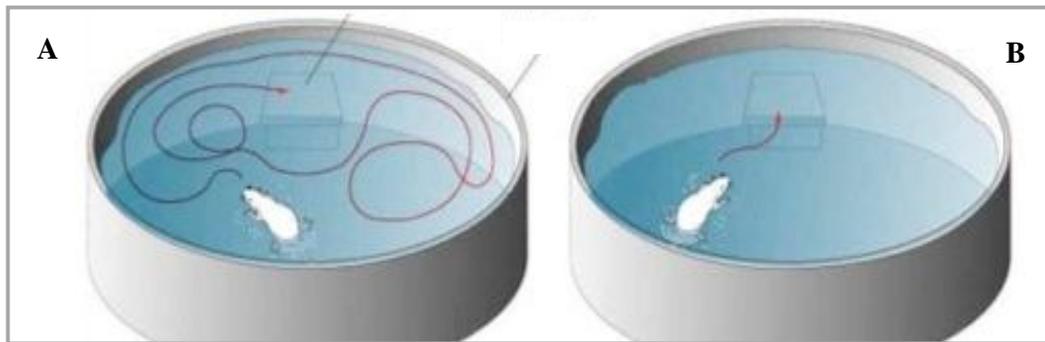


Figura 15. Esquema mostrando o LAM e o desempenho do animal no início do treino (A) e após aprender a tarefa (B). A linha representa o trajeto do rato no LAM até encontrar a plataforma.

DISSECAÇÃO DO CÉREBRO: OBTENÇÃO DO TÁLAMO

Um dia após o teste comportamental, 14 animais, 7 de cada grupo, do segundo experimento (réplica), foram submetidos à eutanásia por decapitação, sem sedação. Os cérebros foram rapidamente retirados da cavidade craniana e os tálamos foram dissecados de acordo com as coordenadas estereotáticas apresentadas por Paxinos e Watson (1986). As amostras foram então armazenadas a -80°C para a posterior realização dos ensaios bioquímicos: análise proteômica, *PCR* em Tempo Real e *Western blot*, conforme detalhado abaixo. As amostras de tálamo dos outros 14 animais, do primeiro experimento, foram utilizadas em estudo prévio, em ensaios por eletroforese bidimensional, onde foram pela primeira vez observados os efeitos da deficiência em tiamina sobre os níveis de 16 proteínas talâmicas (Resende, 2012), figura 1 presente nas considerações gerais.

ANÁLISE PROTEÔMICA

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de tálamo provenientes dos 14 animais do experimento réplica, como mencionado acima, 7 controles e 7 deficientes de tiamina, foram preparadas como descrito por Paulson et al., (2004). Cada tálamo foi homogeneizado em clorofórmio/metanol/água (4/8/3, v/v/v), a suspensão foi agitada continuamente por 1 hora e centrifugada à $478,1 \times \text{rcf}$ (*Relative Centrifugal Force* = g) (Centrífuga Sorval RC 5B – rotor Sorval SS-34) durante 10 minutos. O sobrenadante, contendo os lipídeos, foi descartado e esse processo de deslipidização foi repetido por mais duas vezes. O precipitado foi seco à $\pm 4^{\circ}\text{C}$ durante a noite. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em 100 μL tampão da amostra contendo: uréia 7 M, tiouréia 2 M, 1% C7bZO e Tris 40 mM. O objetivo desta etapa foi fazer a extração de proteínas. As amostras foram incubadas neste tampão por 4 horas e, após, centrifugadas à

2.988 x rcf durante 5 minutos e, após, o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada pelo Método de Lowry (Lowry et al., 1951).

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

O protocolo para a eletroforese bidimensional, figura 16, foi seguido conforme descrito anteriormente por Wildgruber et al. (2000). As amostras (600 µg de proteínas) foram solubilizadas em 200 µl de tampão de reidratação (uréia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, IPG 0,5%, azul de bromofenol 0,002%) e aplicadas às tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG *strips*, 11 cm, pH 3-11 NL) (*GE Healthcare, Pittsburgh, Pennsylvania, USA*) por 12 horas à temperatura ambiente.

A focalização isoeletrica foi realizada na unidade IPGphor (*Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, E.U.A*) seguindo os seguintes parâmetros: 50 V durante 8 h, 500 V durante 1 h, 1000 V durante 1 h e 30 min, 8000 V e, finalmente, 8.000 V para um total de 35 Milvolts/hora (MVH) por 1 h e para finalizar 500 V pelo tempo de 24 h. Antes da segunda dimensão, as tiras foram submersas duas vezes, por 15 min cada, em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM, pH 8.8, uréia 6M, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,002%, SDS 2%), contendo, na 1ª vez: DTT 1% (p/v) e, em seguida, na 2ª. vez: iodoacetamida 3% (p/v).

Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida 12,5% no *Vertical Electrophoresis System Midi* (*BioAmerica Equipments, Miami, Florida, USA*) *Model: BIOAVS-17G*. As tiras IPG foram mergulhadas por um minuto no tampão de corrida e, em seguida, posicionadas horizontalmente no topo do gel e cobertas com solução de agarose morna (agarose 0,5%, SDS 1% e traços de azul de bromofenol) para selar. A eletroforese foi feita limitando-se a corrente a 120 volts até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel.

Após eletroforese, as proteínas foram fixadas no gel por duas horas, nas seguintes condições: uma hora e meia (3 X 30 minutos) em solução de etanol 30%, ácido ortofosfórico 2%, em seguida, mais 30 minutos (3 X 10 minutos) em ácido fosfórico 2% e, finalmente, mais 30 minutos na solução de ácido fosfórico 2%, etanol 18%, sulfato de amônio. Após a etapa de fixação, os géis foram corados com *Coomassie Blue Coloidal 12% (G250 Sigma®)* por cinco dias.

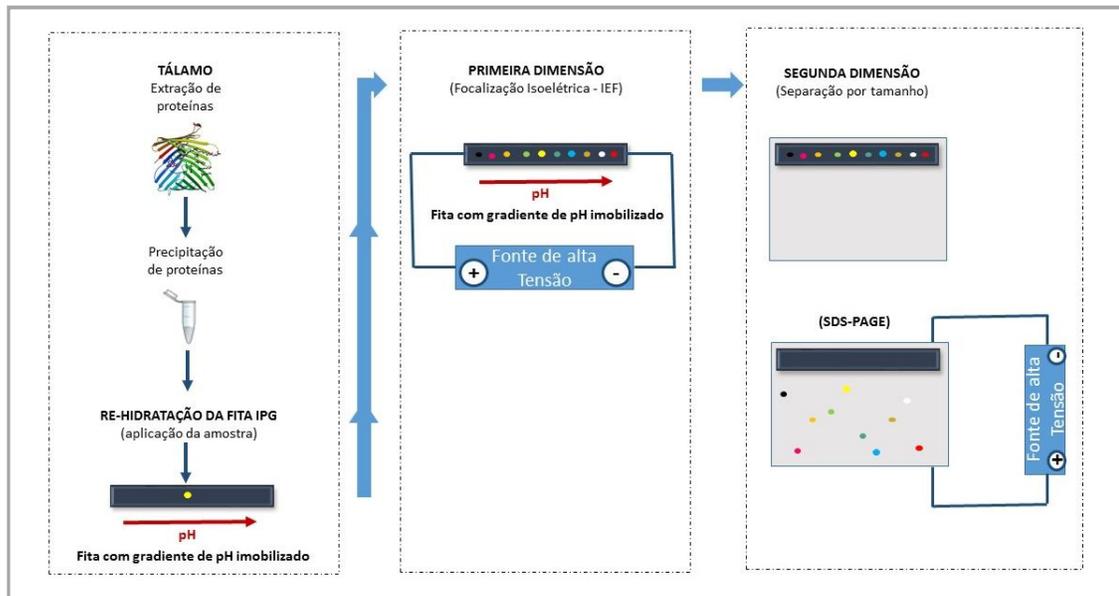


Figura 16. Esquema apresentando as etapas para separação de uma mistura de proteínas por Eletroforese Bidimensional. Na primeira dimensão as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos em gel em gradiente de pH. Posteriormente, essas proteínas são separadas, em uma 2ª dimensão, de acordo com suas massas moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE).

EXCISÃO DE SPOTS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS, DESCOLORAÇÃO E DIGESTÃO PROTEICA IN GEL

A excisão dos *spots* de interesse foi feita manualmente com o auxílio de uma ponteira de tamanhos *P1000* ou *P200* de acordo com o diâmetro do *spot*. Todos os procedimentos foram feitos sobre placas de vidro limpas e a ponteira foi trocada a cada excisão para evitar qualquer tipo de contaminação. Cada *spot* foi fragmentado com auxílio de uma lâmina de bisturi e, em seguida, transferido para um tubo *Eppendorff*.

A descoloração dos géis foi feita adicionando 200 µl de bicarbonato de amônio 200 mM em acetonitrila 40% aos fragmentos de gel e incubando em banho-maria a 37 °C, durante 30 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes até a descoloração completa dos géis. Em seguida, a solução do tubo foi descartada e o fragmento de gel foi seco em centrífuga à vácuo por cerca de 20 minutos.

A digestão das proteínas foi feita em solução de tripsina previamente reconstituída com HCl 1 mM. Nesta, à tripsina do frasco, 20 µg da enzima liofilizada, (*Sigma*[®] - *Trypsin proteomics grade*) foi adicionado 100 µl de HCl 1mM, em seguida foi adicionado 900 µl de bicarbonato de amônio 40 mM em solução aquosa de acetonitrila 9%. A concentração final de tripsina foi de 20 µl/ml.

Vinte microlitros dessa solução, ou seja, 0,4% de tripsina foram adicionados a cada tubo contendo as amostras, de forma a cobrir os fragmentos de gel. Estes ficaram incubados por 1 hora em gelo para que a tripsina penetrasse no gel sem que a digestão iniciasse. Após a completa reidratação, as amostras foram retiradas do gelo e colocadas em banho-maria a 37°C onde permaneceram *overnight* para completa digestão das proteínas. Ao fim deste período, a solução de tripsina, contendo também os peptídeos, foi recolhida de cada tubo e transferidas para um novo tubo rotulado.

A mistura de peptídeos foi então purificada, para retirada de contaminantes como sal, detergente e açúcares da amostra, utilizando uma coluna *ZipTip C18 (Millipore, Billerica, MA, USA)*. A ponteira foi lavada duas vezes com 8 µl de acetonitrila 100% com o objetivo de ativar a coluna. Em seguida, lavada cinco vezes com 10 µl de ácido trifluoracético 0,1% para equilibrar a coluna. Para os peptídeos ficarem retidos na coluna, a amostra - solução de tripsina com os peptídeos - foi homogeneizada 15 vezes com a pipeta. Em seguida, para remoção dos contaminantes, retido na coluna com os peptídeos, esta foi lavada três vezes com ácido trifluoracético 0,1%. Os peptídeos foram eluídos da coluna em 5 µl de solução 50% acetonitrila e 0,1% ácido trifluoracético (5 µL TFA em 2.5 mL H₂O milliQ + 2.5 mL ACN 100%) e o eluato coletado em um novo tubo.

ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI –LIFT-TOF-TOF E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados utilizando um espectrômetro de massas do tipo *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI- LIFT - TOF/TOF-MS) AutoFlex III* equipado com *smart beam (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)*. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo refletido e registrados pelo programa *Flex Controlv. 3.0*. Os peptídeos foram aplicados sobre a placa do espectrômetro de massas com matriz constituída de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e depois de cristalizados, como mencionado, foram analisados por espectrometria de massa. O *MALDI LIFT-TOF/TOF* inicialmente fragmenta os peptídeos gerando um espectro que representa o *peptide mass fingerprints (PMFs)* que fornece alta sensibilidade à impressão digital da massa do peptídeo. Posteriormente, uma segunda aceleração é realizada de forma a gerar o sequenciamento de um dos fragmentos do espectro anterior que apresentava elevado grau de rendimento e de sensibilidade (Suckau et al., 2003).

Os fragmentos dos peptídeos foram sequenciados no modo *LIFT* e os espectros resultantes foram submetidos à pesquisa no banco de dados *Mascot* (*Matrix Science Ltd. London, UK*), admitindo $score \geq 60$ (correspondente ao $p \leq 0,05$). Os seguintes parâmetros foram utilizados para refinar a pesquisa: enzima - tripsina, base de dados - NCBIinf, taxonomia - *Rattus*, modificações fixas - carbamidometil, modificações variáveis - oxidação.

WESTERN BLOT (WB)

O experimento de WB foi realizado como descrito por Ribeiro et al., (2010). Após a realização da 2-DE, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de *Polyvinylidene fluoride membrane* (PVDF), por *electroblotting*, através do sistema *Trans Blot-turbo/Transfer System* (BioRad). A membrana e o gel foram hidratados com tampão de transferência (Tris-glicina 1X com metanol 20%) por 10 min e a montagem para a transferência foi feita da seguinte forma: papel de filtro – membrana – gel – papel de filtro. A transferência foi realizada nas seguintes condições: 25 V; 1,0 A; 30 min. Terminada a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 10% em tampão de lavagem (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10mM, pH 7,0 e de Triton™ X100 0,075%) *overnight* e, em seguida, incubadas por 2 horas com anticorpo primário anti-VDAC (*Catalog Number-AB10527 Millipore*) na diluição de 0,1:1000, em tampão de lavagem contendo 3% leite desnatado. As membranas foram então lavadas 3 vezes por 5 minutos com tampão de lavagem.

Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-coelho conjugado (*Catalog Number-AQ132P Millipore*) com peroxidase na diluição de 0,2:1000 em tampão de lavagem contendo 3% de leite desnatado. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com tampão de lavagem. A detecção dos *imunoblots* foi realizada pelo processo de quimioluminescência. A membrana foi incubada em solução do Kit ECL *plus*, por 5 minutos, e a revelação da membrana finalizada com *Image Quant LAS 400* (GE). A densidade relativa dos *spots* relativos à VDAC foram analisados pelo programa *Image J*. O *Image J* é um programa de processamento de imagem. É um *software* de domínio público, disponível gratuitamente em <http://imagej.nih.gov/ij/>.

ANÁLISE MOLECULAR POR PCR EM TEMPO REAL

EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

As amostras de tálamo foram descongeladas e mantidas em gelo (4 °C) até o início das extrações. Foi colocado 1,0 mL de TRizol[®] (*Invitrogen*, São Paulo, Brasil). Foram homogeneizados durante 90 segundos (*Sonics – Vibra-Cell VCX130-Sonics & Materials, Newtown, USA*). Após, a suspensão ficou em temperatura ambiente (20-25 °C) por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, agitado por inversão por 15 segundos e incubado por mais 2-3 minutos a temperatura ambiente. Depois, foi centrifugado a 17.210,7 x rcf por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e foram adicionados 0,5 mL de isopropanol 100%, misturado por inversão durante 15 segundos e incubado por mais 10 minutos à temperatura ambiente. A centrifugação foi feita a 17.210,7 x rcf por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente, ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 75% gelado, misturado por inversão e centrifugado a 6.722,9 x rcf durante 5 minutos a 4 °C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o precipitado foi seco por aproximadamente 20 a 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 20 µL de água ultra pura[®] (*Qiagen*, São Paulo, Brasil). O RNA total foi quantificado utilizando *NanoDrop ND-2000v3 1.0*[®] (*Thermo Fisher Scientific*). As amostras utilizadas apresentaram razão 260/280 nm \geq 1,6.

DESENHO DOS INICIADORES

A sequência dos *exons* dos genes de interesse foi retirada dos bancos de dados *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e comparadas com as depositadas no *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Foram selecionados os *exons* adjacentes mais próximos a extremidade 3' do gene. A sequência foi colocada no programa Primer3 v0.4.0 (Rozen Skaletsky, 2000) disponível *on-line* no endereço <http://frodo.wi.mit.edu/> restringindo o tamanho do produto (70-150 bases), tamanho do iniciador (mínimo 19 bases, ótimo 20 bases e máximo 21 bases), TM (*Melting Temperature*/Temperatura de dissociação) mínimo 59 °C, ótimo 60 °C e máximo 61 °C), %GC (Porcentagem Citosina + Guanina: mínimo 20%, ótimo 50% e máximo 80%) e os demais parâmetros não foram alterados. Em seguida, os pares de iniciadores (Quadro 2) foram avaliados através do programa *NetPrimer* (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) a fim de se evitar pares com maior formação de dímeros, alças, palíndromos etc. Após, foi verificada a especificidade das sequências escolhidas através da análise por alinhamento (*Primer-BLAST*) disponível no endereço http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome.

CONFECÇÃO DO DNAC

A partir do RNA total extraído foi utilizado 2 µg de amostra em um volume final de 20 µL para a reação de confecção do DNA complementar (DNAC). Foi utilizado oligo(dT)₂₀ como iniciador (*Prodimol Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil*). Foi usada a enzima transcriptase reversa *RevertAid[®]H Minus* (*Fermentas, São Paulo, SP, Brasil*) conforme instruções do fabricante.

Quadro 2: Dados obtidos da avaliação dos pares de iniciadores através do programa *NetPrimer*.

Gene	5'– Sequência – 3'	Cromossomo		NM
		Rato	Humano	
Gyclo		14	07	017101
S	5'– CAAACACAAATGGTCCCAGT – 3'			
A	5'– GTCATGCCTTCTTTCACCT – 3'			
B-act		12	07	031144.2
S	5'– AGATTACTGCCCTGGCTCCT – 3'			
A	5'– ACATCTGCTGGAAGGTGGAC – 3'			
Hprt		X	X	012583.2
S	5'– CAGGCCAGACTTTGTTGGAT – 3'			
A	5'– TCCACTTTCGCTGATGACAC – 3'			
Vdac1		10	05	031353.1
S	5'– TGGCTACAAGACGGACGAAT – 3'			
A	5'– CAGGCGAGATTGACAGCAG – 3'			
Vdac2		15	10	031354.1
S	5'– GGCTACAGGACTGGGGACTT – 3'			
A	5'– CCTGATGTCCAAGCAAGGTT – 3'			
Vdac3		16	08	031355.1
S	5'– TTGACACAGCCAAATCCAAA – 3'			
A	5'– CCTCCAAATTCAGTGCCATC – 3'			

NOTA: sequência dos iniciadores para os genes *Cyclo* (peptidylprolyl isomerase A – cyclophilin A), *Bact* (beta actin), *Hprt* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), *Vdac1* (*Voltage-dependent anion-selective channel protein 1*), *Vdac2* (*Voltage-dependent anion selective channel protein 2*), *Vdac3* (*Voltage-dependent anion-selective channel protein 3*). S: senso. A: antisenso. NM corresponde ao número de acesso da sequência de referência do RNAm.

PCR EM TEMPO REAL

Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*): as reações a partir das amostras extraídas do tálamo de animais controles e deficientes foram feitas no 7900 HT[®] *Fast Real Timer PCR* (*Applied Biosystems, São Paulo, Brasil*). Em todas as reações foi utilizado *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, São Paulo, Brasil*). Foi adotado protocolo sem etapa de extensão (95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos por 40 ciclos), sendo a captação da fluorescência feita na temperatura de 60 °C. Foi feita uma curva de diluição em 5 concentrações (50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng e

3,125 ng) para cada gene analisado, sendo os reagentes para as reações pipetados em triplicata para a curva e em duplicata para os demais procedimentos. O coeficiente de correlação mínimo adotado foi de 0,90. Em todas as reações foi feito um controle negativo, i.e., sem amostra (NTC: *No Template Control*/Controle sem fita molde) e o volume da reação mantido em 5 μ L. As curvas de dissociação foram analisadas e não foi verificado nenhum produto espúrio nem dímeros de iniciador. A concentração escolhida foi de 12,5 ng de acordo com a melhor eficiência relativa.

NORMALIZAÇÃO DOS DADOS DA PCR EM TEMPO REAL

Foram utilizados 3 genes constitutivos ou de referência (B-act – β -actina; Cyclo ou PpiA – peptidilprolil isomerase A; Hprt - hypoxanthine phosphoribosyltransferase) para normalizar os níveis de RNAm dos genes alvo. Esses genes foram escolhidos com base na estabilidade (i.e., menor variabilidade) e no nível de transcrição que apresentam no sistema nervoso central. Os ciclos limite ou *quantification cycle* (*Cq*) foram colocados em uma planilha do *Excel* e a quantidade relativa dos transcritos foi calculada conforme Vandesompele et al., (2002). Segundo esse cálculo, a média aritmética das réplicas é transformada em quantidade relativa da amostra considerando a eficiência da curva de diluição para cada gene. A amostra com o menor *Cq* é considerada como o valor máximo (igual a 1) e é tida como referência para o cálculo das quantidades relativas das demais amostras. Depois essas quantidades relativas foram normalizadas dividindo-as pela média geométrica dos 2 genes de referência (fator de normalização). Esse procedimento foi feito para cada gene alvo separadamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos ao aprendizado no LAM foram analisados por ANOVA 2 x 5, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: deficiência em tiamina (dois níveis) e desempenho nas cinco sessões consecutivas de treino.

Para a comparação da expressão proteica entre o grupo controle e DT foi realizada a normalização dos *spots*, ou seja, a intensidade óptica de cada *spot* foi mensurada pela somatória dos “*pixels*” dentro da área do *spot* (volume do *spot*) e convertida para uma porcentagem em relação à intensidade do total de *spots* do gel. Dessa forma os dados foram analisados em $\%V = (\text{volume } spot / \sum \text{volumes de todos os } spots \text{ presentes no gel})$. A distribuição gaussiana dos dados foi verificada considerando os valores de porcentagem de volume dos *spots*. O teste t de *Student* foi utilizado para verificar se houve diferença

significativa no volume relativo de cada proteína entre o grupo controle e deficiente em tiamina. Essa avaliação foi realizada utilizando o programa de análise de imagens *Image Master™2D Platinum v. 6.0* (GE Healthcare, Pittsburgh, Pennsylvania, USA).

Foram feitas análises de regressão linear entre os valores de porcentagem de volume dos *spots* que apresentaram níveis de expressão alterados com a latência no LAM na terceira e na quarta sessão.

Os resultados dos testes comportamentais foram analisados através do programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 12.0.

Dados obtidos no PCR: A distribuição da normalidade foi testada através do teste de *Kolmogorov-Smirnov* e a homocedasticidade da variância pelo teste de *Lilliefors*. A quantidade relativa de RNAm normalizada para cada gene candidato foi comparada usando teste *t* para amostras independentes. As análises foram realizadas com o programa *STATISTICA v. 6.1* (Statsoft, São Caetano do Sul, Brazil). O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$. Em todos os testes as diferenças foram consideradas significativas no nível de 5 % ($p < 0,05$).

RESULTADOS

ESTUDO COMPORTAMENTAL – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO COGNITIVO DOS ANIMAIS: APRENDIZAGEM ESPACIAL

O resultado da aquisição da tarefa espacial nas cinco sessões de treino no LAM está expresso em latência (segundos), tempo gasto pelo animal para encontrar a plataforma.

O teste ANOVA com medidas repetidas no último elemento (2x5), fatores: deficiência em tiamina e sessões) mostrou efeito significativo do tempo ($F_{(40,4)} = 28,7$; $p=0,000$), e da deficiência em tiamina ($F_{(43,1)} = 6,6$; $p=0,013$) (Figura 17). As análises estatísticas mostraram que o desempenho dos animais do grupo controle foi significativamente melhor quando comparado ao grupo deficiente em tiamina na primeira ($t = 2,34$, $p = 0,022$), na terceira ($t = 2,94$, $p = 0,005$) e na quarta sessão ($t = 2,71$, $p = 0,01$).

Embora os ratos com deficiência em tiamina tenham apresentado um pior desempenho na aprendizagem que os ratos controle, eles foram capazes de aprender a tarefa, uma vez que na quinta sessão não houve diferença significativa ($t = 1,0$, $p = 0,33$) entre os desempenhos dos ratos dos dois grupos.

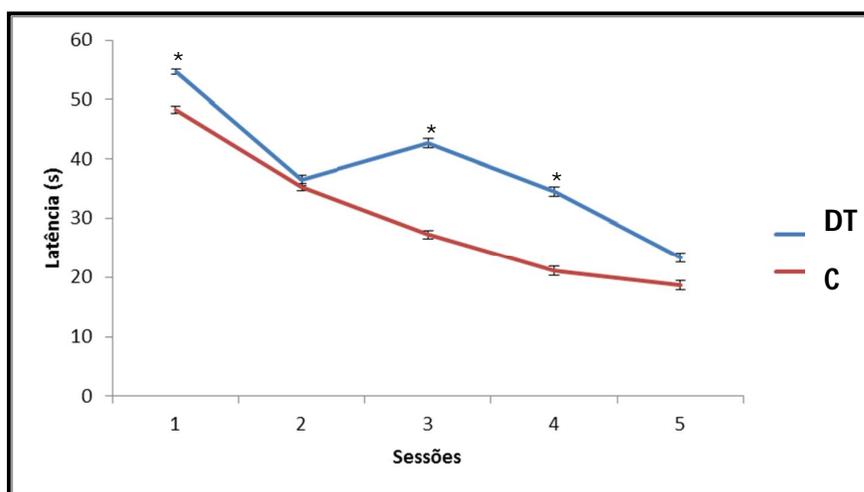


Figura 17. Curvas de aquisição da tarefa no Labirinto Aquático de Morris. As latências em segundos estão representadas como a média do grupo \pm erro padrão ($n=46$ /referentes a 32 animais do primeiro experimento e 14 da réplica), ao longo das cinco sessões do treino.

ANÁLISE PROTEÔMICA

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A Figura 18 mostra o perfil de proteínas (réplica) detectado por eletroforese bidimensional. As amostras utilizadas são proteínas extraídas de tálamos de ratos dos grupos

controle (painel A) e do grupo DT (painel B). A primeira dimensão foi realizada em tiras IPG de 11 cm faixa de pH 3 a 11 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12,5% em presença de SDS. Os géis foram corados com *Coomassie*. Os retângulos nas laterais da figura representam um aumento da área do gel para melhor visualização do *spot* 8105 apontado pela seta preta.

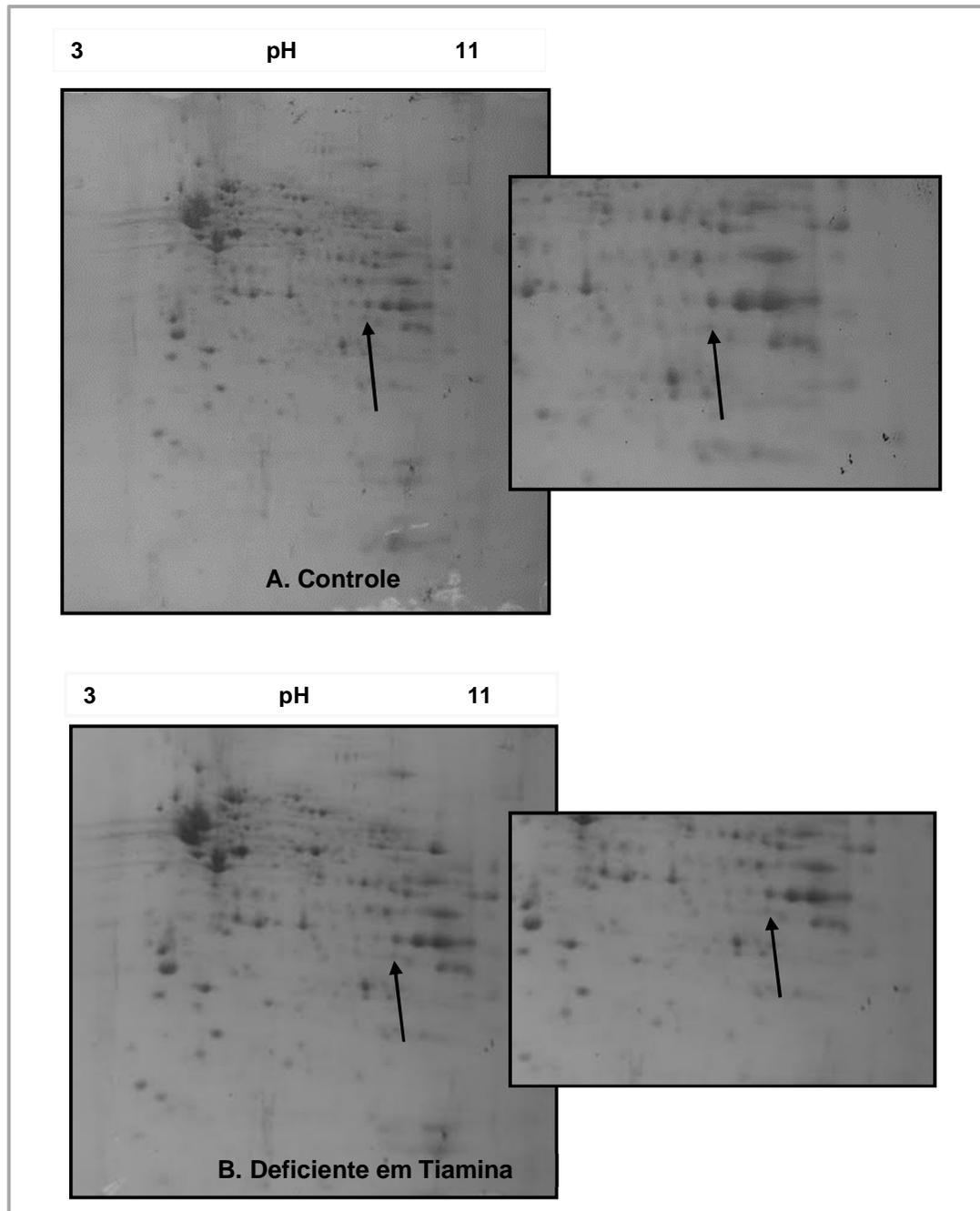


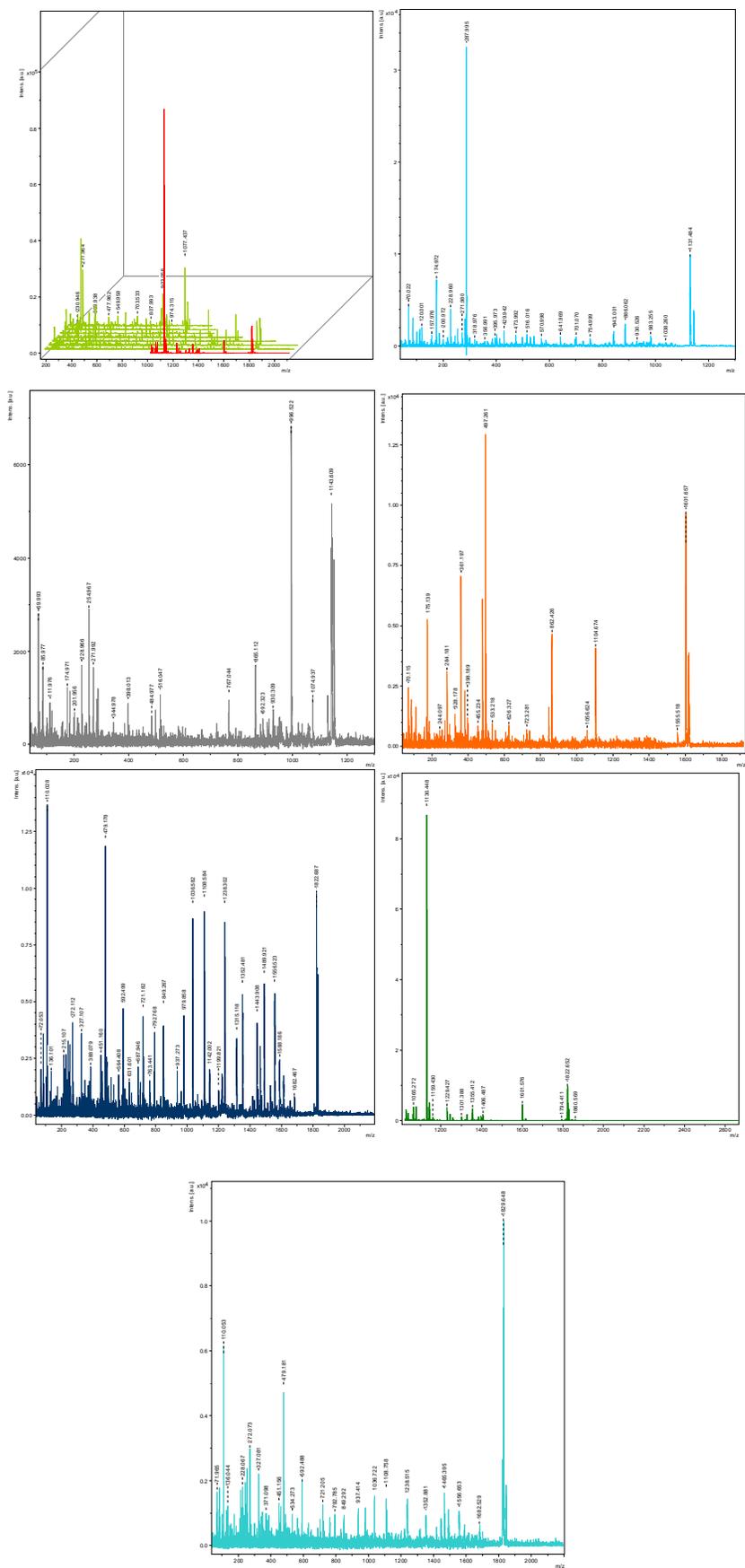
Figura 18. Imagem do gel 2-DE retratando o perfil de proteínas dos tálamos de ratos dos grupos controle (painel A) e do grupo DT (painel B).

ANÁLISE PROTEÔMICADADOS DA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI –LIFT-TOF-TOF E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

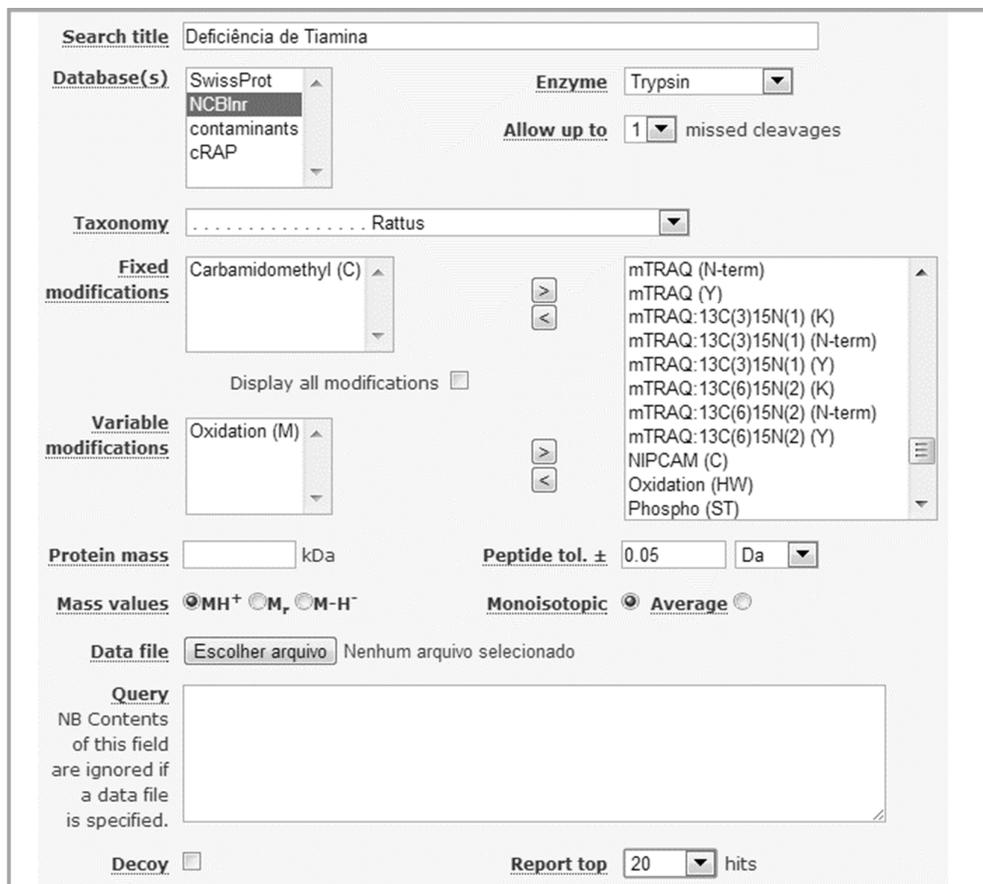
Através da espectrometria de massa o *spot* da proteína 8105 foi identificado. As informações obtidas do *spot*, ou seja, as relações massa/carga (m/z) e intensidade dos picos obtidos no espectro de PMF e o sequenciamento obtido pelo *MS/MS* foram compiladas em um arquivo texto (extensão txt). Esse arquivo foi usado para realizar a busca no banco de dados, através do programa *Mascot*. A figura 19 representa os espectrogramas gerado pelo *MALDI / TOF-TOF* da proteína correspondente ao *spot* 8105.

Uma vez anexado o arquivo com a informação espectral um banco de dados é pesquisado para identificar a proteína. Neste estudo foi utilizado o *Mascot*, um *software* de referência para identificação e caracterização de proteínas utilizando dados de espectrometria de massa. Este *Software* proporciona excelentes resultados a partir de picos produzidos por instrumentos de diferentes fabricantes incluindo o *Bruker Daltonics* utilizado para este experimento. O *Mascot* pode ser acessado gratuitamente em <http://www.matrixscience.com/>. O *software* trabalha com algoritmo do tipo aproximação probabilística, de modo que é calculada a probabilidade com que o *match* (alinhamento) observado entre o dado experimental e os dados do banco escolhido seja um evento randômico. Assim, o *match* que apresentar a menor probabilidade de ser um evento aleatório é considerado melhor, indicando a proteína procurada para o dado experimental.

A busca foi realizada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* através do *Mascot* (<http://www.matrixscience.com>). Foi selecionada a taxonomia *Rattus* (acesso 20/05/2013). Os parâmetros de busca utilizados no *Mascot* foram: (i) peptídeos trípticos com ausência de um único fragmento; (ii) ausência de restrições no peso molecular da proteína; (iii) taxonomia *rattus*; (iv) oxidação da metionina e carbamidometilação da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente por causa das modificações dos resíduos de cisteína reduzidos e alquilados com iodoacetamida para carbamidometilação, e a oxidação da metionina, que ocorre comumente nos resíduos da metionina durante a SDS-PAGE; (v) valores de massa monoisotópica; carga do peptídeo 1+; e tolerância de 0,05% da massa do *MS* e do *MS/MS*.



O *score* global do *MASCOT* que correspondente à significância estatística de $p < 0,05$ foi utilizado para validar a identificação da proteína. A escolha destes parâmetros está presente na figura 20, uma imagem da captura de tela (*print screen*) da página de acesso ao *MASCOT*.



The screenshot shows the MASCOT search interface with the following parameters:

- Search title:** Deficiência de Tiamina
- Database(s):** SwissProt, NCBInr (selected), contaminants, cRAP
- Enzyme:** Trypsin
- Allow up to:** 1 missed cleavages
- Taxonomy:** Rattus
- Fixed modifications:** Carbamidomethyl (C)
- Variable modifications:** Oxidation (M)
- Protein mass:** kDa
- Peptide tol. ±:** 0.05 Da
- Mass values:** MH⁺ (selected), M, M-H⁻
- Monoisotopic:** Average (selected)
- Data file:** Escolher arquivo (None selected)
- Query:** (Empty text box)
- Decoy:** (unchecked)
- Report top:** 20 hits

Figura 20: Imagem da captura de tela (*print screen*) da página de acesso ao *MASCOT*. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados, no presente estudo, para as buscas realizadas com os dados obtidos por *MALDI-TOF-TOF*.

Uma vez concluída a busca de acordo com a sistemática do programa, o *Mascot* informa o resultado, usando para isso um gráfico de barras para as quais existe um valor (*score*) tido como limite de confiança. Escores abaixo deste valor limite indicam eventos randômicos, ou seja, sem valor estatístico. Por outro lado, se o escore atribuído para uma determinada proteína exceder o valor limite a chance de identificação gerada ser um evento randômico é de 5%. Quanto maior o *score* acima do limite, maior a probabilidade da identificação estar correta. A figura 21 apresenta o resultado da busca no banco de dados através de um histograma da identificação da Proteína VDAC1 (isoforma 1 da VDAC). As colunas vermelhas na vertical representam proteínas. No eixo X estão representados os valores de confiança na identificação destas proteínas (*Protein Score*). No eixo Y estão representados o número de eventos (*number of hits*) semelhantes encontrados para determinada proteína, ou

seja, a altura da barra vermelha indica a quantidade de proteínas com o mesmo *score* (valor de confiança). No histograma, os valores maiores que 34 indicam que as proteínas têm identidade ou extensa homologia com os peptídeos utilizados na pesquisa ($p < 0,05$). P é a probabilidade de se observar um evento correspondente aleatório. As proteínas presentes na área esverdeada não apresentam identidade com os peptídeos estudados, apenas alguma semelhança, sendo portanto, não significativo (Perkins, et al., 1999).

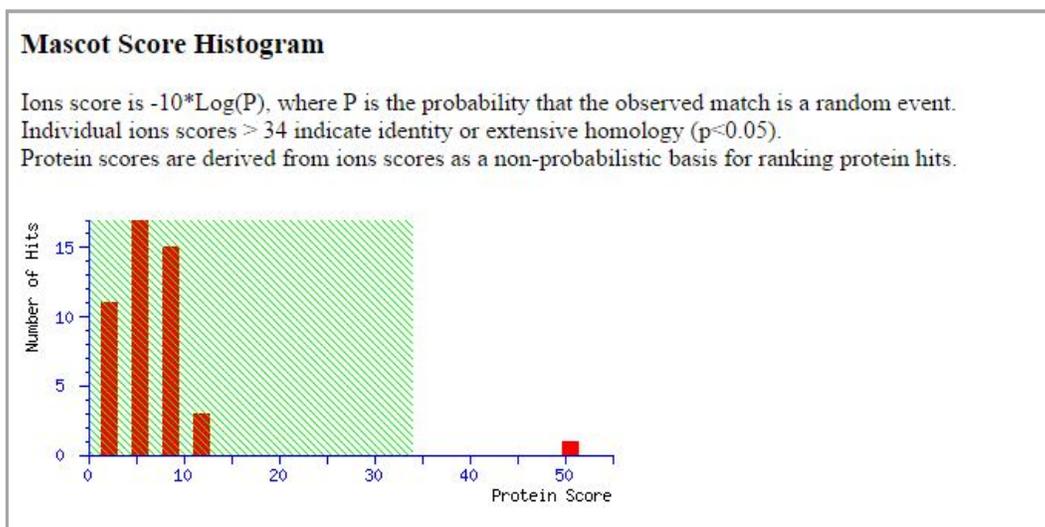


Figura 21: Histograma apresentado pelo programa *Mascot*. A área sombreada em verde indica eventos aleatórios de *matching* (alinhamento), enquanto que a barra vermelha fora da área sombreada com *score* 50, representa um evento não aleatório, ou seja, o *match* com maior probabilidade de identidade da proteína.

A proteína identificada foi o VDAC (Canal Aniônico Dependente de Voltagem) com pontuação 50 ($P < 0,005$) / NCBI: 20130519, com massa: 32060. No quadro 3 está a descrição dos parâmetros referentes à identificação da proteína, *spot* 8105, submetido à análise por *MALDI-TOF-TOF* e *Mascot*. Proteína VDAC1

Quadro 3: Descrição dos parâmetros referentes à identificação da proteína, *spot* 8105, submetido à análise por MALDI-TOF-TOF e *Mascot*. Proteína VDAC1.

SPOT: 8105		RESULTADOS EXPERIMENTAIS (GEL 2D) pI: ≈8,35 MM(kDa) ≈32.060			
MASCOT – SCORE: 50 - Cut-off: 34					
BANCO DE DADOS: NCBI		TAXONOMIA: <i>Rattus (Rattus Norvegicus)</i>			
Nome da proteína: VDAC1 protein Código de acesso (NCBI): gi 38051979 Organismo: <i>Rattus Norvegicus</i>					
PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS					
m/z observada	MM Experimental	MM Calculada	Sequência	Score	
2176,0	2175,0	2175,0	WNTDNTLGTTEITVEDQLAR	18	
2127,9	2126,9	2127,0	EHINLGCVDVDFDIAGPSIR	30	
2103,1	2102,1	2102,2	VNNSSLIGLGYTQTLKPGIK	3	
SEQUÊNCIA PRIMÁRIA (297 AMINOÁCIDOS)					
1	GVAAAAPAVT	ASENMAVPPT	YADLGKSARD	VFTKGYGFGL	IKLDLTKTSE
51	NGLEFTSSGS	ANTETTKVNG	SLETKYRWTE	YGLTFTEKWN	TDNTLGTTEIT
101	VEDQLAR GLK	LTFDSSFSPN	TGKKNAKIKT	GYKREHINLG	CDVDFDIAGP
151	SIR GALVLGY	EGWLAGYQMN	FETSKSRVTQ	SNFAVGKYTD	EFQLHTNVND
201	GTEFGGSYIQ	KVNKKLETAV	NLAWTAGNSN	TRFGIAAKYQ	VDPDACFSAK
251	VNNSSLIGL	YTQTLKPGIK	LTLSALLD GK	NVNAGGHKLG	LGLEFQA
Cobertura da sequência: 19%					

Nota: NCBI = National Center for Biotechnology Information. MM= Molecular Mass (massa molecular). O destaque em vermelho representa a sequência de aminoácidos dos peptídeos analisados (19% de cobertura em relação à sequência completa de 297 aminoácidos) por espectrometria de massa. Relação m/z = Relação massa/carga.

WESTERN BLOT

Para confirmação dos resultados da análise quantitativa do gel 2D-SDS-PAGE pelo *Image Master* e validar os resultados da espectrometria de massa, onde o *spot* 8105 foi identificação como sendo a proteína VDAC1, foi realizado uma análise por *Western Blot*. Conforme detalhado em Material e Métodos, foram utilizadas 7 amostras de tálamos obtidas de ratos DT e 7 de ratos controle. Os resultados do *Western blot* mostraram que a proteína identificada (*spot* 8105) correspondia ao VDAC. Através do cálculo da densidade relativa pelo programa *Image J*, foi verificado que a proteína VDAC está reduzida em tálamos de ratos DT em comparação com os ratos do grupo controle ($p = 0,029$) (Figura 22). Estes resultados confirmam os dados obtidos pela análise quantitativa do *spot* 8105 detectado por eletroforese-2D, no qual verificou-se uma diminuição significativa do *spot* 8105 em amostras obtidas de tálamo dos animais DT e a identificação da proteína por *MS/MS*.

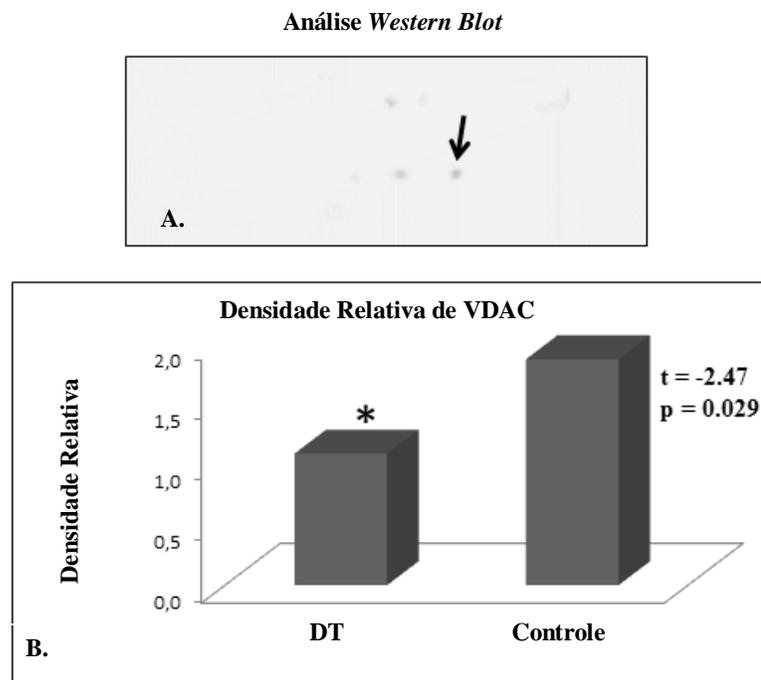


Figura 22. Painei A: Imagem representativa da análise por *Western blot*. Confirmada a identidade do *spot* 8105, VDAC, ponto indicado pela seta. Os outros pontos provavelmente referem-se a isoformas de VDAC. Painei B: Os resultados quantitativos da análise de densidade relativa, com uma diferença significativa entre os grupos C (n = 7) e DT (n = 7). DT = deficiente em tiamina; VDAC=Canal Aniônico Voltagem Dependente.

DADOS DA ANÁLISE MOLECULAR POR PCR EM TEMPO REAL

Depois das reações de *PCR* em tempo real serem realizadas, os dados obtidos foram tratados por análise estatística. Não foi observada diferença significativa entre os grupos para os RNAm dos genes *Vdac1*, *Vdac2* e *Vdac3*. A tabela 4 apresenta as medidas descritivas para os grupos e a comparação dos níveis de RNAm entre eles.

Tabela 4. Comparação dos níveis de RNAm entre as amostras obtidas de animais dos grupos Controle (C) e Deficientes em tiamina (DT).

<i>Teste T</i>					
RNAm	Grupos	Média± SE	t	p	
VDAC1	C	0,72 ± 0,12	- 0,32	0,75	
	DT	0,66 ± 0,12			
VDAC2	C	0,97 ± 0,09	- 0,43	0,68	
	DT	0,91 ± 0,09			
VDAC3	C	1,21 ± 0,12	- 0,9	0,64	
	DT	1,07 ± 0,09			

NOTA: valores expressam a média ± erro padrão (SE=*Standard Error*) dos níveis de RNAm de cada isoforma de VDAC, para cada grupo (C: controle, n= 5; DT: deficiente, n= 5). Teste *t* independente (* $p < 0,05$).

RESUMO GRÁFICO

A figura 23 foi elaborada para uma visualização mais geral dos procedimentos realizados e dos resultados obtidos nos experimentos bioquímicos.

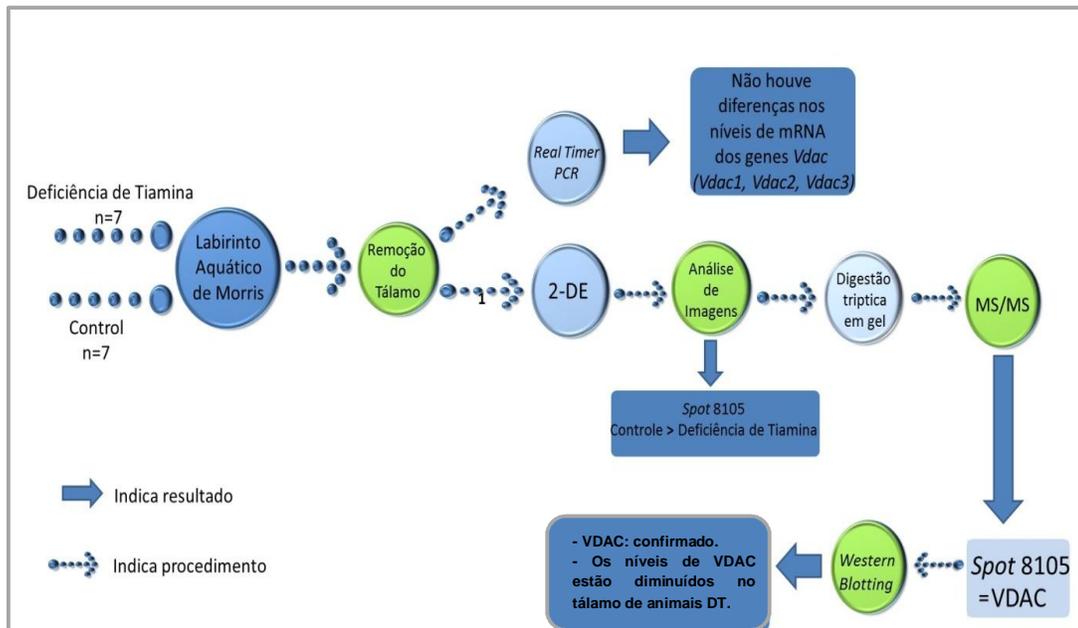


Figura 23 – Resumo gráfico dos métodos utilizados no presente trabalho e dos resultados obtidos. Os valores do tamanho da amostra (n=7 para cada grupo) se referem ao segundo experimento (réplica).

DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a deficiência em tiamina: (i) afetou a aprendizagem espacial, (ii) aumentou e diminuiu os níveis de proteínas talâmicas, (iii) que quatro das proteínas alteradas no tálamo estão relacionadas com o desempenho cognitivo espacial de ratos, (iv) que alterações na VDAC, uma das quatro proteínas, estão relacionadas à aprendizagem espacial dos ratos, indicando uma associação dos níveis talâmicos da proteína VDAC com o pior desempenho dos animais no treino e (v) que não houve efeito da deficiência em tiamina sobre os níveis de RNAm dos genes *Vdac1*, *Vdac2* e *Vdac3*.

No modelo experimental utilizado neste trabalho, os animais com deficiência em tiamina mostraram prejuízo na aquisição da tarefa espacial no LAM. Esses resultados são consistentes com achados prévios obtidos por nosso grupo (Pires et al., 2005, Carvalho et al., 2006) e outros autores (Mumby et al., 1995; Langlais e Savage, 1995), nos quais ratos com deficiência em tiamina apresentaram déficits no aprendizado espacial. Neste estudo e em outros do nosso laboratório, a diferença significativa entre os grupos aparece na terceira e quarta sessão do processo de aprendizado. Entretanto, no presente estudo, além dos efeitos do tratamento na 3ª e 4ª sessões, observamos também um efeito na 1ª sessão. Como esse último efeito não é relatado por outros autores e nem foi observado em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, utilizando esse mesmo modelo experimental, hipotizamos que não seja um efeito sobre o desempenho cognitivo. Essa hipótese se baseia no fato de que na 1ª sessão os animais ainda não sabem as regras e não aprenderam a tarefa, portanto, o sucesso ao encontrar a plataforma (reforço) possa representar apenas um resultado aleatório. O desempenho dos animais em teste cognitivo espacial está principalmente associado ao hipocampo (Morris et al., 1990; Moser et al., 1995). O presente estudo é o primeiro a mostrar que o déficit no desempenho na tarefa no LAM em animais submetidos à deficiência em tiamina se relaciona com alterações nos níveis de algumas proteínas do tálamo, indicando a participação dessas proteínas no mecanismo neurobiológico do aprendizado espacial.

De acordo com Aggleton e Brown (1999), a ligação entre hipocampo, corpos mamilares e núcleos talâmicos anteriores (NTA), através do fórnix, é fundamental para uma memória episódica normal. Estudos realizados para determinar o papel do tálamo na amnésia diencefálica produzida por deficiência em tiamina confirmaram essa relação. Danos à lâmina medular interna (LMI) e aos núcleos talâmicos anteriores (NTA) foram associados a déficit de aprendizagem e de memória observada em ratos DT (Langlais et al., 1992; Langlais e Savage, 1995). Segundo Langlais et al. (1992) ratos DT sem cicatrizes glióticas na LMI, ou seja, que

não desenvolveram lesão com a deficiência em tiamina, exibem uma curva de aprendizado no LAM semelhante aos ratos controles, enquanto que os ratos DT e com lesões na LMI tem latências maiores, o que significa um pior desempenho em relação aos controles. Os NTA também são importantes para a aprendizagem e memória, sendo que danos a esta região produz a síndrome amnésica persistente. De acordo com Langlais e Savage (1995) existe evidência de lesões extensas com perda neuronal considerável, cerca de 50-90%, nos NTA após episódio de deficiência em tiamina. A presença de lesões extensas nos NTA prejudica o desempenho em testes comportamentais que avaliam a aprendizagem e a memória. Em contraste, ratos DT sem lesão ou com pequena perda neuronal nos NTA não apresentam desempenho comprometido no teste cognitivo espacial de alternância espontânea. Desses resultados, se conclui que déficits de aprendizagem e de memória estão intimamente relacionados com o grau de dano em regiões do diencefalo.

Existem evidências de que os processos de aprendizagem e a memória envolvem um fenômeno conhecido como plasticidade neuronal. Essa refere-se às alterações funcionais e/ou estruturais nas sinapses, como resultado de processos adaptativos do organismo (Kaas, 1996), como acontece, por exemplo, no caso da aprendizagem, que significa mudança do comportamento frente a estímulos do meio. O processo de plasticidade neuronal inclui alterações na atividade sináptica, como por exemplo, alterações neuroquímicas, crescimento axonal e dendrítico (Kaas, 1996; Marshall, 1984).

Alterações neuroquímicas de longo prazo no tálamo e seu envolvimento em déficits cognitivos em animais DT também foram relatados, mesmo após a restauração de níveis de tiamina. Há reduções significativas nos níveis de GABA (Ácido γ -aminobutírico) e de glutamato total no tálamo (Langlais et al., 1988) causadas pela deficiência em tiamina. De forma similar, significativo aumento de serotonina e do seu metabólito foram relatados por Langlais et al. (1988), após a deficiência em tiamina. Vigil et al. (2010) observaram correlação significativa entre parâmetros serotoninérgicos e o desempenho dos ratos em tarefas de aprendizado e memória espacial, indicando que a maior concentração talâmica de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) está associada a um pior desempenho no início do processo de aquisição.

Embora o papel do tálamo nos déficits comportamentais relacionados à deficiência em tiamina tenha sido reconhecido por muitos anos, os mecanismos moleculares, associados a essas mudanças, ainda são desconhecidos. Os dados do presente estudo, além de demonstrar a ocorrência de aumento e diminuição dos níveis de proteínas no tálamo de ratos DT, também

indicam que algumas destas proteínas podem ter um papel no mecanismo molecular envolvido no processo de aprendizagem espacial.

É interessante mencionar que uma correlação significativa entre os volumes das proteínas alteradas foi verificada apenas com a latência – desempenho dos animais - para encontrar a plataforma na terceira sessão da tarefa no LAM. Em outros estudos mostramos que, mesmo após a recuperação de um episódio de deficiência em tiamina, os ratos apresentam prejuízo em sua capacidade de aprender uma tarefa de navegação espacial. No entanto, com treinamento adicional, os ratos deficientes são capazes de atingir um desempenho semelhante aos animais do grupo controle. Esta curva de aprendizagem, mostrando um déficit cognitivo durante as sessões intermediárias (3^a e/ou 4^a) do treino e recuperação do desempenho ao longo da repetição da tarefa, foi observada anteriormente pelo nosso grupo (Carvalho et al., 2006) e por outros autores (Langlais et al., 1992), tanto para ratos submetidos à deficiência em tiamina como para ratos idosos (Oliveira-Silva et al., 2007; Oliveira et al., 2010). Em todas as situações, o déficit cognitivo é seguido por uma recuperação do desempenho - semelhante aos ratos controle – observada na última sessão. Uma possível explicação para esses achados é que a aprendizagem, que envolve um processo neurobiológico dinâmico, parece ter um mecanismo cinético em que os passos intermediários são essenciais na codificação das informações. Assim, como consequência dos processos neurodegenerativos, a velocidade de aprendizagem é afetada, mas, durante as sessões do treino, com a repetição da tarefa, todos os ratos são capazes de aprender.

A proteômica é um método que permite uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados a função cerebral (Becker et al., 2006). As tecnologias proteômicas permitem verificar o perfil de expressão e estudos funcionais do proteoma (Bayés e Grant, 2009). Segundo GALLART-PALAU et al., 2015 a aplicação dessas tecnologias melhora a compreensão da neurodegeneração através da identificação de proteínas específicas desse processo. A MS é o método de escolha para a identificação de proteínas, pois proporciona uma identificação de proteínas em grande escala. Entretanto, as técnicas empregadas para a separação das proteínas diferem entre os estudos. Alguns pesquisadores utilizam a eletroforese bidimensional (François-Michel et al., 2012; Suk, 2012; Hemming et al., 2008), por ser uma técnica com ótima reprodutibilidade e consegue a separação de centenas a milhares de *spots* de proteínas.

Alexander-Kaufman et al. (2006, 2007) usando uma abordagem proteômica, demonstraram que os níveis de expressão da transcetolase e da piruvato desidrogenase subunidade E1 β , estavam significativamente alterados na região BA9 (área de Brodmann 9,

responsável pela memória de curto prazo) de indivíduos alcoolistas tanto sem complicações, como com cirrose. Em contraste, alterações nos níveis de expressão dessas enzimas não foram observadas no hipocampo e no *splenium* do corpo caloso (Kashem et al., 2009), o que sugere que a deficiência em tiamina pode não ter influência no mecanismo que leva aos danos induzidos por álcool no hipocampo.

Poucos estudos têm investigado alterações protéicas em modelo experimental grave de deficiência em tiamina. Vetreno et al. (2012) mostraram recentemente redução no Fator Neurotrófico Derivado do cérebro (BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*) no hipocampo após período de recuperação de DT. A capacidade do BDNF de influenciar a função neuronal pode ser intrínseca à sua capacidade para modular a transmissão sináptica regulando a sinapsina I através do seu receptor tirosina quinase B (TrkB) (Jovanovic et al., 2000). A sinapsina I prende pequenas vesículas sinápticas ao citoesqueleto de actina, de uma forma dependente de fosforilação, regulando assim a disponibilidade vesicular nos terminais nervosos e a liberação do neurotransmissor (Greengard et al., 1993). Nosso grupo de pesquisa mostrou que o tratamento crônico com etanol associado à DT induz alterações nos níveis de fosforilação de algumas proteínas hipocâmpais, principalmente a proteína com peso molecular de 86kDa. Uma possível candidata para a p86K é a sinapsina I (Pires et al. 2007)

Utilizando *2-DE*, *MS* e *Western Blot* demonstramos que a proteína referente ao *spot 8105*, cuja concentração apresentou-se diminuída nos animais do grupo DT, é o VDAC. Conforme mencionado, os níveis dessa proteína – expressos como volume relativo - mostrou correlação negativa com a latência para encontrar a plataforma na terceira sessão do treino no LAM, nos animais do grupo DT. Quanto menor a expressão desta proteína no tálamo, maior foi o tempo gasto para encontrar a plataforma na terceira sessão do treino, ou seja, pior o desempenho dos animais do grupo DT.

Esta é a primeira vez que a proteína identificada, VDAC, foi associada à disfunção induzida por deficiência em tiamina. Com relação à sua participação em processos cognitivos, Weeber et al. (2002) demonstraram que camundongos *knockout* deficientes em VDAC apresentaram déficit de aprendizagem na tarefa do LAM, conforme explicado adiante.

O VDAC, também conhecido como porina, é a proteína mais abundante na membrana mitocondrial externa (Linden et al., 1984). Esta proteína realiza importantes funções, como: participação do processo de apoptose (Zaid et al., 2005; McCommis e Baines, 2012), transporte de metabólitos entre a mitocôndria e o citoplasma e regulação do metabolismo energético, através da manutenção dos níveis de ATP celular (Colombini, 2004; Shoshan-Barmatz et al., 2006). Kielar et al. (2009) mostraram níveis aumentados de VDAC associados

à neurodegeneração no tálamo de camundongos usados como modelo da Doença de Batten. Yoo et al. (2001), em estudos *post-mortem*, verificaram que pacientes com Doença de Alzheimer tinham significativa diminuição dos níveis de VDAC1. Weeber et al. (2002) constataram que VDAC, pode participar de funções sinápticas no hipocampo, como a Potencialização de Longo Prazo. Esta resulta no aumento da força sináptica após repetições de um mesmo estímulo que tem sido correlacionada com a aprendizagem e memória e está prejudicada em camundongos *knockout* para VDAC1 (Weeber et al., 2002). Segundo estes autores, a expressão alterada de VDAC pode modificar a função sináptica, com consequente interferência na aprendizagem e memória. De fato, alterações na plasticidade sináptica são acompanhadas do aumento ou diminuição da expressão de proteínas sinápticas, no entanto, pouco se sabe sobre as proteínas específicas que são alteradas (Nair et al., 2013; Henninger et al., 2007; Piccoli et al., 2007). Weeber et al. (2002) ainda relataram que camundongos *knockout* deficientes em VDAC apresentaram pior desempenho no LAM, quando comparados aos animais controles. Estes resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho, uma vez que a diminuição da expressão de VDAC em ratos DT está relacionada ao baixo desempenho destes animais na 3ª e 4ª sessão do aprendizado espacial. A alteração no nível de expressão de VDAC pode ter gerado um desequilíbrio na sua participação em processos apoptóticos que pode ter como consequência a neurodegeneração.

Segundo Kroemer et al. (2007) o VDAC participa do processo que leva à morte celular apoptótica, através da formação do complexo pró-apoptótico VDAC 1-Bax, que induz a liberação do Citocromo C da mitocôndria. Desta forma, alterações nos níveis de VDAC podem induzir processos apoptóticos, com consequente disfunção sináptica. Esta disfunção poderia estar associada às doenças neurodegenerativas (Törnroth-Horsefield e Neutze, 2008). Dados da literatura corroboram essa hipótese, pois, como mencionado anteriormente, foi observado em exames *post mortem* de pacientes com Doença de Alzheimer, uma diminuição dos níveis totais de VDAC1 no córtex frontal e no tálamo. Esses resultados foram relacionados à perda neuronal comuns em pacientes com Doença de Alzheimer (Yoo et al., 2001). Van Laar et al. (2008) também encontraram redução dos níveis de VDAC associado à perda de neurônios. Neste estudo foram estudados os neurônios dopaminérgicos, que estão implicados na neurodegeneração da Doença de Parkinson.

A importância dos dados obtidos no presente estudo é que das 320 proteínas detectadas no perfil proteômico do tálamo, nas condições utilizadas da eletroforese bidimensional, apenas 7 apresentaram alterações, sendo que os níveis de 4 destas estão relacionadas ao desempenho cognitivo. Se a alteração de proteínas fosse devido à perda de

células, todas as proteínas deveriam ter sua expressão alterada e não apenas 7 delas. Além disso, algumas proteínas tiveram aumento da expressão e não apenas diminuição. É importante destacar que, como existem outras áreas do cérebro que desempenham um papel no aprendizado e memória espacial além do tálamo (Aggleton et al., 2010), estudos de proteômica adicionais em outras áreas são importantes para determinar se as mudanças demonstradas aqui são específicas ou não da região do tálamo.

Sobre a participação do VDAC nos processos cognitivos, até aonde pudemos pesquisar, encontramos apenas um estudo publicado na literatura científica. Weeber et al. (2002) observaram que depleção de VDAC pode provocar déficits de aprendizagem e memória. Neste trabalho, Weeber e colaboradores observaram que camundongos *knockout* para VDAC1 têm a memória prejudicada. Camundongos *knockout* para VDAC3 apresentam uma tendência ao prejuízo de memória e quando há ausência de *VDAC1* e *VDAC3* o efeito do enfraquecimento da memória é significativo. Ainda neste estudo, mostrou-se que os registros eletrofisiológicos de fatias de hipocampo de ratos com deficiência em VDAC revelaram déficits na plasticidade sináptica, evidenciando indiretamente um papel funcional para VDAC na aprendizagem e plasticidade sináptica.

A análise por *Western Blot* foi utilizada para confirmar a identificação de VDAC pela *MS*. Na figura 22, que representa a análise por *Western Blot*, VDAC está indicado por uma seta preta. Entretanto, podemos verificar a presença de outras marcações. Destacamos que os anticorpos anti-VDAC (*Catalog number – AB10527 Millipore*) utilizados aqui são policlonais. Estes apresentam a desvantagem de apresentar um maior número de reações cruzadas por reagir com outros epitopos (Ramos-Vara, 2005). A escolha inicial, para este trabalho, foi o anti-VDAC1, referente à isoforma apontada pelo *Mascot*. Esse anticorpo, também policlonal, gera reações cruzadas com VDAC2 e VDAC3. Desta forma, optamos pelo anti-VDAC, apesar de também ser policlonal. Não há no mercado opções de anticorpos monoclonais para esta proteína.

Com o objetivo de esclarecer se a redução dos níveis de VDAC na deficiência em tiamina ocorreu devido a alterações no processo de transcrição ou em modificações pós-traducionais (p.ex. na síntese ou na degradação de proteínas) e se os efeitos da deficiência foram diferentes em relação às três isoformas de VDAC, determinamos os níveis de RNAm obtidos do tálamo de animais controle e DT. O *PCR* em tempo real para as isoformas *Vdac1*, *Vdac2* e *Vdac3* não mostrou diferenças significativas nos níveis de RNAm entre os grupos para nenhuma das isoformas. Este resultado sugere que a variação dos níveis de VDAC no presente estudo não está associada à transcrição e pode ser uma consequência de alterações

pós-traducionais. A ausência de uma relação entre transcritos de RNAm e a expressão de proteínas pode ser explicada por um mecanismo pós-transcricional que controla a taxa de tradução da proteína (Harford e Morris, 1997) e por diferenças nas meias-vidas de proteínas específicas ou RNAm (Varshavsky, 1996). As proteínas são resultado de “*splicing*” alternativo e de modificações co- e pós-traducionais (como fosforilações, glicosilação, acilação, etc). O modelo “um gene – uma proteína” não é adequada. Múltiplas proteínas podem ser produzidas de apenas um gene (Jensen, 2004). Em muitos casos, os níveis de RNA mensageiro (RNAm) transcritos não apresentam uma relação direta com a expressão protéica (Gygi *et al.*,1999).

Em seguida, exploramos o processo de ubiquitinação que participa da degradação de proteínas. O desequilíbrio desse processo, provocado por injúria celular, pode levar a uma redução de proteínas que não deveriam ser degradadas em situação fisiológica.

Uma possível explicação para a diminuição observada no nível de VDAC induzida por deficiência em tiamina pode ser a ocorrência de um aumento na poli-ubiquitinação da Lys 27 da proteína VDAC, mediada pela Parkina, que está relacionada com a neurodegeneração (Geisler *et al.*, 2010; Burté *et al.*, 2014). A proteína Parkina é uma E3 ubiquitina-ligase que atua em diversos substratos promovendo sua degradação via proteassoma (Shimura *et al.*, 2000), como também no processo de autofagia mitocondrial, conhecido como mitofagia (Narendra *et al.*, 2008). A Parkina é considerada uma proteína importante na bioenergética e controle de qualidade mitocondrial (Exner *et al.*, 2012).

A ubiquitina (Ub) é uma pequena proteína ou peptídeo de 76 aminoácidos altamente conservado nos eucariotas, com diferentes funções (Hershko *et al.*, 2000). O sistema de ubiquitinação consiste de três enzimas: E1 (ativação), E2 (conjugação) e E3 (ligação). A ativação da ubiquitina requer ATP. Uma vez ativada, esta liga-se a um resíduo cisteína, localizado na extremidade N-terminal da enzima E1. Após, o complexo de E1-Ub interage com um resíduo de cisteína da enzima E2 para formar um complexo de E2-Ub. A enzima Ubiquitina ligase, E3, se liga ao seu substrato e interage com o complexo E2-Ub. A Ubiquitina finalmente é ligada ao substrato, nesse caso poderia ser o VDAC, em um dos seus resíduos de lisina. Esse substrato ubiquitinizado está marcado para ser degradado pelo proteassoma (Lee e Schindelin, 2008). A figura 24 é um esquema do processo de Ubiquitinação.

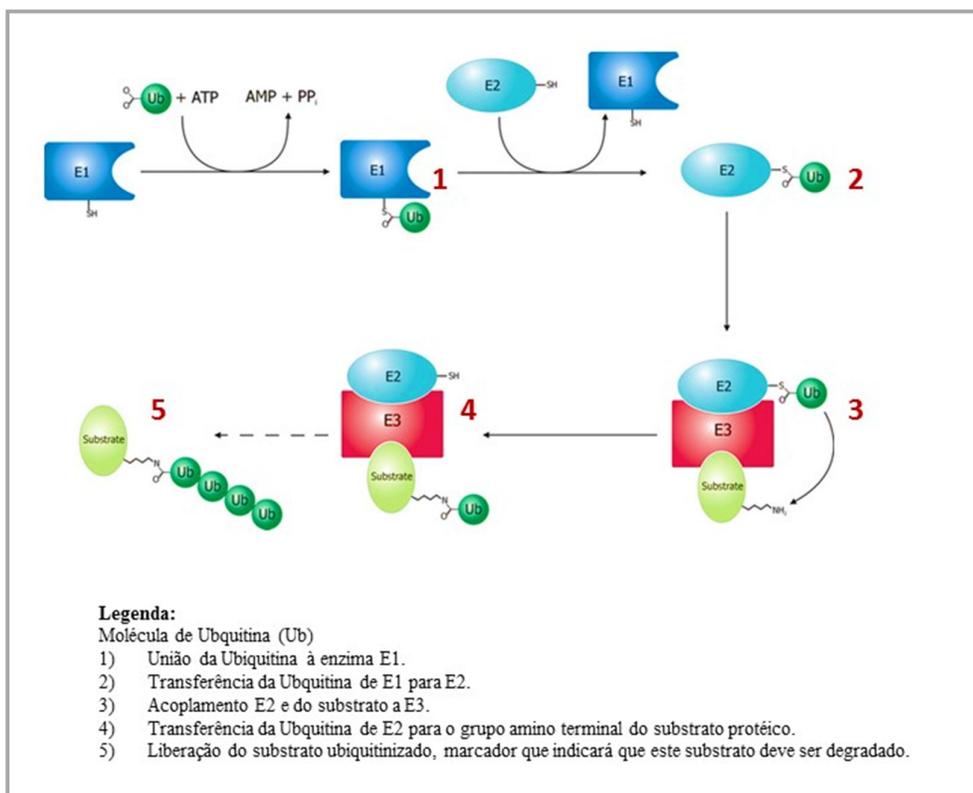


Figura 24. Desenho esquemático do processo de ubiquitinação de proteínas.

Dados da literatura corroboram essa nossa hipótese, pois, existem evidências do envolvimento da atividade da Parkina na ubiquitinação de VDAC1 após a despolarização da membrana mitocondrial, processo que antecede a mitofagia. Tanto a dinâmica como a extensão da ubiquitinação de VDAC1 são dependentes dos níveis de Parkinas funcionais (Geisler et al., 2010). Em seres humanos, mutações no gene que codifica a enzimas E3 ubiquitina-ligases podem gerar doenças neurodegenerativas. Por exemplo, mutação no gene Ube3a que codifica a enzimas E3A, dão origem à síndrome de Angelman, uma doença neurodegenerativa que causa retardo mental, convulsões, perturbações do sono, perturbações da fala e déficit de movimento (Vu e Hoffman, 1997; Rougeulle et al., 1997). Considerando estas informações, a hipótese a ser testada em estudos futuros seria a possibilidade de que a privação de tiamina possa levar a mutações da Parkina e, por fim, também interferir com a ubiquitinação de VDAC1 em células neuronais, gerando a diminuição da sua presença no tálamo de animais DT. Entretanto, ainda não há pesquisas que tenham investigado a Parkina em função da deficiência em tiamina.

Em suma, os principais resultados do presente trabalho são: (i) deficiência em tiamina aumentou e diminuiu os níveis de proteínas do tálamo; (ii) quatro proteínas talâmicas alteradas estão relacionadas com o desempenho cognitivo espacial de ratos; (iii) mudanças nos níveis de VDAC no tálamo, uma das quatro proteínas alteradas pela deficiência em tiamina, relaciona-se à aprendizagem espacial em ratos; (iv) a correlação de VDAC é evidente na sessão do treino onde os animais apresentaram pior desempenho na tarefa no LAM e (v) não foi observada diferença no RNAm de genes *Vdac*, indicando que a diminuição da expressão de VDAC pode estar relacionada com um processo pós-transcricional.

Adendo

Com a finalidade de detalhar as características estruturais e funcionais da VDAC, incluímos, no presente exemplar, um anexo com uma pequena revisão da literatura sobre esse tema.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram, pela primeira vez, que a neurodegeneração causada por deficiência em tiamina envolve mudanças nos níveis de algumas proteínas talâmicas que estão relacionados com o pior desempenho de ratos em tarefas cognitivas espaciais. Nossa hipótese é que, das sete proteínas alteradas pela deficiência em tiamina, quatro – incluindo VDAC - podem ter um papel como componente molecular do mecanismo neurobiológico envolvido no estágio inicial do processo de aprendizagem espacial. Além disso, se o treinamento persiste, a hipótese é que outros mecanismos biológicos podem entrar em ação. Portanto, a repetição da tarefa resultaria no acionamento de mecanismos para compensar a disfunção inicial e, conseqüentemente, os déficits comportamentais são minimizados de forma que o desempenho dos animais que sofreram um episódio de deficiência em tiamina se iguala ao desempenho dos animais do grupo controle.

Estes dados representam uma nova via para o estudo dos mecanismos moleculares relacionados ao déficit de aprendizagem e memória induzido pela deficiência em tiamina. Outros experimentos precisam ser realizados para identificar e caracterizar as outras três proteínas alteradas no tálamo de animais submetidos à deficiência em tiamina. Em relação a estas três proteínas, os achados aqui apresentados permitem priorização de alvos para futuros estudos, ou seja, o presente trabalho indica qual espectro de proteínas talâmicas deveria ser primeiramente abordado.

Resumindo, concluímos que:

A tiamina e/ou os seus derivados fosforilados são importantes para a manutenção dos níveis de algumas proteínas talâmicas;

Algumas das proteínas talâmicas, cujos níveis foram afetados pela deficiência em tiamina parecem participar como componentes do mecanismo molecular neurobiológico relacionado ao processo de aprendizado espacial.

O VDAC pode ter um papel como componente molecular no processo biológico envolvido no início da aprendizagem espacial.

Outro componente molecular ou processo biológico atuam para compensar o déficit de VDAC de forma que o atraso no aprendizado seja minimizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLE NS, BURD L, ZHAO BH, REN J. (2004) Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not by vitamins B6 or B12. **Alcohol Alcohol.** 39(5):450-4.
- ABRAHAMMS S, PICKERING A, POLKEY CE, MORRIS RG. (1997) Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. **Neuropsychologia**, v.35, p.11-24.
- ABU-HAMAD S, ZAID H, ISRAELSON A, NAHON E, SHOSHAN-BARMATZ V. (2008) Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding. **J Biol Chem.** 283:13482–13490.
- ABU-HAMAD S, SIVAN S, SHOSHAN-BARMATZ V. (2006) The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Apr 11; 103(15):5787-92.
- AEBERSOLD R, MANN M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. **Nature.** Mar 13; 422(6928):198-207.
- AGGLETON JP, ALBASSER MM, AGGLETON DJ, POIRIER GL, PEARCE JM. (2010) Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. **Behav Neurosci.** 124 (1):55-68. doi: 10.1037/a0018320.
- AGGLETON, JP; BROWN, MW. (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. **Behavioral and Brain Sciences**, 425–444.
- AGGLETON JP, KEITH AB, SAHGAL A. (1991) Both fornix and anterior thalamic, but not mammillary, lesions disrupt delayed nonmatching-to-position memory in rats. **Behav. Brain Res.** 44, 151–161.
- AGGLETON JP, NEAVE N, NAGLE S, HUNT PR. (1995a) A comparison of the effects of anterior thalamic, mammillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. **Behav. Brain Res.** 68, 91–101.
- AGGLETON JP, POIRIER GL, AGGLETON HS, VANN SD, PEARCE JM. (2009) Lesions of the fornix and anterior thalamic nuclei dissociate different aspects of hippocampal-dependent spatial learning: implications for the neural basis of scene learning. **Behav. Neurosci.** 123, 504–519.
- AGGLETON JP, SAHGAL A. (1993) The contribution of the anterior thalamic nuclei to anterograde amnesia. **Neuropsychologia.** 31: 1001–1019.
- AGGLETON, JP; SHAW C. (1996) Amnesia and recognition memory: A reanalysis of psychometric data. **Neuropsychologia** 34:51–62.
- AHRENS CH, BRUNNER E, QELI E, BASLER K, AEBERSOLD R. (2010) Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 11(11):789-801.
- ALEXANDER-KAUFMAN, K.; DEDOVA, I.; HARPER, C.; MATSUMOTO, I. (2007) Proteome analysis of the dorsolateral prefrontal region from healthy individuals. **Neurochemistry Internacional** 51: 433–439.
- ALEXANDER-KAUFMAN, K.; JAMES, G.; SHEEDY, D.; HARPER C.; AND MATSUMOTO, I. (2006) Differential protein expression in the prefrontal white matter of human alcoholics: a proteomics study. **Mol. Psychiatry** 11: 56–65.

- ALLOWAY T. (2009) Working memory, but not IQ, predicts subsequent learning in children with learning difficulties. **European Journal of Psychological Assessment**, v. 25, p. 92-98.
- ALMEIDA JC, FONTELLERES RGS. (2010) Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. **Rev Paran Med**. 24:57-64.
- ANDERSON NG, ANDERSON NL. (1996) Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**. 17(3):443-53.
- ANTONSSON B, MONTESSUIT S, SANCHEZ B, MARTINOUC J. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. **J Biol Chem**. Apr 13;276(15):11615-23.
- ANZALONE S, VETRENO RP, RAMOS RL, SAVAGE LM. (2010) Cortical cholinergic abnormalities contribute to the amnesic state induced by pyriethamine-induced thiamine deficiency in the rat. **Eur J Neurosci**. 32(5):847-58. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07358.x.
- ASTH L, LOBÃO-SOARES B, ANDRÉ E, SOARES VP, GAVIOLI EC. (2012) The elevated T-maze task as an animal model to simultaneously investigate the effects of drugs on long-term memory and anxiety in mice, **Brain Research Bulletin**, Volume 87, Issue 6, 10 April, Pages 526-533, ISSN 0361-9230, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.02.008>.
- AZOULAY-ZOHAR H, ISRAELSON A, ABU-HAMAD S, SHOSHAN-BARMATZ V. (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. **Biochem. J**. 377:347-355.
- BÂ A, SERI BV, HAN SH. (1996) Thiamine administration during chronic alcohol intake in pregnant and lactating rats: effects on the offspring neurobehavioural development. **Alcohol Alcohol**. 31(1):27-40.
- BÂ A. (2008) Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. **Cell Mol Neurobiol**. 28(7):923-31. doi: 10.1007/s10571-008-9297-7.
- BADDELEY AD, WARRINGTON EK. (1970) Amnesia and the distinction between long- and short-term memory. **Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior**, v.9, n.2, p. 176-89.
- BAHK YY, BARI M, YOUNG JK. (2013) Biomedical Application of Phosphoproteomics in Neurodegenerative Diseases. **J. Microbiol. Biotechnol**. 23(3), 279-288.
- BAKER MA, LANE DJ, LY JD, DE PINTO V, LAWEN A. (2004). VDAC1 é uma membrana transplasma NADH-redutase ferricianeto. **J. Biol. Chem**. 279: 4811-4819.
- BANERJEE J, GHOSH S. (2004). Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 323:310-314
- BARNES CA. (1979) Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. **J. Comp. Physiol. Psychol**. 93:74-104.
- BAUDRY M. (1998) Synaptic plasticity and learning and memory: 15 years of progress. **Neurobiol. Neurobiol Learn Mem**. 70(1-2):113-8.
- BAYÉS A, GRANT SGN. (2009) Neuroproteomics: understanding the molecular organization and complexity of the brain. **Nature Reviews Neuroscience** 10, 635-646.
- BECKER M, SCHINDLER J, NOTHWANG NG. (2006) Neuroproteomics – the tasks lying ahead. **Electrophoresis**, 27, 2819-2829.

- BELTRAMO E, BERRONE E, TARALLO S, PORTA M. (2008) Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. **Acta Diabetol** 45:131–141.
- BENAGLI C, ROSSI V, DOLINA M, TONOLLA M, PETRINI O. (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. **PLoS One**.6 (1).
- BERACOCHEA D e JAFFARD R. (1995) Effects of anterior thalamic lesions on spatial memory in mice. **Neuroreport** 5:917–20.
- BERACOCHEA DJ, JAFFARD R e JARRARD LE. (1989) Effects of anterior or dorsomedial thalamic ibotenic lesions on learning and memory in rats. **Behavioral and Neural Biology** 51:364–76.
- BERG JM, STRYER L, TYMOCKKO JL. (2002) **Biochemistry**. Editora: W H Freeman e Co; 5 ed.
- BERNARDI P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. **Physiol Rev**. 1999 Oct; 79(4):1127-55.
- BETTENDORFF L, WINS P. (2013) Biochemistry of thiamine and thiamine phosphate compounds. In: Lane M, DLennarz WJ, editors. **Encyclopedia of biological chemistry**. Vol. 1. Oxford, UK: Elsevier; p.202–9.
- BIERCZYNSKA-KRZYSIK A. et al. (2006) Rat brain proteome in morphine dependence. **Neurochem. Int.** 49, 401–406.
- BINDOFF LA, BIRCH-MACHIN M, CARTLIDGE NE, PARKER WD, JR, TURNBULL DM. (1989) Mitochondrial function in Parkinson's disease. **Lancet**.2:49.
- BLACHLY-DYSON E, ZAMBRONICZ EB, YU WH, ADAMS V, McCABE ER, ADELMAN J, et al. (1993) Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. **J Biol Chem** 268:1835–41.
- BOSCH-BOUJU C, HYLAND BI, PARR-BROWNLIE LC. (2013) Motorthalamusintegration of cortical, cerebellar and basal ganglia information: implications for normal and parkinsonian conditions. **Front Comput Neurosci**.11; 7:163.
- BRAMHAM CR. (2008) Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. **Curr Opin Neurobiol**.18 (5):524-31.
- BRUSTOVETSKY N, BRUSTOVETSKY T, PURL KJ, CAPANO M, CROMPTON M, DUBINSKY JM. (2003) Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. **J Neurosci** 23: 4858–4867.
- BRUSTOVETSKY N, DUBINSKY JM. (2000) Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium. **J Neurosci**20:103–113.
- BUDZIŃSKA M, GALGAŃSKA H, KARACHITOS A, WOJTKOWSKA M, KMITA H. (2009) The TOM complex is involved in the release of superoxide anion from mitochondria. **J. Bioenerg. Biomembr**, pp. 361–367.
- BURTÉ F, CARELLI V, CHINNERY PF, YU-WAI-MAN P. (2015) Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurol**. 11(1):11-24.doi: 10.1038/nrneurol.2014.228.
- BUTTERWORTH RF. (2003) Thiamin deficiency and brain disorders. **Nutrition Research Reviews**. 16:02, pp 277-284.

- BUTTERWORTH RF. (2006) Thiamin. In: Shils ME **Modern Nutrition in Health and Disease**, Tenth Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins.
- BUTTERWORTH RF. (1989) Effects of thiamine deficiency on brain metabolism: implications for the pathogenesis of the Wernicke-Korsakoff syndrome. **Alcohol Alcohol**.24(4):271-9.
- CALINGASAN NY, PARK LCH, CALO LL, TRIFILETTI RR, GANDY SE, AND GIBSON GE. (1998) Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. **Am. J. Pathol.** 153, 599–610.
- CARVALHO, FM.; PEREIRA, SRC; PIRES, RGW; FERRAZ, VP; ROMANO-SILVA MA; OLIVEIRA-SILVA IF, RIBEIRO AM. (2006) Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 83: 481–489.
- CICCIA RM, LANGLAIS PJ. (2000) An examination of the synergistic interaction of the ethanol and thiamine deficiency in the development of neurological signs and long-term cognitive and memory impairments. **Alcohol Clin Exp Res**, 24: 622-634.
- CLARK RE, ZHANG AA, LAVOND DG. (1992) Reversible lesions of the cerebellar interpositus nucleus during acquisition and retention of a classically conditioned behavior. **Behav Neurosci**.106:879–888.
- COHEN NJ, SQUIRE LR. (1980) Preserved learning and retention of pattern analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. **Science**, v.210, n.4466, p.207-10.
- COHEN NJ. Preserved learning capacity in amnesia: evidence for multiple memory systems. In: SQUIRE, LR, BUTTERS N. (1984) **The neuropsychology of memory**. New York, Guilford Press, p.83-103.
- COLOMBINI M, BLACHLY-DYSON E AND FORTE M. (1996) VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. **Ion Channels** 4,169–202.
- COLOMBINI M. (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. **Mol. Cell. Biochem.** 256-257:107–115.
- COOK CC, HALLWOOD PM, THOMSON AD. (1998) B Vitamin deficiency and neuropsychiatric syndromes in alcohol misuse. **Alcohol Alcohol**. 33(4):317–336.
- CROMPTON M, VIRJI S, DOYLE V, JOHNSON N, WARD JM. (1999) The mitochondrial permeability transition pore. **Biochem Soc Symp.** 66: 67-79.
- CRUIKSHANK SJ, AHMED OJ, STEVENS TR, et al. (2012) Thalamic control of layer 1 circuits in prefrontal cortex. **J Neurosci**.32 (49):17813-23.
- CUNHA RB; CASTRO MS; FONTES W. (2006) Espectrometria de massa de proteínas – o papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** ano IX, nº 36, p. 40-46.
- CUSICK ME, KLITGORD N, VIDAL M, HILL DE. (2005) Interactome: gateway into systems biology. **Hum. Mol. Genet**.14, R171–R181.
- CZERNIECKI J, CHANAS G, VERLAET M, BETTENDORFF L, et al. (2004) Neuronal localization of the 25-kDa specific thiamine triphosphatase in rodent brain. **Neuroscience**.125(4):833-40.
- D’HOOGE, R e DE DEYN, PP. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews** 36: 60-90.

- DE FREITAS-SILVA MS, RESENDE LDE S, PEREIRA SR, FRANCO GC, RIBEIRO AM. (2010) Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring. **Behav Brain Res.** 211 (1) :33-40.
- DE PINTO V, GUARINO F, GUARNERA A, MESSINA A, REINA A, TOMASELLO FM, PALERMO V, MAZZONI C. (2010) Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar function for VDAC3. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Volume 1797, Issues 6–7, Pages 1268-1275, ISSN 0005-2728, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabo.2010.01.031>
- DE PINTO V, LUDWIG O, KRAUSE J, BENZ R, PALMIERI F. (1987) Porin pores of mitochondrial outer membranes from high and low eukaryotic cells: biochemical and biophysical characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, 894, pp. 109–119.
- DE PINTO V, TOMMASINO M, BENZ R, PALMIERI F. (1985) The 35 kDa DCCD-binding protein from pig heart mitochondria is the mitochondrial porin. **Biochim. Biophys. Acta**, 813, pp. 230–242.
- DE SOUSA MV; FONTES W; RICART CA. (2003) Análise de Proteomas: O despertar da era pós-genômica. **Revista on line-Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** p. 12-14.
- DEAN B, BOER SA, MACKINNON A, BERK M. (2007) CNS 14-3-3zeta: changes with sex but not psychiatric diagnoses or psychotropic drug treatment. **Schizophr Res.** Jul;93(1-3):51-7.
- DODSON M, DARLEY-USMAR V, ZHANG J. (2013) Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. **Free Radic Biol Med.** 63:207-21. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.014.
- DOUGHERTY MK, MORRISON DK. (2004) Unlocking the code of 14-3-3. **J Cell Sci.** Apr 15;117 (Pt 10):1875-84.
- DOWSEY AW, DUNN MJ, YANG GZ. (2003) The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics.** 3(8):1567-96
- DUMONT JR, AMIN E, AGGLETON JP. (2014a) Selective importance of the rat anterior thalamic nuclei for configural learning involving distal spatial cues. **Eur. J. Neurosci.** 39, 241–256.
- DUMONT JR, WRIGHT NF, PEARCE JM, AGGLETON JP. (2014b). The impact of anterior thalamic lesions on active and passive spatial learning in stimulus controlled environments: geometric cues and pattern arrangement. **Behav. Neurosci.** 128, 161–177.
- EICHENBAUM H, COHEN NJ. (2001) From conditioning to conscious recollection: **Memory systems of the brain.** Oxford Univ. Press, London.
- EISENKRAEMER, R.E. (2006) Nas cercanias das falsas memórias. **Ciências e Cognição.** 9:97- 110.
- EPAND RF, MARTINOU JC, FORNALLAZ-MULHAUSER M, HUGHES DW, EPAND RM. (2002) The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. **J Biol Chem;** 277(36):32632-9.
- EXNER N, LUTZ AK, HAASS C, WINKLHOFER KF. (2012) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. **EMBO J.** Jun 26;31(14):3038-62. doi: 10.1038/emboj.2012.170.
- FARAH MJ. (1988) Is visual memory really visual? Overlooked evidence from neuropsychology. **Psychological Reviews**, 95, 307-317.
- FEY SJ, LARSEN PM. (2001) 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. **Curr Opin Chem Biol.** Feb;5(1):26-33.

- FIELDS S, SONG O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature** 340, 245–246.
- FIGUEIRA ICV, LAKS J. (1988) Encefalopatia de Wernicke. **J Bras Psiquiatr**, 37:33-38.
- FORTE M, BERNARDI P. (2006) The permeability transition and BCL-2 family proteins in apoptosis: co-conspirators or independent agents? *Cell Death Differ.* 13:1287–1290.
- FRANÇOIS-MICHEL BOISVERT, YASMEEN AHMAD, MAREK GIERLIŃSKI, et al..A quantitative spatial proteomics analysis of proteome turnover in human cells. (2012) **Mol Cell Proteomics**. 11(3): M111.011429. Published online 2011 September 21. doi:10.1074/mcp.M111.011429
- FU H, SUBRAMANIAN RR, MASTERS SC.(2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation.**Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 40:617-47.
- FUSTER JM. (2002) Frontal lobe and cognitive development. **J. Neurocytol.** ; 31: 373-385.
- GALLART-PALAU X, SERRA A, SZE SK. Uncovering Neurodegenerative Protein Modifications via Proteomic Profiling. **Int Rev Neurobiol**. 2015;121:87-116. doi:10.1016/bs.im.2015.06.002.
- GASIC GP, BARCO A, AVILA J, LERMA J. (2006) A meeting to remember: meeting on memory and related disorders. **EMBO Rep**.7(8):768-73.
- GEISLER S, HOLMSTRÖM KM, SKUJAT D, FIESEL FC, ROTHFUSS OC, KAHLE PJ, SPRINGER W. (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. **Nat Cell Biol**. Feb; 12 (2):119-31. doi: 10.1038/ncb2012.
- GENTLEMAN RC. et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biol**. 5, R80.
- GHOSH JC, SIEGELIN MD, DOHI T, AND ALTIERI DC. (2010). Heat shock protein 60 regulation of the mitochondrial permeability transition pore in tumor cells. **Cancer Res**. 70, 8988–8993.
- GIBSON GE, ZHANG H. (2002) Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. **Neurochem Int**. May; 40(6):493-504.
- GIOT L. et al. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. **Science** 302, 1727–1736
- GOLBY AJ, POLDRACK RA, ILLES J, CHEN D, DESMOND JE, GABRIELI JDE. (2002) Memory lateralization in medial temporal lobe epilepsy assessed by functional MRI. **Epilepsia**, v.43, n.8, p.855-863.
- GOLDBERG DJ, COOPER JR. (1975) Effects of thiamine antagonists on nerve conduction. I. Actions of antimetabolites and fern extract on propagated action potentials. **J Neurobiol**. 6(5):435-52.
- GRAVES PR, HAYSTEAD TA. (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev**. 66(1):39-63.
- GREENGARD P, VALTORTA F, CZERNIK AJ, BENFENATI F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science**. 1993; 259:780–785.
- GREENE E, NARANJO JN. (1986) Thalamic role in spatial memory. **Behav Brain Res**. 19(2):123-31.
- GREER PL, GREENBERG ME. (2008) From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. **Neuron**. 59(6):846-60.

- GUNTER TE, BUNTINAS L, SPARAGNA GC, GUNTER KK. (1998) The Ca²⁺ transport mechanisms of mitochondria and Ca²⁺ uptake from physiological-type Ca²⁺ transients. **Biochim Biophys Acta**.1366(1-2):5-15.
- GUNTER TE, PFEIFFER DR. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am J Physiol**. 258: 755-86.
- GYGI SP, ROCHON, Y FRANZA, BRE AEBERSOLD R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol Cell Biol**, v.19, n.3, Mar, p.1720-1730.
- HAAS RH. (1988) Thiamine and the brain. **Annu. Rev. Nutr.** 8, 483-515.
- HAFTING T, FYHN M, MOLDEN S, MOSER MB, MOSER EI. (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. **Nature**. 436:801 -806.
- HAKIM AM, PAPPIUS HM. (1983) Sequence of metabolic, clinical and histological events in experimental thiamine deficiency. **Ann. Neurol.** 13: 365-375.in Korsakovs amnesia: insights from animal models.
- HAKIM AM. (1984) The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. **Ann Neurol**, 1984; 16: 673-679.
- HALESTRAP AP, KERR PM, JAVADOV S, WOODFIELD KY. (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim Biophys Acta**; 1366(1-2): 79-94.
- HARDING A, HALLIDAY G, CAINE D, KRIL J. (2000) Degeneration of anterior thalamic nuclei differentiates alcoholics with amnesia. **Brain**; 123:141–154. doi:10.1093/brain/123.1.141.
- HARFORD JB, MORRIS DR. (1997) mRNA Metabolism e Post-transcriptional.**Gene Regulation**. New York: Wiley-Liss. pp. 265–280.
- HASTINGS TG. (2009) The role of dopamine oxidation in mitochondrial dys-function: implications for Parkinson's disease. **J. Bioenerg. Biomembr.** 41:469-472.
- HAZELL AS, FAIM S, WERTHEIMER G, SILVA VR, MARQUES CS. (2013) The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: a multifactorial targeting issue. **Neurochem Int.** 62(5):796–802.
- HAZELL AS, TODD KG, BUTTERWORTH RF. (1986) Mechanisms of neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy. **Metabolic Brain Disease**.998;13:97–122.
- HEMMING ML, ELIAS JE, GYGI SP, SELKOE DJ. (2008) Proteomic Profiling of γ -Secretase Substrates and Mapping of Substrate Requirements. **PLoS Biol.** 6(10): e257. doi: 10.1371/journal.pbio.0060257.
- HENNINGER N, FELDMANN RE JR, FÜTTERER CD, SCHREMPP C, MAURER MH, WASCHKE KF, KUSCHINSKY W, SCHWAB S. (2007) Spatial learning induces predominant downregulation of cytosolic proteins in the rat hippocampus. **Genes Brain Behav.** 6(2):128-40.
- HENZEL WJ, BILLECI TM, STULTS JT, WONG SC, GRIMLEY C, WATANABE C. (1993) Identifying pro-teins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence data bases. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90, 5011-5015.
- HERSHKO A, CIECHANOVER A, VARSHAVSKY A. (2000) Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. **Nat Med.** 6(10):1073-81.

- HIRAI K, ALIEV G, NUNOMURA A, FUJIOKA H, RUSSELL RL, ATWOOD CS, JOHNSON AB, KRESS Y, VINTERS HV, TABATON M, SHIMOHAMA S, CASH AD, SIEDLAK SL, HARRIS PL, JONES PK, PETERSEN RB, PERRY G, SMITH MA. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. **J Neurosci.** 21:3017–3023.
- HIRSH R. (1974) The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. **Behavioral Biology**, v.12, n.4, p.421-44.
- HOFFMANN E, STROOBANT V. (2007) **Mass Spectrometry: Principles and Applications**, 3rd Edition. ISBN: 978-0-470-03310-4; 502 pages.
- HOLDEN MJ, COLOMBINI M. (1988) The mitochondrial outer membrane channel, VDAC, is modulated by a soluble protein. **FEBS Lett** 241:105–9.10.1016/0014-5793(88)81040-8.
- HOMEWOOD J, BOND NW, MACKENZIE A. (1997) The Effects of Single and Repeated Episodes of Thiamin Deficiency on Memory in Alcohol-Consuming Rats. **Science.** 14(1):81 -91.
- HONIG WK. Studies of working memory in the pigeon. In: HULSE SH, FOWLER H, HONIG WK. (1978) **Cognitive processes in animal behavior**. Hillsdale, Lawrence Erlbaum, p.211-48.
- HOYUMPA AM JR, STRICKLAND R, SHEEHAN JJ, YARBOROUGH G, NICHOLS S (1982) Dual system of intestinal thiamine transport in humans. **J Lab Clin Med** 99:701–708.
- HUANG W, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res.** 37, 1–13.
- HU Q, NOLL RJ, LI H, MAKAROV A, HARDMAN M, GRAHAM COOKS R. (2005) The Orbitrap: a new mass spectrometer. **J Mass Spectrom.** 40 (4):430-43.
- HUNTER DR, HAWORTH RA, SOUTHARD JH. (1976) Relationship between configuration, function and permeability in calcium-treated mitochondria. **J Biol Chem.**; 251: 5069-77.
- HUSI H, WARD MA, CHOUDHARY JS, BLACKSTOCK WP, GRANT SG. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. **Nature Neurosci.**3, 661–669 (2000).
- INESTROSA NV, ARENAS E. (2010) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. **Nat Rev Neurosci.**11:77–86.
- IRLE E, MARKOWITSCH HJ. (1983) Widespread neuroanatomical damage and learning deficits following chronic alcohol consumption or vitamin-B1 (thiamine) deficiency in rats. **Behav Brain Res.** 1983 Sep;9(3):277-94.
- IWAZAKI T, MCGREGOR I S, MATSUMOTO I. (2008) Protein expression profile in the amygdala of rats with methamphetamine-induced behavioral sensitization. **Neurosci. Lett.** 435, 113–119.
- JAMES P, QUADRONI M, CARAFOLI E, GONNET G. (1993) Protein identification by mass profile fingerprinting. **Biochem Biophys Res Commun.**31; 195 (1): 58-64.
- JANOWSKY JS, SHIMAMURA AP, SQUIRE LR. (1989) Source memory impairment in patients with frontal lobe lesions. **Neuropsychologia**, 27 (8), 1043-1056.
- JARRARD LE. (1980) Selective hippocampal lesions and behavior. **Physiological Psychology.** Volume 8, Issue 2, pp 198-206.
- JENSEN ON. (2004) Modification-specific proteomics: characterization of posttranslational modifications by mass spectrometry. **Curr Opin Chem Biol.** 8(1):33-41.

- JIANG D, SULLIVAN PG, SENSI SL, STEWARD O, WEISS JH. (2001) Zn²⁺ induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria. **J Biol Chem** 276: 47524–47529.
- JOHNSRUDE IS, OWEN AM, CRANE J, MILNER B, EVANS AC. (1999) A cognitive activation study of memory for spatial relationships. **Neuropsychologia**, v. 37, p.829-841.
- JONAS EA, BUCHANAN J, KACZMAREK LK. (1999) Prolonged activation of mitochondrial conductances during synaptic transmission. **Science** 286:1347–50.10.1126/science.286.5443.1347.
- JONIDES J. (1995) Working memory and thinking. In: Smith, E., Osherson, D. (Eds.), **An Invitation to Cognitive Science: Thinking**, vol. 3, second ed. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 215–265.
- JOPE RS, YUSKAITIS CJ, BEUREL E. (2007) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. **Neurochem Res.**32:577–595.
- JOVANOVIC JN, CZERNIK AJ, FIENBERG AA, et al. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. **Nature Neuroscience**. 2000; 3:323–9.
- KAAS JH. (1996) The reorganization of sensory and motor maps in adult mammals. In: Gazzaniga MS (ed). **The cognitive neuroscience**. cap. 4, Massachusetts, Institute of Technology, pp. 51-65.
- KASHEM MA; NELSON RM; YINGLING JD; et al (2009) Three Mechanistically Distinct Kinase Assays Compared: Measurement of Intrinsic ATPase Activity Identified the Most Comprehensive Set of ITK Inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**: 12: 70-83.
- KAWAKAMI Z, IKARASHI Y, KASE Y. (2010) Glycyrrhizin and its metabolite 18 beta-glycyrrhetic acid in glycyrrhiza, a constituent herb of yokukansan, ameliorate thiamine deficiency-induced dysfunction of glutamate transport in cultured rat cortical astrocytes. **Eur J Pharmacol**. 25;626(2-3):154-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.046.
- KE ZJ, GIBSON GE. (2004) Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism. **Neurochem Int.**45:361–369.
- KEINAN N, PAHIMA H, BEN-HAIL D, SHOSHAN-BARMATZ V. (2013) The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis. **Biochim Biophys Acta**. 1833 (7):1745-54. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.017.
- KEINAN N, TYOMKIN D, SHOSHAN-BARMATZ V. (2010) Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis. **Mol Cell Biol**. (24):5698-709. doi: 10.1128/MCB.00165-10.
- KESSELS RPC, HAAN EHF, KAPPELLE IJ, POSTMA A. (2001) Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Rev**, v.35, p.295-303.
- KIELAR C, WISHART TM, PALMER A, DIHANICH S, WONG AM, MACAULEY SL, CHAN CH, SANDS MS, PEARCE DA, COOPER JD, GILLINGWATER TH. (2009) Molecular correlates of axonal and synaptic pathology in mouse models of Batten disease. **Hum Mol Genet**.18 (21):4066-80.
- KLOSE J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik**, v.26, p.231-243.
- KMITA H, BUDZIŃSKA M. (2000) Involvement of the TOM complex in external NADH transport into yeast mitochondria depleted of mitochondrial porin1. **Biochim. Biophys. Acta**, 1509, pp. 86–94.
- KOWALTOWSKI AJ, VERCESI AE. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**26(3-4):463-71.

- KOWALTOWSKI AJ. (2000) Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Braz J Med Biol Res.** 33(2):241-50.
- KOWALTOWSKI AJ1, CASTILHO RF, VERCESI AE. (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**495 (1-2):12-5.
- KOZJAK V, WIEDEMANN N, MILENKOVIC D, LOHAUS, MEYER HE, GUIARD B, MEISINGER C, PFANNER N. (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. **J. Biol. Chem.**, 278, pp. 48520–48523.
- KRAUSKOPF A, ERIKSSON O, CRAIGEN WJ, FORTE MA, BERNARDI P.(2006) Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. **Biochim Biophys Acta.** 1757 (5-6):590-5.
- KREMER A, LOUIS JV, JAWORSKI T, VAN LEUVEN F. (2011) GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction.**Front Mol Neurosci.**4:17.
- KRIL JJ, HOMEWOOD J. (1993) Neuronal changes in the cerebral cortex of the rat following alcohol treatment and thiamine deficiency. **Journal of Neuropathology and Experimental Neuropathology.** 52:586–593.
- KRIWACKI RW, WU J, TENNANT T, WRIGHT PE , SIUZDAK G (1997) Probing protein structure using biochemical and biophysical methods: proteolysis, *MALDI* mass analysis, HPLC, and gel-filtration chromatography of p21Waf1/Cip1/Sd1. **J. Chromatogr.** 777, 23–30.
- KROEMER G, GALLUZZI L, BRENNER C. (2007) Mitochondrial permeabilization in cell death.**Physiol Rev.** 87:99–163.
- KUMAR C, MANN M. (2009).Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. **FEBS Lett.** 583, 1703–1712.
- KUPFERMANN I. (1991) Learning and memory. In: Kandel, E. R., ed. **Principles of neural science.** 3rd ed. Connecticut, Appleton and Lange, p. 997- 1008.
- LAEMMLI U K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259): 680-685.
- LANGLAIS PJ, SAVAGE LM. (1995) Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks which correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. **Behav. Brain Res.**68:75 –89.
- LANGLAIS PJ, ZHANG SX. (1997) Cortical and subcortical white matter damage without Wernicke's encephalopathy after recovery from thiamine deficiency in the rat. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 21: 434-443.
- LANGLAIS PJ, ANDERSON G, GUO SX, BONDY SC. Increased cerebral free radical production during thiamine deficiency.**Metab Brain Dis.** 1997 Jun;12(2):137-43.
- LANGLAIS PJ, MAIR RG, ANDERSON CD, McENTEE WJ. Long-lasting changes in regional brain amino acids and monoamines in recovered pyriethamine treated rats.**Neurochem Res.** 1988 Dec;13(12):1199-206.
- LANGLAIS PJ, MANDEL RJ, MAIR RG. (1992) Diencephalic lesions, learning impairments, and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat.**Behav Brain Res.** Jun 8; 48(2):177-85.
- LANGLAIS PJ; ZHANG SX; SAVAGE LM. (1996) Neuropathology of thiamine deficiency: an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. **Metab. Brain Dis.** 11: 19-37.

LANGLAIS PJ, MAIR RG, ANDERSON CD, McENTEE WJ. Monoamines e metabólitos no córtex e estruturas subcorticais: distribuição regional normal, e os efeitos da deficiência em tiamina no rato. **Brain Res.** 1987 22 de setembro; 421 (1-2): 140-9.

LEE I, SCHINDELIN H. (2008) Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. **Cell.**25; 134(2):268-78. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.046.

LEHNINGER AL, REYNAFARJE B, VERCESI A, TEW WP. (1978) Transport and accumulation of calcium in mitochondria. **Ann NY Acad Sci.** 28; 307: 160-76.

LEVASSEUR M, BARON JC, SETTE G, LEGAULT-DEMARE F, PAPPATA S, MAUGUIERE F, BENOIT N, TRAN DINH S, DEGOS JD, LAPLANE D, MAZOYER B. (1992) Brain energy metabolism in bilateral paramedian thalamic infarcts. **Brain** 115:795–807.

LEVY R, DEER TR, HENDERSON J. (2010) Intracranial neurostimulation for pain control: a review. **Pain Physician.**13(2):157-65.

LEWIS TM, ROBERTS ML, BRETAG AH. (1994) Immunolabelling for VDAC, the mitochondrial voltage-dependent anion channel, on sarcoplasmic reticulum from amphibian skeletal muscle. **Neurosci Lett.** Nov 7;181 (1-2):83-6.

LOVESTONE S. et al. (2007) Proteomics of Alzheimer's disease: understanding mechanisms and seeking biomarkers. **Expert Rev. Proteomics** 4, 227–238.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193:265–275.

LU L, ZHANG C, CAI Q, LU Q, DUAN C, ZHU Y, YANG H. (2013) Voltage-dependent anion channel involved in the α -synuclein-induced dopaminergic neuron toxicity in rats. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai). 45(3):170-8. doi: 10.1093/abbs/gms114.

MACKAY RK, COLSON NJ, DODD PR, LEWOHL JM. (2011) Differential expression of 14-3-3 isoforms in human alcoholic brain. **Alcohol Clin Exp Res.** 35(6):1041-9. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01436.x.

MAIR RG. (1994) On the role of thalamic pathology in diencephalic amnesia. **Rev Neurosci.** 5(2):105-40.

MAKARCHIKOV AF; LAKAYE B; GULYAI IE; CZERNIECKI J; COUMANS B; WINS P, GRISAR T; AND BETTENDORFF L. (2003) **Cell. Mol. Life Sci**, vol. 60, pp. 1477– 1488.

MANCZAK M, REDDY PH. (2012) Abnormal interaction of VDAC1 with amyloid beta and phosphorylated tau causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Hum. Mol. Genet.** 21:5131–5146.

MANN M; HOJRUP P; ROEPSTORFF P. (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. **Biol Mass Spectro.** 1993 Jun;22(6):338-45.

MANNELLA CA. (1997) On the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC. **J Bioenerg Biomembr.**29:525–531.

MARSHALL JF. (1984) Brain function: neural adaptations and recovery from injury. **Annual Review of Psychology**, 35:277-308.

MARTIN LJ, SEMENKOW S, HANAFORD A, WONG M. (2014) Mitochondrial permeability transition pore regulates Parkinson's disease development in mutant α -synuclein transgenic mice. **Neurobiol Aging.** (5):1132-52. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.008.

- MARTIN PR, ADINOFF B, WEINGARTNER H, et al. (1986) Alcoholic organic brain disease: nosology and pathophysiologic mechanisms. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 10 (2):147–164.
- MARTIN PR, SINGLETON CK, HILLER-STURMHÖFEL S. (2003) The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Res. Health**. 27(2):134-42.
- MATSUHIMA K, MACMANUS P, HAKIM, AM. (1997) Apoptosis is restricted to the thalamus in thiamine-deficient rats. **NeuroReport**.8: 867-870.
- MATTSON MP, GLEICHMANN M, CHENG A. (2008) Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. **Neuron**. 60:748–766.
- MAY C, BROSSERON F, CHARTOWSKI P, SCHUMBRUTZKI C, SCHOENEBECK B, MARCUS K. (2011) Instruments and methods in proteomics. **Methods Mol Biol**. 696:3-26.
- MAZZOLA V, VUILLEUMIER P, LATORRE V, PETITO A, GALLESE V, POPOLIZIO T, ARCIERO G, BONDOLFI G. (2013) Effects of Emotional Contexts on Cerebello-Thalamo-Cortical Activity during Action Observation. **PLoS One**.8 (9):e75912.
- MCCOMMIS KS, BAINES CP. (2012) The role of VDAC in cell death: friend or foe? **Biochim Biophys Acta**.1818 (6):1444-50. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.10.025.
- McDOUGALL W. (1923) **Outline of psychology**. Scribners, New York
- MENEZES M. (2006) **Neuroanatomia aplicada**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- MISHKIN M. (1982) **A memory system in the monkey**, Phil. Trans. R. Soc. London, B298 85-95.
- MISHKIN M, MALAMUT B, BACHEVALIER J. (1984) Memories and habits: two neural systems. In: Lurch G, McGaugh JL, Weingarten NM, editors. **Neurobiology of learning and memory**. New York: Guilford Press. p. 65-77.
- MORRIS RG, FREY U. (1997) Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 29; 352 (1360): 1489-503.
- MORRIS RGM, SCHENK F, TWEEDIE F, JARRARD LE. (1990) Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. **European Journal of Neuroscience**. 2(12) 1016 – 1028.
- MORRIS RGM. (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**. 12:239-260.
- MORRIS, R. G., P. GARRUD, J. N. RAWLINS, AND J. O'KEEFE. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature** 297 (5868):681-683.
- MOSCOVITCH M, ROSENBAUM RS, GILBOA, A., et al. (2005) Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. **Journal of Anatomy**, 207:35-66.
- MOSER MB, MOSER EI, FORREST E, ANDERSEN P, MORRIS RG. (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 92: 9697-9701.
- MOUSSEAU DD, RAO VL, BUTTERWORTH RF (1996) Alterations in serotonin parameters in brain on thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. **J. Neurochem**.67: 1113-1123.

- MUMBY DG, CAMELI L, GLENN MJ. (1999) Impaired allocentric spatial working memory and intact retrograde memory after thalamic damage caused by thiamine deficiency in rats. **Behav Neurosci.** 113(1):42-50.
- MUMBY DG, MANA MJ, PINEL JP, DAVID E, BANKS K. (1995) Pyridoxamine-induced thiamine deficiency impairs object recognition in rats. **Behavioral neuroscience.** 109(6):1209-14.
- MUNUJOS P, VENDRELL M, FERRER I. (1993) Proto-oncogene c-fos induction in thiamine deficiency encephalopathy: Protective effects of nicardipine on pyridoxamine induced lesions. **J Neurol Sci.** 118: 175-180.
- NAIR R, LAUKS J, JUNG S, COOKE NE, DE WIT H, BROSE N, KILIMANN MW, VERHAGE M, RHEE J. (2013) Neurobeachin regulates neurotransmitter receptor trafficking to synapses. **J Cell Biol.** 7; 200 (1):61-80. doi: 10.1083/jcb.201207113.
- NAKAGAWASAI O, TADANO T, HOZUMI S, et al. (2001) Involvement of muscarinic receptor on the impairment of avoidance learning in mice fed a thiamine-deficient diet. **Biogenic Amines** 16:199–210.
- NAKAGAWASAI O; MURATA A; ARAI A; OHBAL A; WAKUL K; MITAZAKI, S; NIJIMA F; TAN-NO K TADANO T. (2007) Enhanced head-twitch response to 5-HT related agonists in thiamine deficient mice. **J. Neural Transm.** 114: 1003-1010.
- NAKAGAWASAI O; YAMADERA F; IWASAKI K; ASAO T; TAN-NO K; NIJIMA F; ARAI H; TADANO T. (2007) Preventive effect of kami-untan-to on performance in the forced swimming test in thiamine-deficient mice: Relationship to functions of catecholaminergic neurons. **Behavioural Brain Research.** 177(2): 315-321.
- NAKAGAWASAI O; YAMADERA, F; IWASAKI K; ARAI, H; TANIGUCHI, R; TANNO, K; SASAKI H. AND TADANO T. (2004) Effect of kami-untan-to on the impairment of learning and memory induced by thiamine-deficient feeding in mice. **Neuroscience** 125: 233–241.
- NAKAGAWASAI O. (2000) Immunohistochemical estimation of brain cholineacetyltransferase and somatostatin related to the impairment of avoidance learning induced by thiamine deficiency. **Brain Research Bulletin** 52: 189-196.
- NAKASHIMA RA, PAGGI MG, SCOTT LJ, PEDERSEN PL. (1988) Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. **Cancer Res.** 48:913–919.
- NARENDRA D, TANAKA A, SUEN DF, YOULE RJ. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. **J Cell Biol.** Dec 1;183(5):795-803. doi: 10.1083/jcb.200809125.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1985) **Guide for the care and use of laboratory animals:** a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): U.S. Department of Health and Human Services.
- NAVARRO D, ZWINGMANN HAZELL C, Butterworth RF. (2005) Brain lactate synthesis in thiamine deficiency: a re-evaluation using ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J Neurosci Res.**; 79(1-2):33-41.
- NAVARRO D, ZWINGMANN C, BUTTERWORTH RF. (2008) Impaired oxidation of branched-chain amino acids in the medial thalamus of thiamine-deficient rats. **Metab Brain Dis.** 23(4):445-55. doi: 10.1007/s11011-008-9105-6.
- NICHOLLS DG, BUDD SL. (2000) Mitochondria and neuronal survival. **Physiol. Rev.**, pp. 315–360.

- NORMAN GR, STREINER DL. (2008) Biostatistics: **The Bare Essentials**. Mosby-Year, St. Louis, MO, USA.
- NOSAKA K. (2006) Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. Aug;72(1):30-40.
- NUNN JA; GRAYDON FJX; POLKEY CE; MORRIS RG. (1999) Differential spatial memory impairment after right temporal lobectomy demonstrated using temporal titration. **Brain**, v.122, p.47-59.
- O'BRIEN, E. et al. (2006) Effects of chronic risperidone treatment on the striatal protein profiles in rats. **Brain Res**. 1113, 24–32.
- O'FARREL PH. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** 250, 4007-4021.
- O'KEEFE J, DOSTROVSKY J. (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. **Behavioral Research**, 34:171 -175.
- O'KEEFE J, NADEL L. (1978) The hippocampus as a cognitive map. **Oxford Univ. Press**, London.
- OLIVEIRA FA, GALAN DT, RIBEIRO AM, SANTOS JC.(2007) Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: role of voltage-dependent K⁺ channels. **Brain Res**. 1134(1):79-86.
- OLIVEIRA L, GRAEFF FG, PEREIRA SR, OLIVEIRA-SILVA IF, FRANCO GC, RIBEIRO AM. (2010) Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. **Age**, 32 (2):187- 196.
- OLIVEIRA-SILVA IF, PINTO L, PEREIRA SRC, FERRAZ VP, BARBOSA AJA, COELHO VAA, GUALBERTO FFAS, SOUZA VF, FALEIRO RRM, FRANCO GC, RIBEIRO AM. (2007) Age-related deficit in behavioural extinction is counteracted by long-term ethanol consumption: Correlation between 5- HIAA/5HT ratio in dorsal raphe nucleus and cognitive parameters. **Behav Brain Res**, 180: 226-234.
- OLTON DS, SAMUELSON RJ. (1976) Remembrance of places passed: spatial memory in rats. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v.2, n.2, p.97-116.
- OLTON DS; BECKER JT; HANDELMANN GE. (1979) Hippocampus, space and memory. **Behavioral and brain sciences**. 2: 313-365.
- PAK CW, FLYNN KC, BAMBURG JR. (2008) Actin-binding proteins take the reins in growth cones. **Nat Rev Neurosci**. 2008 Feb;9(2):136-47. doi: 10.1038/nrn2236.
- PANDEY A, MANN M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. **Nature**. 405 (6788):837-46.
- PANNUNZIO P; HAZELL AS; PANNUNZIO M; RAO KV; BUTTERWORTH RF. (2000) Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an in vitro model for the study of cell death mechanisms in Wernicke' encephalopathy. **J. Neuroscience** 62: 286-292.
- PAPPIN DJ. (1997) Peptidemassfingerprin-tingusing *MALDI-TOF* massspectrometry. **Methods Mol Biol**, 64, 165-173.
- PARK LCH; CALINGASAN, KU; ZHANG H; GIBSON GE. (2000) Metabolic impairment elicits brain cell type-selective changes in oxidative stress and cell death in culture. **J. Neurochemistry**. 74: 114-124.

- PARK N, BAEK HS, CHUN YJ. (2015) Embelin-Induced Apoptosis of Human Prostate Cancer Cells Is Mediated through Modulation of Akt and β -Catenin Signaling. **PLoS One**.10(8):e0134760. doi: 10.1371/journal.pone.0134760.
- PARKER WD, JR, BOYSON SJ, PARKS JK. (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. **Ann Neurol**. 26:719–723.
- PASCUAL-LEONE A, GRAFMAN J, CLARK K, STEWARD W, MASSAQUOI S, LOW JS, HALLETT M. (1993) Procedural learning in Parkinson's disease and cerebellar degeneration. **Annals of Neurology**, 34, 594-602.
- PASTORINO JG, HOEK JB, SHULGA N. (2005) Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. **Cancer Res**.65:10545–10554.
- PAULSON L, MARTIN P, NILSSON CL, LJUNG E, WESTMAN-BRINKMALM A, BLENNOW K, DAVIDSSON P. (2004) Comparative proteome analysis of thalamus in MK- 801-treated rats. **Proteomics**, 4: 819-825.
- PAVLOV E, GRIGORIEV SM, DEJEAN LM, ZWEIHORN CL, MANNELLA CA, KINNALLY KW. (2005) The mitochondrial channel VDAC has a cation-selective open state. **Biochim Biophys Acta** 1710:96–102.10.1016/j.bbabi.2005.09.006.
- PAXINOS G, WATSON C. (1986) **The rat brain in stereotaxic coordinates**. London. Academy Press. 1986.
- PHILLIPS, G. R. et al. (2005) Proteomic comparison of two fractions derived from the transsynaptic scaffold. **J. Neurosci. Res**. 81, 762–775.
- PICCOLI G, VERPELLI C, TONNA N, ROMORINI S, ALESSIO M, NAIRN AC, BACHI A, SALA C. (2007) Proteomic analysis of activity-dependent synaptic plasticity in hippocampal neurons. **J Proteome Res**. 6(8):3203-15.
- PINEL JPI (2005) **Biopsicologia**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed.
- PIRES RGW ; PEREIRA, SRC; CARVALHO FM ; OLIVEIRA-SILVA IF ; FERRAZ VP; RIBEIRO AM (2007) Correlation between phosphorylation level of a 86 kDa protein and extinction of a behaviour in a model of Wernicke-Korsakoff syndrome. **Behavioural Brain Research** 180: 102-106.
- PIRES RGW, PEREIRA SRC, PITTELLA JEH, FRANCO GC, FERREIRA CLM, FERNENDEZ PA, RIBEIRO A M (2001). The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rat's open-field performance impairment. **Pharmacol Biochem Behav**, 70: 227-235.
- PIRES RGW; PEREIRA SRC; OLIVEIRA-SILVIA IF; FRANCO GC RIBEIRO AM. (2005) Cholinergic parameters and retrieval learned and re-learned spatial information: A study using a model of Wernicke- Korsakoff Syndrome. **Behavioural Brain Research** 162.11-21.
- PITKIN SR, SAVAGE LM. (2004) Age-related vulnerability to diencephalic amnesia produced by thiamine deficiency: the role of time of insult. **Behav Brain Res**. Jan 5;148(1-2):93-105.
- QI Y, JAMINDAR TM, DAWSON G (1995) hipóxia altera a homeostase de ferro e induz a síntese de ferritina em oligodendrócitos. **J Neurochem** 64: 24582464.
- RAMAKRISHNA T. (1999) Vitamins and brain development. **Physiol Res**. 48(3):175-87.
- RAMOS-VARA JA. (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet. Pathol**. 42:405-426.

- REDDY PH. (2013) Is the mitochondrial outer membrane protein VDAC1 therapeutic target for Alzheimer's disease? **Biochim Biophys Acta**.1832 (1):67-75. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.09.003.
- RESENDE LS,RIBEIRO AM,WERNER D,HALL JM,SAVAGE LM. (2012) Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. **Behav Brain Res**.232(2):421-5.
- RESENDE RS. (2012) Parâmetros comportamentais e neuroquímicos em modelo experimental de deficiência grave de tiamina. Tese. Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais.
- REYMANN S, HAASE W, KRICK W, BURCKHARDT G, THINNES FP. (1998) Endosomes: another extra-mitochondrial location of type-1 porin/voltage-dependent anion-selective channels. **Pflugers Arch**. 436 (3):478-80.
- RIBEIRO WB, PAQUET M, et al. (2010) Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci** 30(1): 316-324.
- RINDI G (1984) Thiamine absorption by small intestine. **Acta Vitaminol Enzymol** 6:47-55
- ROCHA-SOUTO B, COMA M, PÉREZ-NIEVAS BG, SCOTTON TC, et al., (2012) Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**. 45:425-437.
- RODIONOV DA; VITRESCHAKA G; MIRONOV AA; AND GELFAND MSJ. (2002) **Biol. Chem.**, vol. 277, pp. 48949-48959.
- ROLAND JJ, SAVAGE LM. (2009) Blocking GABA-A receptors in the medial septum enhances hippocampal acetylcholine release and behavior in a rat model of diencephalic amnesia. **Pharmacol Biochem Behav**. 93 (3): 480-487.
- ROSTOVTSEVA TK, ANTONSSON B, SUZUKI M, YOULE RJ, COLOMBINI M, BEZRUKOV SM. (2004) Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. **J Biol Chem**. 279 (14):13575-83.
- ROSTOVTSEVA TK, TAN W, COLOMBINI M. (2005) On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. **J Bioenerg Biomembr**. 37:129-142.
- ROSTOVTSEVA TK, TAN W, COLOMBINI M. (1995) On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. **J Bioenerg Biomembr**. 37 (3):129-42.
- ROUGEULLE C, GLATT H, LALANDE M. (1997) The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. **Nat Genet**. 17(1):14-5.
- ROZEN S, SKALETSKY H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol Biol**. 132:365-86.
- RYLE G. (1949) **The concept of mind**. San Francisco, Hutchinson.
- SAMPSON MJ, LOVELL RS, CRAIGEN WJ. (1996) Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. **Genomics**.33:283-288.
- SAMPSON MJ, ROSS L, DECKER WK, CRAIGEN WJ. (1998) A novel isoform of the mitochondrial outer membrane protein VDAC3 via alternative splicing of a 3-base exon. Functional characteristics and subcellular localization. **J. Biol. Chem**. 273:30482-30486.
- SAVAGE LM, HALL JM, RESENDE LS. Translational Rodent Models of Korsakoff Syndrome Reveal the Critical Neuroanatomical Substrates of Memory Dysfunction and Recovery. **Neuropsychology Review**, 2012. DOI 10.1007/s11065-012-9194-1.

- SAVAGE LM, HALL JM, VETRENO RP. (2011) Anterior thalamic lesions alter both hippocampal-dependent behavior and hippocampal acetylcholine release in the rat. **Learning and Memory**. 18 (12): 751-758.
- SAVAGE LM, ROLAND J, KLINTSOVA A. (2007) Selective septohippocampal - but not forebrain amygdalar - cholinergic dysfunction in diencephalic amnesia. **Brain research**. 1139:210-9.
- SAVAGE LM; CHANG Q; GOLD, PE. (2003) Diencephalic damage decreases hippocampal acetylcholine release during spontaneous alternation testing. **Learning Memory**: 10(4):242-246.
- SAVAGE LM; PITKIN, SR; KNITOWSKI KM. (1999) Rats exposed to acute pyridoxamine-induced thiamine deficiency are more sensitive to the amnesic effects of scopolamine and MK-801: examination of working memory, response selection and reinforcement contingencies. **Behavioral Brain Research** 104 (1-2): 13-26.
- SCHACTER DL, MOSCOVITCH M. (1984) Infants, amnesics, and dissociable memory systems. In: MOSCOVITCH, M., ed. **Infant memory**. New York, Plenum Press. p.173-216.
- SCHEIN SJ, COLOMBINI M, FINKELSTEIN A. (1976) Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. **J Membr Biol** 30:99–120.10.1007/BF01869662.
- SCHENKER S, HENDERSON GI, HOYUMPA AM, McCANDLESS DW. (1985) Hepatic and Wernicke's encephalopathies: current concepts of pathogenesis. **Am J Clin Nutr**. 33:2714-2726.
- SCHOENENBERGER R, HEIM S. (1994) Indication for computed tomography of the brain in patients with first uncomplicated generalized seizure. **British Medical Journal**. 309:986-9.
- SCHÜNKE M, SCHULTE E, SCHUMACHER U, VOLL M, WESKER K. (2007) Prometheus: atlas de anatomia (cabeça e neuroanatomia). 1a. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**.
- SECHI G, SERRA A, PIRASTRU MI, et al. (2002) Wernicke's encephalopathy in a woman on slimming diet. **Neurology**. 58 (11):1697–1698.
- SELKOE DJ. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol. Rev**. 81:741–766.
- SHAH MM, HAMMOND RS, HOFFMAN DA. (2010) Dendritic ion channel trafficking and plasticity. **Trends Neurosci**. 33 (7): 307-16. doi: 10.1016 / j.tins.2010.03.002.
- SHEN J, DU T, WANG X, DUAN C, GAO G, ZHANG J, LU L, YANG H. (2014) α -Synuclein amino terminus regulates mitochondrial membrane permeability. **Brain Res**. 1591:14-26. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.046.
- SHEPHERD JD, HUGANIR RL (2007) The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 23:613-43.
- SHIKATA E, MIZUTANI T, KOKUBUN Y, TAKASU T. (2000) "Iatrogenic" Wernicke's encephalopathy in Japan. **Eur Neurol**, 44(3):156–161.
- SHIMIZU S, SHINOHARA Y, TSUJIMOTO Y. (2000) Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not the adenine nucleotide translocator. **Oncogene**, pp. 4309–4318.
- SHIMURA H., HATTORI N., KUBO S., MIZUNO Y., ASAKAWA S., MINOSHIMA S., SHIMIZU N., IWAI K., CHIBA T., TANAKA K., SUZUKI T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nat. Genet**. 25:302–305 10.1038/77060.

- SHINOHARA Y, ISHIDA T, HINO M, YAMAZAKI N, BABA Y, TERADA H. (2000) Characterization of porin isoforms expressed in tumor cells. **Eur J Biochem.** 267 (19):6067-73.
- SHOSHAN-BARMATZ V, DE PINTO V, ZWECKSTETTER M, RAVIV Z, KEINAN N, ARBEL N. (2010) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. **Mol Aspects Med.** 2010 Jun;31 (3):227-85. doi: 10.1016/j.mam.2010.03.002.
- SHOSHAN-BARMATZ V, A. ISRAELSON, D. BRDICZKA, S.S. SHEU. (2006) The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. **Curr. Pharm. Des.**, pp. 2249–2270.
- SHOSHAN-BARMATZ V, GINCEL D. (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. **Cell Biochem Biophys.** 39(3):279-92.
- SHOSHAN-BARMATZ V, ZALK R, GINCEL D, VARDI N. (2004) Subcellular localization of VDAC in mitochondria and ER in the cerebellum. **Biochim Biophys Acta.** 9;1657(2-3):105-14.
- SHOSHAN-BARMATZ V, HADAD N, FENG W, SHAFIR I, ORR I, VARSANYI M, HEILMEYER LM. (1996) VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. **FEBS Lett.** 20; 386(2-3):205-10.
- SHOSHAN-BARMATZ V, KEINAN N, ZAID H. (2008) Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. **J Bioenerg Biomembr.** 40 (3):183-91. doi: 10.1007/s10863-008-9147-9.
- SIESJO BK. (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. **J. Neurosurg.**, pp. 337–354
- SINGLETON CK, MARTIN PR. (2001) Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Current Molecular Medicine** 1(2):197–207.
- SMITH EE, GROSSMAN M. (2008) Multiple systems of category learning. **Neurosc Behavior Reviews.** 32:249-264.
- SUCKAU D, RESEMANN A, SCHUERENBERG M, HUFNAGEL P, FRANZEN J, HOLLE.A. (2003) A novel *MALDI LIFT*-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Anal Bioanal Chem.** 376: 952–965. DOI 10.1007/s00216-003-2057-0.
- SUCKAU D, SCHWEIGER-HUFNAGEL U, RESEMANN A, LUBECK M. (2002) De Novo Sequencing of Tryptic Peptides using *MALDI*-TOF/TOF MS and nanoESI-Ion Trap MS. Disponível em: <http://bruker.poznan.pl/images/stories/Daltonics/noty/mt66-lcms37.pdf> . Acesso em: 25 ago 2015.
- SKULACHEV VP, BAKEEVA LE, BORIS V. et al. (2004) Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry.** Volume 256, Issue 1, pp 341-358.
- SQUIRE LR. (1992) Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. **J Cogn Neurosci.** 99:195-231.
- SQUIRE LR, ZOLA-MORGAN S. (1991) The medial temporal lobe memory system. **Science.** 253(5026):1380-6.
- SUK K. (2012) Proteomic Analysis of Glioma Chemoresistance. **Curr Neuropharmacol.** Mar; 10(1): 72–79. doi: 10.2174/157015912799362733.
- SULLIVAN PG, GEIGER JD, MATTSON MP, SCHEFF SW. (2000). Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. **Ann Neurol** 48: 723–729.

- SULLIVAN PG, RABCHEVSKY AG, KELLER JN, LOVELL M, SODHI A, HART RP, SCHEFF SW. (2004) Intrinsic differences in brain and spinal cord mitochondria: implication for therapeutic interventions. **J Comp Neurol** 474: 524–434.
- SULLIVAN PG, THOMPSON MB, SCHEFF SW. (1999) Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. **Exp Neurol** 160: 226–234.
- SWERDLOW RH. (2009) The neurodegenerative mitochondriopathies. **J Alzheimers Dis.**17(4):737-51. doi: 10.3233/JAD-2009-1095.
- SZABÓ, M. ZORATTI. (1993)The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. **FEBS Lett.**, pp. 201–205.
- SZABÓ, V. DE PINTO, M. ZORATTI. (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. **FEBS Lett.** pp. 206–210.
- TAI HC, SCHUMAN EM. (2008) Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. **Nat Rev Neurosci.** 9 (11):826-38.
- TALLAKSEN CM, BELL H, BOHMER T. (1993) Thiamin and thiamin phosphate ester deficiency assessed by high performance liquid chromatography in four clinical cases of Wernicke encephalopathy. **Alcohol Clin Exp Res.** 17(3):712–716.
- TANAKA K, HIROAKI WAKI H, IDO Y, AKITA S, YOSHIDA Y, YOSHIDA T, SPONSOR TM. (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom.** 2:151–153.
- TAN W, COLOMBINI M. (2007) VDAC closure increases calcium ion flux. **Biochim Biophys Acta.**1768:2510–2515.
- TANNU NS, HEMBY SE. (2006) Methods for proteomics in neuroscience. **Prog. Brain Res.** 158, 41–82.
- THINNES FP. (2011) Apoptogenic interactions of plasmalemmal type-1 VDAC and A β peptides via GxxxG motifs induce Alzheimer's disease - a basic model of apoptosis? **Wien Med Wochenschr.** 161:274–276.
- THINNES FP. (2015) After all, plasmalemmal expression of type-1 VDAC can be understood. Phosphorylation, nitrosylation, and channel modulators work together in vertebrate cell volume regulation and either apoptotic pathway. **Front Physiol.** 27;6:126. doi: 10.3389/fphys.2015.00126.
- THOMAS, K. (1984) **Man and the natural world.** Harmondsworth, Penguin Books.
- TOLMAN E. (1948). Cognitive maps in rats and men. **The Psychological Review**, 55, 189-208.
- TÖRNROTH-HORSEFIELD S, NEUTZE R. (2008) Opening and closing the metabo-lite gate. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 105:19565-19566.
- TULVING, E. (1987). Multiple memory systems and consciousness. **Human neurobiology**, 6, 67-70. Alemanha, Heidelberg.
- TURRENS JF. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol.**552(Pt 2):335-44.
- TYERS M, MANN M. (2003) From genomics to proteomics. **Nature.** 422 (6928): 193-197.

- UYLINGS HBM, VAN EDEN CG. (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. In: Uylings HBM, Van Eden CG, De Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MPG, editors. The prefrontal cortex: its structure, function and pathology. **Progress in brain research**, vol. 85. Amsterdam: Elsevier; p. 31–62.
- VALLAR G, SHALLICE T. (1990) **Neuropsychological impairments of short-term memory**. Cambridge, Cambridge University Press.
- VAN DER WERF YD, SCHELTENS P, LINDEBOOM J, WITTER MP, UYLINGS HB, JOLLES J. (2003) Deficits of memory, executive functioning and attention following infarction in the thalamus: a study of 22 cases with localised lesions. **Neuropsychologia**. 2003; 41:1330–1344. doi: 10.1016/S0028-3932(03)00059-9.
- VAN GROEN T, WYSS J. (1992a) Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat. **J. Comp. Neurol.** 315, 200–216.
- VAN GROEN T, WYSS J. (2003) Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. **J. Comp. Neurol.** 463, 249–263.
- VANDER HEIDEN MG, CHANDEL NS, LI XX, SCHUMACKER PT, COLOMBINI M, THOMPSON CB. (2000) Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. **Proc Natl Acad Sci USA**. 97 (9):4666-71.
- VANDER HEIDEN MG, LI XX, GOTTLEIB E, HILL RB, THOMPSON CB, COLOMBINI M. (2001) Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. **J Biol Chem**. 276 (22):19414-9.
- VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**. 2002 Jun 18;3(7).
- VAN LAAR VS, DUKES AA, CASCIO M, HASTINGS TG. (2008) Proteomic analysis of rat brain mitochondria following exposure to dopamine quinone: implications for Parkinson disease. **Neurobiol Dis**. 2008 Mar;29(3):477-89. doi: 10.1016/j.nbd.2007.11.007.
- VANN SD, ALBASSER MM. (2009) Hippocampal, retrosplenial and prefrontal hypoactivity in a model of diencephalic amnesia: evidence towards an interdependent subcortical–cortical memory network. **Hippocampus** 19, 1090–1102.
- VARSHAVSKY A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Oct 29; 93(22): 12142–12149.
- VERRILLS NM. (2006) Clinical Proteomics: Present and Future Prospects. **Clin Biochem Rev**. 27 99-116.
- VERTES RP, ALBO Z, VIANA DG. (2001) Theta-rhythmically firing neurons in the anterior thalamus: implications for mnemonic functions of Papez's circuit. **Neuroscience**. 104(3):619-25.
- VETRENO RP, ANZALONE SJ, SAVAGE LM. (2008) Impaired, spared, and enhanced ACh efflux across the hippocampus and striatum in diencephalic amnesia is dependent on task demands. **Neurobiol Learn Memory**. 90:237-244.
- VETRENO RP, KLINTSOVA A, SAVAGE LM. (2011) Stage-dependent alterations of progenitor cell proliferation and neurogenesis in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome. **Brain Research**. 1391:132-46.

- VETRENO RP, RAMOS RL, ANZALONE S, SAVAGE LM. (2012) Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Brain Research**. 1436:178-92
- VICTOR M, ADAMS RD, COLLINS GH. (1989) The Wernicke–Korsakoff Syndrome and Related Neurological Disorders due to Alcoholism and Malnutrition. Philadelphia, F. A. Davis Co.
- VICTOR M., ADAMS R. D., COLLINS G. H. (1971). The Wernicke-Korsakoff syndrome. A clinical and pathological study of 245 patients, 82 with post-mortem examinations. **Contemp. Neurol. Ser.** 7, 1–206.
- VIGILFA, OLIVEIRA-SILVA IDE F, FERREIRA LF, PEREIRA SR, RIBEIRO AM. (2010) Déficits de memória espacial e alterações metabólito serotoninérgica tálamo em tiaminatos deficientes. **Behav brain res**. 210 (1) :140-2.
- VORTMEYER AO, COLMANT HJ. (1988) Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.** 414: 61-67.
- VU TH, HOFFMAN AR. (1997) Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. **Nat Genet**. 17(1):12-3.
- WALTHER TC, MANN M. (2010) Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **J Cell Biol**. 190(4):491-500.
- WARNER RG. (1962) Nutrient requirements of the laboratory rat. In: Nutrient requirements of laboratory animals. National Academy of Sciences–National Research Council, National Academy of Sciences, Washington (DC), pp. 51 –95.
- WEEBER J, LEVY M, SAMPSON MJ, ANFLOUS K, ARMSTRON DL, BROWN SE, SWEATT JD, CRAIGEN WJ. (2002) The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. **J Biol Chem**. 277:18891–18897.
- WHO, World Health Organization, United Nations High Commissioner for Refugees. (1999) Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies. **World Health Organization**. 52 pages.
- WILDGRUBER R, HARDER A, OBERMAIER C, BOGUTH G, WEISS W, et al. (2000) Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients Proteomics and 2-DE. **Electrophoresis**. 21 (3): 2610-2616.
- WILKINS MR, SANCHEZ JC, GOOLEY AA, APPEL RD, HUMPHERY-SMITH I, HOCHSTRASSER DF, WILLIAMS KL (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**. 13:19-50
- WITT ED. (1985) Neuroanatomical consequences of thiamine deficiency: a comparative analysis. **Alcohol and Alcoholism**. 20:201 –221.
- WOLLNIK H. TOF-MS. (1993) Mass Spectrom. Rev. 12 (1):89-114.
- WORDEN RW, ALLEN HM. (2006) Wernicke's encephalopathy after gastric bypass that masqueraded as acute psychosis: a case report. **Curr Surg**. 63(2):114–116.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2006) Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies. Geneva: **World Health Organization**.

- XAVIER GF. (1985) Atividade exploratória em ratos com lesões no hipocampo e secção do fórnix. Implicações para as teorias sobre a função hipocampal. São Paulo, 288p. Tese de Doutorado apresentada à Escola Paulista de Medicina.
- XIAO B, SMERDON SJ, JONES DH, DODSON GG, SONEJI Y, AITKEN A, GAMBLIN SJ. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. **Nature**. Jul 13; 376 (6536):188-91.
- YAMAMOTO T, YAMADA A, WATANABE M, YOSHIMURA Y, YAMAZAKI N, YOSHIMURA Y, YAMAUCHI T, KATAOKA M, NAGATA T, TERADA H, SHINOHARA Y. (2006) VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. **J Proteome Res**. 5(12):3336-44.
- YATES RD, SPEICHER S, GRIFFIN PR, HUNKAPILLER T. (1993) Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. **Anal Biochem**, 214, 397-408.
- YOO B., FOUNTOULAKIS M., CAIRNS N, LUBEC G. (2001) Changes of voltage--dependent anion selective channel proteins VDAC 1 and VDAC 2 brain levels in patients with Alzheimer's disease and Down Syndrome. **Electrophoresis** 22:172-179.
- YUAN J., YANKNER B.A. (2000) Apoptosis in the nervous system. **Nature**, pp. 802–809.
- ZAID H, ABU-HAMAD S, ISRAELSON A, NATHAN I, SHOSHAN-BARMATZ V. (2005) The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. **Cell. Death. Differ.** 12:751–760.
- ZALK R; ISRAELSON A; GARTY ES; AZOULAY-ZOHAR H; SHOSHAN-BARMATZ V. (2005) Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. **Biochem J**, pp. 73–83
- ZALUZEC EJ, GAGE DA, WATSON JT. (1995) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. **Protein Expr Purif**. 6(2):109-23.
- ZHAO N, ZHONG C, WANG Y, et al. (2008) Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. **Neurobiol. Dis.** 29:176–185.
- ZHU Y1, DUAN C, LÜ L, GAO H, ZHAO C, YU S, UÉDA K, CHAN P, YANG H. (2011) α -Synuclein overexpression impairs mitochondrial function by associating with adenylate translocator. **Int J Biochem Cell Biol.**(5):732-41. doi: 10.1016/j.biocel.2011.01.014.
- ZIMITAT C, KRIL J, HARPER C, NIXON PF. (1990) Progression of neurological disease in thiamine-deficient rats is enhanced by ethanol. **Alcohol**.7:493–501.
- ZUBARAN C, FERNANDES JG, RODNIGHT R. (1997) Wernicke-Korsakoff syndrome. **Postgrad Med J**. 73(855):27–31.

CANAL ANIÔNICO DEPENDENTE DE VOLTAGEM (VDAC)**VDAC – ASPECTOS GERAIS**

A geração e a conservação de energia são essenciais para a sobrevivência e funcionamento normal da célula e envolvem a integração de múltiplas vias metabólicas. Dentre as mais importantes, estão as mitocôndrias e o metabolismo da glicose que são essenciais para os processos fisiológicos normais, tais como o crescimento e diferenciação celular (Dodson et al., 2013).

A regulação da fisiologia mitocondrial depende da comunicação entre a matriz mitocondrial e o citoplasma. Essa comunicação ocorre através de um grande número de proteínas transmembranas encarregadas da entrada e da saída de moléculas da mitocôndria de acordo com seus mecanismos de abertura e fechamento. Há uma variedade destas proteínas denominadas porinas: complexo TOM (Budzińska et al., 2009; Kmita e Budzińska, 2000), SAM 50 (Kozjak et al., 2003), VDAC (Shoshan-Barmatz et al., 2006) e PTP, Poro de Transição de Permeabilidade (Ghosh et al., 2010).

A VDAC (*voltage-dependent anion channel*) foi identificada pela primeira vez em 1976 em mitocôndrias de *Paramecium tetraurelia* (Schein et al., 1976), mas também é encontrada na membrana mitocondrial externa (MEM) de mamíferos, incluindo de humanos (Blachly-Dyson et al., 1993). Aparece localizada em outros compartimentos celulares como membrana plasmática (Baker et al., 2004; Thinnis, 2015), membrana do retículo endoplasmático (Lewis et al., 1994; Shoshan-Barmatz et al., 1996) e endossomos (Reymann et al., 1998). De acordo com Yamamoto et al., 2006, a VDAC constitui cerca de 0,4% do total da população de proteínas mitocondriais. Possui alta permeabilidade iônica, baixo peso molecular, 30 – 35 kDa (De Pinto et al., 1985) e formam poros de difusão em forma de barril (Mannella, 1997), com diâmetro de aproximadamente 1,7 nm (De Pinto, 1987). Em seu estado aberto o canal VDAC é enorme, sendo permeável a solutos de até 5 kD, quando fechado, o canal ainda é permeável a 1.5kD e torna-se mais seletivo a cátions (Rostovtseva e Colombini, 2005; Tan e Colombini, 2007).

O VDAC possui três isoformas: VDAC1, VDAC2 e VDAC3 (Sampson et al., 1996; Shinohara et al., 2000) que são codificadas pelos genes *Vdac1*, *Vdac2* e *Vdac3*, sendo que o *Vdac1* e *Vdac3* possuem 9 exons e *Vdac2* possuem 10 exons. Esse exon adicional na *Vdac2* codifica parte da região 5'-UTR (Sampson et al., 1996). Em humanos o *Vdac1* foi mapeado no cromossomo 5, e o *Vdac2* no cromossomo 10, enquanto que em camundongos, a *Vdac1* foi mapeada no cromossomo 11, *Vdac2* no cromossomo 14, e *Vdac3* no cromossomo 8.

Ambas as sequências de cDNA Vdac1 e Vdac2 tem 90% homologia em humanos e camundongos, e a sequência cDNA VDAC3 que tem 68% homologia entre humanos e camundongos (dados NCBI – Reddy, 2013). Estudos utilizando *PCR (Polymerase Chain Reaction)* em tempo real, mostraram que em células *HeLa* o gene Vdac1 é 10 vezes mais abundante do que a Vdac2 e 100 vezes mais prevalente do que a VDAC3 (De Pinto et al., 2010).

Há uma expressão diferencial tanto de VDAC1 e VDAC2 entre diferentes tecidos em ratos, com níveis elevados de ambas as isoformas observados no coração, fígado, músculo esquelético e cérebro. O VDAC1 tem uma expressão muito baixa nos testículos, entretanto, há um nível elevado da expressão de VDAC2 no mesmo tecido (Sampson et al., 1996). A isoforma VDAC3 é expressa em testículos, fígado, ovário, pulmão, renal, do baço e do rim (Sampson et al., 1998).

VDAC – FUNÇÃO MITOCONDRIAL

As mitocôndrias desempenham papel fundamental na sobrevivência celular e no desenvolvimento tecidual, em virtude do seu papel no metabolismo energético e na apoptose (Nicholls e Budd, 2002), na manutenção da homeostase intracelular do cálcio (Gunter et al., 1998), na termogênese (Kowaltowski, 2000) e geração de espécies reativas ao oxigênio (Kowaltowski e Vercesi, 1999; Kowaltowski et al., 2001; Turrens, 2003).

O VDAC é uma proteína mitocondrial que faz a mediação entre esta e o citoplasma, servindo como via de transporte de moléculas (ânions, cátions, ATP e outros metabólitos) importantes para a manutenção do metabolismo celular (Colombini, 1996). Ele também participa da morte celular por apoptose, embora o processo ainda seja pouco compreendido (McCommis e Baines, 2012; Park et al., 2015). A apoptose é o mecanismo fisiológico essencial para a eliminação seletiva de células. Desempenha um papel uma variedade de eventos biológicos incluindo a morfogênese, o processo de renovação celular e remoção de células nocivas. Estudos indicam que o nível de expressão VDAC pode servir como um fator crucial no processo de apoptose (Shoshan-Barmatz et al., 2010). Em resposta a um sinal apoptótico, fatores apoptóticos como o Citocromo C são liberados para o citoplasma por meio da ruptura da membrana mitocondrial (Kroemer et al., 2007) ou pelo aumento da permeabilidade da mesma (Shoshan-Barmatz et al., 2008). Conforme descrito por McCommis e Baines 2012, há 3 modelos propostos para a participação de VDAC na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e na indução da apoptose (Figura 10).

No modelo 1, o VDAC faz parte do complexo PTP e, portanto, libera Citocromo C através da ativação de o PTP (Szabó e Zoratti, 1993; Szabó et al., 1993). Embora, vários estudos afirmem que VDAC é a proteína da membrana externa de PTP, sua composição molecular ainda é questionada (Forte e Bernardi, 2006). Krauskopf et al., 2006 constataram que as propriedades de PTP em camundongos knockout para VDAC1 são idênticos aos dos camundongos controle, sugerindo a ausência de VDAC1 no PTP. Entretanto, estes mesmos autores ressaltam que a participação de VDAC na formação PTP permanece uma questão em aberto, pois outras isoformas de VDAC podem compensar a ausência de VDAC1. Segundo Crompton (1999) e Bernardi (1999), em condições fisiológicas normais, o complexo VDAC-ANT-CyP-D, de acordo com o modelo 1, é considerado uma estrutura estável na célula e tem como principal função, estabelecer contato entre as membranas interna e externa da mitocôndria, facilitando a comunicação entre a matriz desta e o citoplasma. Em condições patológicas de estresse oxidativo, baixo pH intracelular, deficiência em ATP e excesso de Ca^{2+} , o complexo PTP se abre e substratos de baixo peso molecular entram na matriz mitocondrial, resultando em uma tumefação mitocondrial e um aumento da permeabilidade da membrana, permitindo assim a saída de Citocromo C para o citoplasma, causando a morte celular por apoptose (Crompton, 1999; Shoshan-Barmatz e Gincel, 2003).

O modelo 2 envolve ou homo-oligomerização de canais VDAC (Zalk et al., 2005) ou hetero-oligomerização de VDAC com Bax / Bak para produzir um grande canal capaz de libertar o Citocromo C (Shimizu et al., 2000), figura 10. A VDAC em suas formas monomérica ou oligomérica pode atuar como um canal multifuncional, controlando a energia mitocondrial e a homeostase de Ca^{2+} na célula, realizando a comunicação entre mitocôndrias e organelas, como o retículo endoplasmático (Shoshan-Barmatz et al., 2004). Porém, em resposta a estímulos apoptóticos, VDAC sofre mudança conformacional e, através da sua oligomerização (dímeros, trímeros, tetrâmeros ou estados oligoméricos superiores) forma poros capazes de permitir a saída de Citocromo C da mitocôndria (Zalk et al., 2005; Keinan et al., 2010, 2013), figura 11. Ainda em respostas a sinais apoptóticos, Antonsson et al., (2001) e Banerjee e Ghosh, (2004) relataram que proteínas pró-apoptóticas, como a Bax e Bak, podem sofrer oligomerização e formar complexos com VDAC, resultando em poros grandes, o suficiente para a saída de Citocromo C. Keinan et al., (2010) verificaram que a indução da apoptose por diferentes estímulos como quimioterápicos, irradiação ultravioleta e H_2O_2 , foi acompanhada por um aumento aproximado de 20 vezes na oligomerização VDAC, enquanto que o inibidor de apoptose, como o DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid),

inibe a oligomerização de VDAC indicando a importância deste arranjo na apoptose, podendo ser considerada um alvo terapêutico para o câncer e doenças neurodegenerativas.

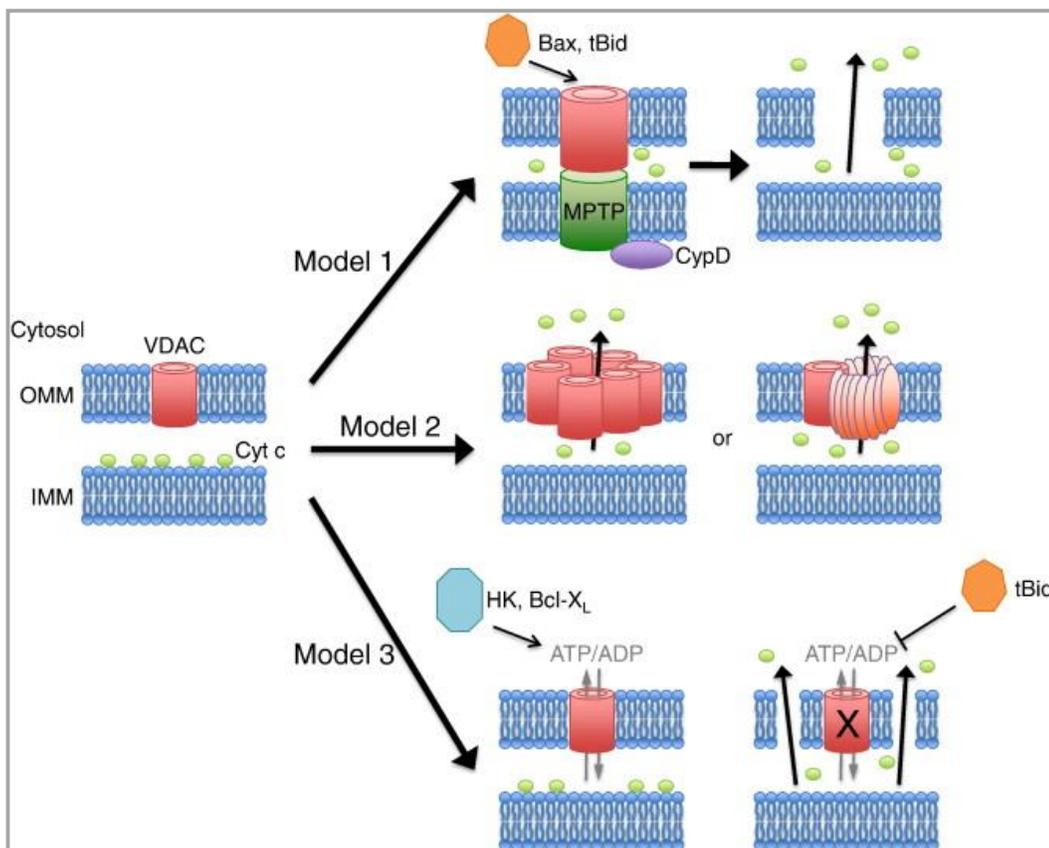


Figura 10. Modelos propostos para o papel de VDAC na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e na indução da apoptose. MPTP: Poro de Transição de Permeabilidade da membrana. VDAC: Canal aniônico dependente de voltagem. CypD: Ciclofilina D. HK: Hexoquinase. OMM: Membrana Mitocondrial externa. IMM: Membrana Mitocondrial Interna. Fonte: McCommis e Baines 2012.

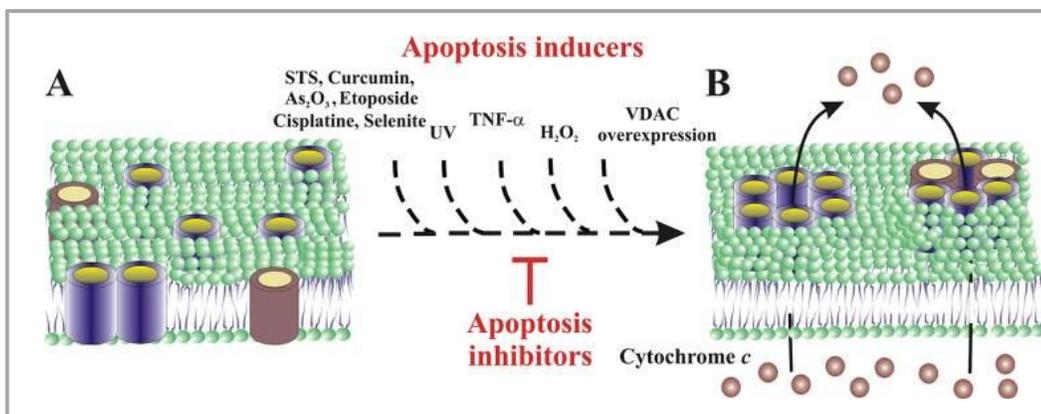


Figura 11. Modelo para sinais apoptóticos que induzem oligomerização de VDAC1 com liberação de Citocromo C. (A) Vista lateral de VDAC1 (em azul) na membrana e uma proteína pró-apoptótica (em vermelho), ambos no estado monomérico. (B) Os sinais apoptóticos (STS, curcumina, As_2O_3 , etoposida, cisplatina, selenito, $TNF-\alpha$,

H₂O₂, radiação UV ou a sobre-expressão VDAC1) induzem oligomerização de VDAC. Formação de homo- ou hetero-oligômeros com formação de poros entre monômeros de VDAC. Fonte: Keinan et al., 2010.

No terceiro modelo, agentes anti-apoptóticos, como Bcl-xL, modulam VDAC para mantê-lo no estado aberto, mantendo fluxo de ATP/ADP, mantendo assim a funcionalidade da membrana (Vander Heiden et al., 2000; Vander Heiden et al., 2001), figura 10. Por outro lado, agentes pró-apoptóticos, como tBid, induzem o fechamento de VDAC, impedindo o fluxo de ATP/ADP entre mitocôndrias e o citoplasma, criando assim, uma disfunção mitocondrial (Rostovtseva et al., 2004). Se a impermeabilidade da membrana exterior persistir, a perturbação da homeostasia mitocondrial culmina na perda da integridade da membrana mitocondrial externa com liberação do Citocromo C gerando apoptose (Épand et al., 2002).

A conformação de VDAC no estado estacionário de células intactas é aberta segundo Jonas et al., (1999). Quando totalmente aberta, VDAC permite a troca de ATP e ADP, bem como substratos de transporte de elétrons da cadeia de piruvato, malato, succinato, e NADH através da membrana mitocondrial externa (Holden e Colombini, 1988; Sampson et al., 1996). Neste estado, o canal é normalmente ligeiramente aniônico-catiônico, mas torna-se seletivo no seu estado semi-aberto, possivelmente favorecendo Ca²⁺ em relação aos outros metabólitos (Pavlov et al., 2005). Curiosamente, esta condutância catiônica também foi observada quando VDAC está totalmente aberta (Pavlov et al., 2005), sugerindo um possível papel no transporte de metabólitos maiores carregados positivamente. Em situações que ocorrem o excesso de absorção Ca²⁺ pela mitocôndria, há um aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), inibição da síntese de ATP, liberação de Citocromo C induzindo a transição da permeabilidade da membrana (Sullivan et al., 1999, 2000, 2004; Jiang et al., 2001; Brustovetsky et al., 2000, 2003). A transição da permeabilidade da membrana é caracterizada por um aumento progressivo da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, que se torna permeável à água, aos íons e a outras moléculas com peso molecular até 1,5 kDa (Hunter e Havorth, 1976; Lehninger et al., 1978; Gunter e Pfeiffer, 1990; Halestrap et al., 1998; Crompton, 1999). O influxo destas moléculas induz a expansão do seu volume. Como a superfície da membrana interna tem extensão maior do que a da membrana externa, há rompimento da externa provocando a liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citosol (Skulachev, 1996). Desta forma, há diminuição do transporte de elétrons e falência da fosforilação oxidativa induzindo a morte celular.

VDAC – NEUROPLASTICIDADE E NEURODEGENERAÇÃO

Em neurônios, a geração de ATP mitocondrial é de vital importância, pois o ATP fornecido na glicólise anaeróbia dura apenas 1-2 minutos (Siesjo, 1992). Além disso, as mitocôndrias neuronais têm uma alta capacidade de armazenamento de íons de cálcio, protegendo os neurônios contra aumentos transitórios das concentrações intracelulares de cálcio durante a atividade neuronal (Yuan e Yankner, 2000).

As mitocôndrias do cérebro são essenciais para a neurotransmissão, a plasticidade neuronal de curto e longo prazo, a resistência celular ao stress e para a adaptação comportamental (Mattson et al., 2008). A neuroplasticidade é um termo usado para descrever uma série de modificações adaptativas que ocorrem na estrutura e função de células do sistema nervoso em resposta a perturbações fisiológicas ou patológicas. Exemplos de neuroplasticidade incluem a germinação e o crescimento de axônios ou dendritos, a formação de sinapses, o fortalecimento das sinapses em resposta à ativação repetida e neurogênese. A base biológica dessa capacidade de adaptação estrutural e funcional engloba um conjunto diversificado de mecanismos celulares e moleculares, incluindo os aparelhos de pré e pós-sinápticos para a neurotransmissão, remodelação do citoesqueleto, o tráfico de membrana, a transcrição gênica, síntese de proteínas e proteólise (Shepherd e Huganir, 2007; Bramham, 2008; Greer e Greenberg, 2008; Pak et al., 2008; Tai e Schuman de 2008; Shah et al., 2010).

Células com baixa expressão da VDAC 1 proliferam lentamente, devido à troca limitada de ATP/ADP entre o citosol e a mitocôndria, indicando que a VDAC 1 é necessária para o crescimento normal da célula (Abu-Hamad et al., 2006). Entretanto, o aumento da expressão do VDAC 1 em uma variedade de células promove a morte celular devido à formação do complexo pró-apoptótico VDAC 1-Bax, alteração do potencial de membrana e liberação do Citocromo C (Kroemer et al., 2007). Portanto, o desarranjo das VDACS pode mediar processos apoptóticos, disfunções sinápticas e neurodegeneração (Törnroth-Horsefield e Neutze, 2008), como por exemplo aquelas relacionadas com a deficiência em tiamina. Dados estruturais e bioquímicos de estudos do SNC humano, bem como estudos de células e modelos animais de doenças neurodegenerativas, sugerem que a disfunção mitocondrial é um gatilho ou um propagador da neurodegeneração. Mecanismos da mitocondriopatia e da neurodegeneração podem envolver o PTP (Swerdlow, 2009). As mitocôndrias são fisicamente ou funcionalmente modificadas em muitas doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (Hirai et al., 2001) e a Doença de Parkinson (Parker et al., 1989; Bindoff et al., 1989).

Dados da literatura mostram que em exames *post mortem* de pacientes com Doença de Alzheimer há uma diminuição dos níveis totais de VDAC1 no córtex frontal e no tálamo. Esses resultados parecem estar associados à perda sináptica e neuronal, comum em pacientes com Doença de Alzheimer (Yoo et al., 2001). A Doença de Alzheimer é caracterizada por déficits na cognição e memória, assim como mudanças na personalidade e comportamento (Selkoe, 2001). Pesquisas sobre a enzima regulatória glicogênio sintase-quinase 3 beta (GSK3 β) revelaram que a atividade elevada GSK3 β está diretamente ligada ao aumento dos níveis de produção e depósito de peptídeos beta amiloide, hiperfosforilação da tau, e danos sinápticos em pacientes com Doença de Alzheimer e modelos animais de Doença de Alzheimer (Da Rocha-Souto et al., 2012; Kremer et al., 2011). É possível que a elevação da atividade da GSK3 β em cérebros acometidos pela Doença de Alzheimer e os tecidos cerebrais de camundongos modelos de Doença de Alzheimer ocorra devido à associação de peptídeos beta amiloide com a insulina, a sinalização Wnt ou receptores NMDA (Inestrosa e Arenas, 2010). GSK3 β está associada a uma disfunção mitocondrial através da fosforilação de VDAC1 em pacientes com Doença de Alzheimer (Jope et al., 2007; Pastorino et al., 2005). A GSK3 β fosforila VDAC1 na treonina em 51 resultando no desprendimento de hexoquinase de VDAC1 em neurônios (Pastorino et al., 2005). A ligação da hexoquinase com VDAC permite o acesso direto da hexoquinase ao ATP mitocondrial na via glicolítica (Nakashima et al., 1988). Estudos também revelaram que hexoquinase inibe apoptose através da ligação ao VDAC e prevenção da liberação de Citocromo C (Azoulay-Zohar et al., 2004; Zaid et al., 2005; Abu-Hamad et al., 2008), desta forma a dissociação da hexoquinase de VDAC leva a célula à apoptose e diminuição da glicólise e metabolismo da glicose, com consequente morte celular. Para determinar a relação entre VDAC1 e Doença de Alzheimer, foi verificado níveis de proteína VDAC1 nos tecidos corticais de cérebros *post-mortem* acometidos pela Doença de Alzheimer em diferentes fases de progressão da doença (precoce, definitivas e graves) e tecidos corticais de 6, 12 e 24 meses de idade. Progressivamente aumento dos níveis de proteína VDAC1 foram encontrados cérebros *post-mortem* com Doença de Alzheimer em relação aos indivíduos do grupo controle, e, progressivamente, aumento dos níveis de VDAC1 também foram encontrados nos córtices cerebrais dos 6-, 12-, e 24 meses de idade ratos A β PP (Manczak e Reddy, 2012). Thinnes (2011) verificou que a tau fosforilada e os peptídeos beta-amilóide estão fortemente associados a VDAC1 e pode causar o bloqueio dos poros mitocondriais, que por sua vez pode perturbar o transporte de proteínas e metabólitos entre mitocôndrias e do citoplasma, levando a defeitos de fosforilação oxidativa, disfunção mitocondrial e dano neuronal.

A Doença de Parkinson é uma desordem neurodegenerativa do movimento que afeta idosos. Vários estudos têm mostrado que a disfunção mitocondrial e agregação anormal da proteína α -sinucleína (α -sin), são dois os principais contribuintes para a progressão da doença (Martin et al., 2014). O VDAC também se altera na Doença de Parkinson (Hastings, 2009). O aumento da expressão de α -Syn pode causar a degeneração de neurônios dopaminérgicos através de sua interação com o VDAC1 mitocondrial, o que leva à ativação do PTP e a morte celular (Lu et al., 2013).

Sabe-se que a α -sin acumula-se nas mitocôndrias de neurônios dopaminérgicos interrompendo sua função. Zhu et al., 2011 identificaram um aumento da expressão de α -syn nas mitocôndrias de neurônios dopaminérgicos da substância negra. A α -syn liga-se ao ANT (transportador de nucleotídeos adenina) do PTP, com conseqüente deformação morfológica das mitocôndrias, despolarização da sua membrana e morte celular. Shen et al., 2014 estudando células MN9D (linhagem de células neuronais dopaminérgicas imortalizadas) verificaram aumento no nível de espécies reativas ao oxigênio intracelular, alteração na morfologia mitocondrial, ativação PTP e redução na viabilidade das células. Essas alterações estão associadas à interação com o VDAC e ANT, sugerindo que esta é tóxica para as células, promovendo neurodegeneração associada com Doença de Parkinson.