

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

Polliana Toledo Nunes

**EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA SOBRE ASPECTOS
COGNITIVOS ESPACIAIS E PERFIL DO PROTEOMA TALÂMICO
DE RATOS WISTAR**

BELO HORIZONTE

2016

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

Polliana Toledo Nunes

**EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA SOBRE ASPECTOS
COGNITIVOS ESPACIAIS E PERFIL DO PROTEOMA TALÂMICO
DE RATOS WISTAR**

Orientadora: Angela Maria Ribeiro

Coorientadora: Diana Paola Gómez Mendoza

*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*

BELO HORIZONTE

2016

043 Nunes, Polliana Toledo.

Efeitos da deficiência de tiamina sobre aspectos cognitivos espaciais e perfil do proteoma talâmico de ratos Wistar [manuscrito] / Polliana Toledo Nunes. – 2016.

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

Orientadora: Angela Maria Ribeiro. Coorientadora: Diana Paola Gómez Mendoza.

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

1. Neurociências - Teses. 2. Deficiência de tiamina. 3. Neurotransmissores. 4. Proteoma. 5. Tálamo. 6. Estresse oxidativo. I. Ribeiro, Angela Maria. II. Mendoza, Diana Paola Gómez. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por todas as oportunidades que Ele me dá e por todo cuidado comigo. Agradeço a Ele por ter colocado tantos anjos na minha vida, principalmente nessa caminhada.

Agradeço aos meus pais, Donizeti e Arani, por todo amor, apoio, compreensão, e por me deixar voar. Por estarem sempre ao meu lado. Vocês são meus exemplos de vida!

Agradeço ao meu marido Ricardo por me fazer feliz, por estar sempre comigo, por não me deixar desistir e não desistir de mim. Sem seu amor e sem sua ajuda eu não chegaria até aqui.

Agradeço ao meu irmão Plínio pelo carinho, apoio e por sempre se preocupar comigo.

À professora Angela, o meu muito obrigada pelos anos de convivência, orientação e crescimento profissional e pessoal.

Agradeço a todos que fazem parte ou que já fizeram parte da família LaNeC. Foram 7 anos de muitos estudos, experimentos, aprendizado e crescimento. Foram dias de sol e de chuvas que enfrentamos juntos. E foram bons cafés, almoços e boas conversas na copinha do LaNeC.

Agradeço em especial, à Diana pela coorientação e companheirismo, à Isabela, pela amizade, e à Cida por todo seu carinho e cuidado com todos. O meu muito obrigada a Karina, Kenia, Patrícia, Lorena e todos que deixaram lembranças de boas risadas e de confiança.

Agradeço a cada professor que abriu a porta do laboratório e cada aluno que me ajudou a executar os experimentos. Obrigada pelas experiências trocadas.

Em especial, agradeço ao professor Henrique Figueiredo pela colaboração e à Cristiana Perdigão pelo apoio técnico nas análises por LC-MS/MS no Laboratório Aquacen da Escola Veterinária, UFMG.

Agradeço à toda família do Ministério das Universidades Renovadas, principalmente aos irmãos que Deus me deu através do GOU FaFiCh. Sem vocês eu não teria experimentado o amor de Deus e não teria tido força para finalizar essa caminhada. Servir a Deus é o melhor presente que ganhei. Sentirei saudades das quartas-feiras!

O meu muito obrigada a toda minha família e todos meus amigos que estão sempre comigo e por compreenderem os dias de ausência e por me apoiarem nessa caminhada.

Dedico esse trabalho a cada um que com seu sorriso e palavras de fé e encorajamento me ajudaram a chegar até aqui!

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO	1
1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS:.....	1
2 A DEFICIÊNCIA DE TIAMINA.....	2
2.1 ALTERAÇÕES COGNITIVAS INDUZIDAS PELA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA.....	7
2.1.1 <i>Aprendizado e memória.....</i>	7
2.1.2 <i>Evidências do efeito da DT sobre aspectos cognitivos.....</i>	11
2.2 ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA..	15
2.2.1 <i>Alterações nos circuitos glutamatérgicos e GABAérgicos pela DT.....</i>	16
2.2.2 <i>Alterações em outros circuitos de neurotransmissores e suas relações com alterações comportamentais.....</i>	17
2.2.3 <i>Outras alterações bioquímicas induzidas pela deficiência de tiamina ...</i>	18
3 NEUROPROTEÔMICA.....	19
JUSTIFICATIVA.....	25
OBJETIVOS	27
1 GERAL	27
2 ESPECÍFICOS	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
1 MODELO ANIMAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
2 ESTUDO COMPORTAMENTAL	30
2.1 EQUIPAMENTO.....	31
2.2 EXPERIMENTO	32
2.2.1 <i>Treino</i>	32

2.2.2	<i>Teste comprobatório</i>	32
3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	33
4	ANÁLISE PROTEÔMICA	34
4.1	EXTRAÇÃO E DIGESTÃO DE PROTEÍNAS	34
4.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)	35
4.2.1	<i>Espectrômetro de massas SYNAPT G2-Si 2D</i>	35
4.2.2	<i>Análises por espectrometria de massas 2D-LC-MS/MS</i>	37
4.3	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA	38
5	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DE NEUROTRANSMISSORES – HPLC	39
5.1	EQUIPAMENTO CROMATOGRÁFICO E PRINCÍPIOS DE FUNCIONAMENTO	39
5.2	DOSAGEM DE GABA E GLUTAMATO.....	41
5.2.1	<i>Processamento das amostras biológicas</i>	41
5.2.2	<i>Derivatização</i>	41
5.2.3	<i>Condições cromatográficas</i>	42
6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
	RESULTADOS	44
1	MODELO EXPERIMENTAL	44
2	ESTUDO COMPORTAMENTAL	45
2.1	TREINO NO LAM.....	45
2.2	TESTE COMPROBATÓRIO	46
3	ANÁLISES PROTEÔMICA	47
3.1	VARIAÇÕES NO PROTEOMA TALÂMICO INDUZIDO PELA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA	47
3.2	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DAS PROTEÍNAS REGULADAS PELA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA	53
4	NÍVEIS DE GLUTAMATO E GABA NO TÁLAMO	57
5	ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR	58

DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	99

Figura 1. Classificação dos sistemas de memória	8
Figura 2 - Representação do Tálamo.....	13
Figura 3 - Esquema das principais vias envolvidas em funções cognitivas.....	14
Figura 4 - Esquema das etapas do processo de análise por LC-MS/MS.....	20
Figura 5 - Esquema do Espectrômetro de Massas.....	21
Figura 6 - Desenho experimental.	29
Figura 7 - Foto representativa do Labirinto Aquático de Morris (LAM).....	31
Figura 8 - Delineamento experimental detalhando as etapas da Análise Neuroproteômica.	34
Figura 9 - Esquema do Espectrômetro de massas Synapt G2-Si da Waters	36
Figura 10 - Diagrama representativo dos componentes de um HPLC	40
Figura 11 - Parâmetros fisiológicos medidos durante o episódio de deficiência de tiamina	44
Figura 12 - Desempenho comportamental durante o treino no LAM.	46
Figura 13 - Gráfico Volcano e Heat Map.....	52
Figura 14 - Escala dinâmica de proteínas identificadas.	53
Figura 15 - Gráficos com dados quantitativos das concentrações de Glutamato e GABA no tálamo.	57
Figura 16 - Gráficos de Dispersão.....	59
Figura 17 - Esquema do ciclo da vesícula sináptica e proteínas desregulados pela DT.	66
Figura 18 - Esquema das vias metabólicas com proteínas desreguladas pela DT.	72

Tabela 1 - Circuitos neuroquímicos afetados pela DT	15
Tabela 2 - Recentes estudos neuroproteômicos em modelos experimentais utilizando a técnica LC-MS/MS.....	24
Tabela 3 - Composição da ração produzida no laboratório.....	29
Tabela 4 - Composição da mistura de sais da ração deficiente em tiamina	30
Tabela 5 - Composição da mistura de vitaminas da ração deficiente em tiamina.....	30
Tabela 6 - Parâmetros comportamentais avaliados durante o primeiro minuto do teste comprobatório no LAM.....	46
Tabela 7 - Proteínas significativamente reguladas identificadas no tálamo.....	48
Tabela 8 - Top 10 termos GO.....	54
Tabela 9 - Vias de sinalização e metabólicas enriquecidas pela análise KEGG pathways	56

Anexo 1 - Certificado do CEUA	99
Anexo 2 - Dados referentes aos pesos corporais (g) dos animais dos grupos controle e deficiente de tiamina.....	100
Anexo 3 - Dados referentes ao consumo de ração (g) dos animais dos grupos controle e deficiente de tiamina.....	101
Anexo 4 - Dados referentes ao consumo de água (ml) dos animais dos grupos controle e deficiente de tiamina.....	102
Anexo 5- Dados referentes ao desempenho dos animais (latência) durante o treino no LAM.	103
Anexo 6 - Dados referentes ao desempenho dos animais (distância percorrida) durante o treino no LAM.....	104
Anexo 7 - Dados referentes à velocidade de nado dos animais durante o treino no LAM.	105
Anexo 8 - Dados referentes ao tempo de permanência no quadrante alvo durante o teste comprobatório no LAM.....	106
Anexo 9 - Dados referentes à distância média ao alvo durante o teste comprobatório no LAM.	107
Anexo 10 - Dados referentes à velocidade média de nado durante o teste comprobatório no LAM	108
Anexo 11 - Dados referentes à distância total (m) percorrida durante o teste comprobatório no LAM.....	109
Anexo 12 - Acesso e descrição das 1440 proteínas identificadas	110
Anexo 13 - Representação das proteínas que estão presentes nos top 10 termos da categoria GO: Processos Biológicos.....	117
Anexo 14 - Representação das proteínas que estão presentes nos top 10 termos da categoria GO: Componentes Celular.....	118
Anexo 15 - Representação das proteínas que estão presentes nos top 10 termos da categoria GO: Função Molecular	122
Anexo 16 - Representação das proteínas que estão presentes em vias de sinalização e metabólicas enriquecidas pela análise KEGG.....	124
Anexo 17 - Dados referentes a concentrações de Glutamato e GABA.....	127

Anexo 18 - Dados referentes às análises de regressão linear entre os parâmetros bioquímicos (GABA, glutamato e taxa) e a latência dos animais durante o treino no LAM	128
Anexo 19 - Dados referentes às análises de regressão linear entre as abundâncias das proteínas e a latência dos animais durante o treino no LAM	129
Anexo 20 - Dados referentes às análises de regressão linear entre os parâmetros bioquímicos	132

- μg - micrograma
 μl - microlitro
ACh - Acetilcolina
AChE - Acetilcolinesterase
ANOVA - Análise de Variância
ATP - *Adenosine triphosphate*: trifosfato de adenosina
AUC - *Area Under The Curve*: área abaixo da curva
BDNF - *Brain-Derived Neurotrophic Factor*: Fator Neurotrófico Derivado Do Cérebro
BHT - Hidroxitolueno Butilado
C - Grupo Controle
 CaCO_3 - Carbonato de cálcio
CC - Componentes Celular
CEUA - Comissão de Ética de Uso de Animais
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Cloreto de cobalto hexahidratado
CPF - Córtex pré-frontal
CPLX - Complexinas
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - Sulfato de Cobre Pentahidratado
d1 ou d2 - Distância 1 ou Distância 2
DA - Doença de Alzheimer
David - *Database For Annotation, Visualization and Integrated Discovery*: Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta integrada
DDA - *Data-dependent acquisition*: aquisição dependente de dados
DH - Doença de Huntington
DIA - *Data-independent acquisition*: aquisição não dependente de dados
DP - Doença de Parkinson
DT - Deficiência de Tiamina
DTP - Deficiência de Tiamina induzida pela Piritiamina
DTT - DL-Dithiothreitol
DYN - Dinamina
IE - Índice de Extinção
ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica
ESI - *Electrospray Ionization*: Ionização por Eletrospray
EW - Encefalopatia de Wernicke
FDR - *False-discovery rate*: taxa de falsa descoberta

FeSO₄.7H₂O - Sulfato Ferroso Heptahidratado

FM - Função Molecular

FTICR - *Fourier-transform ion cyclotron resonance*: Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier

Gaba - *γ-aminobutíric acid*: ácido γ -aminobutírico

GO - *Gene Ontology*

GTP - guanosina trifosfato ativa

HCl - Ácido Clorídrico

HDMS - *High Definition Mass Spectrometry*: Espectrometria de Massas de Alta Definição

HIAA - Hidroxindolacético

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

i.p. - Intraperitoneal

ICAT - *Isotope-coded affinity tag*: marcação isotópica e separação por afinidade

iTRAQ - *Isobaric Tags For Relative And Absolute Quantitation*: quantificação isobárica para quantificação absoluta e relativa

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*: União Internacional de Química Pura e Aplicada

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes*: Enciclopédia Kyoto de Genes

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

KI - Iodeto de Potássio

LAM - Labirinto Aquático de Morris

LaNeC - Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular

LC - Cromatografia Líquida

LC-MS - Espectrometria de Massas Acoplada à Cromatografia Líquida

M - Mol

MgSO₄.7 H₂O - Sulfato de Magnésio Heptahidratado

MnSO₄.H₂O - Sulfato de Manganês Monohidratado

MPA - ácido 3-mercaptopropiônico

MS - *Mass Spectrometry*: Espectrometria de massas

MS^E - MS de alta energia

NaCl - Cloreto de Sódio

NE - Nordeste

NO - Noroeste

PB - Processos Biológicos

PPM - Parte Por Milhão

RE - Retículo Endoplasmático

RP - Fase Reversa

S.E.M - *Standard Error Median*: erro-padrão médio

SE - Suldeste

SDS – PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SILAC - *Stable Isotope Labels With Amino Acids In Cell Culture*: marcação isotópica em aminoácidos em cultura de células

SNARE - *soluble N-ethylmaleimide sensitive fator attachments receptor*: proteína de ligação do fator sensível à N-etilmaleimida solúvel

SNC - Sistema Nervoso Central

STRING - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Gene*

SO - Sudoeste

SW - Síndrome de Wernicke

SWK - Síndrome de Wernicke-Korsakoff

T+ - Vitamina B1

t1 ou t2 - Tempo 1 ou Tempo 2

TCA - Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos / Ciclo de Krebs

TDP - Tiamina Difosfato

TMP - Tiamina Monofosfato

TOF - *Time of flight*: Tempo de Vôo

TPK - Tiamina Pirofosfoquinase

TPP - Tiamina Pirofosfato

TRKB - Tirosina Quinase B

TTP - Tiamina Trifosfato

UPLC - *Ultra-Performance Liquid Chromatography*: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

v1 ou v2 - Velocidade 1 ou Velocidade 2

VDAC - *Voltage Dependent Anion Channel*: Canal Aniônico Voltagem Dependente

VS - Vesícula sináptica

z - carga

ZnSO₄.7H₂O - Sulfato de Sinco Hepta Hidratado

A deficiência de tiamina (DT) aguda resulta em alterações neurológicas progressivas, que se não tratada pode levar a lesões cerebrais crônicas e déficits cognitivos graves, caracterizando uma classe de doenças, denominadas neurodegenerativas nutricionais. Estudos utilizando modelo experimental de roedores submetidos à DT têm mostrado evidências de que a deficiência desta vitamina causa alterações neuroquímicas e lesões em regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) e prejuízos cognitivos e motores, bastante similares aos observados em humanos com DT. A participação de proteínas específicas nos mecanismos moleculares responsáveis pela morte neuronal que podem, como consequência, gerar alterações cognitivas, vem sendo investigada por vários pesquisadores, incluindo o nosso grupo. Em estudos prévios, observamos que a DT causa alterações em proteína presente em vesícula sináptica, a sinapsina 1, e também afeta os níveis de proteínas talâmicas, entre elas, foi identificada uma proteína importante para manutenção e sobrevivência celular, o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC). Além disso, verificamos que algumas dessas alterações estão relacionadas com o desempenho dos animais em tarefas cognitivas espacial. A partir desses dados, decidimos executar um estudo mais detalhado e amplo, dando assim uma continuidade à essas investigações. O objetivo do presente estudo foi investigar o proteoma e os níveis de neurotransmissores nos tálamos de ratos Wistar deficientes de tiamina e também avaliar o desempenho cognitivo espacial, aprendizado e memória, no Labirinto Aquático de Morris (LAM). Para isso, foi utilizado o modelo de ratos adultos (DTP) submetidos à DT induzida por piritiamina. Após o aparecimento dos últimos sinais neurológicos graves, o episódio de DT foi interrompido. Após duas semanas de recuperação os animais foram avaliados em tarefas cognitivas espaciais no LAM. No dia seguinte ao final do estudo comportamental, os animais foram eutanasiados e o tálamo foi dissecado. Observamos que a DT afeta a variação do peso corporal, consumo de ração e água. Além disso, verificamos que os animais DTP tiveram déficit no desempenho durante o processo de aprendizagem, que foi revertido pelo treino sucessivo. A análise neuroproteômica usando quantificação sem marcação, revelou desregulação de 183 proteínas, das 1440 proteínas identificadas. Destas 183, 153 foram *reguladas* negativamente pela DT e as demais foram *reguladas* positivamente. A partir do uso de ferramentas de bioinformática, as proteínas foram categorizadas e associadas de acordo com anotações funcionais e vias de sinalização e metabólicas. Essas análises mostraram que a DT afeta proteínas que fazem parte de diferentes processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Entre os processos biológicos afetados, destacamos o estresse oxidativo, o qual está envolvido no processo de

neurodegeneração. Esse foi afetado pela DT em 7 alvos proteicos. Outra evidência do envolvimento da DT com o estresse oxidativo é a *desregulação* de proteínas consideradas marcadores de estresse oxidativo como a ferritina, além disso a indução de citocina pró-inflamatória pela DT indica um possível mecanismo de defesa em resposta a esse processo. Os dados também mostraram que a DT altera proteínas importantes para o funcionamento do ciclo da vesícula sináptica (VS), tais como a Complexina 2, Dinamina 3, complexo adaptador AP2, V-ATPase. Essas alterações podem interferir em processos como, exocitose, endocitose e preenchimento da VS, e conseqüentemente a liberação de neurotransmissores. Além disso, a síntese de neurotransmissores também pode ser afetada pela DT, devido a *desregulação* de enzimas não dependentes de tiamina importantes para manutenção de vias metabólicas. Um equilíbrio entre sistemas funcionais dependentes de GABA e glutamato pode ser uma possível explicação para a recuperação da informação aprendida após repetições da tarefa. Os dados apontam diferentes alvos moleculares que podem ser explorados em mais detalhes em estudos futuros. Os achados representam os primeiros passos na direção de uma contribuição para o entendimento do papel de componentes moleculares nos processos neurodegenerativos, que comprometem aspectos da função cognitiva.

PALAVRAS-CHAVES: deficiência de tiamina, tálamo, aprendizado espacial, neuroproteoma, neurotransmissor, ratos.

Acute thiamine deficiency (TD) results in progressive neurological changes, which if left untreated, can lead to chronic brain damage and cognitive deficits, featuring a class of neurodegenerative diseases, called nutritional neurodegenerative diseases. Studies using rodent TD experimental model have shown that TD causes neurochemical changes and injuries in different regions of the Central Nervous System (CNS) and cognitive and motor impairment, which are similar to the deficiencies observed in humans. The involvement of specific proteins in the molecular mechanisms responsible for the neuronal death that leads to cognitive changes has been investigated by several groups, including our own. In previous studies, our group has shown that TD alters regulation of a protein present in the synaptic vesicle, synapsin I, and affects certain proteins levels in the thalamus. Among the proteins affected, the voltage-dependent anion channel (VDAC) was identified, an important protein for cell maintenance and survival. In addition, we verified that these effects are associated with spatial cognitive performance of the rats. According to these results, we decided to perform a more detailed and extensive study. The aim of the present study was to investigate the proteomic profile of the thalamus of male Wistar rats thiamine deficient. In addition, the spatial cognitive performance, learning and memory were assessed, using the Morris Water Maze task (MWM). We used the pyriethiamine-induced thiamine deficiency model in adult rats (PTD). After the onset of the last neurological signs, the TD was interrupted. Following two weeks of recovery, spatial cognitive tasks using the MWM were performed. One day after the behavioral test, the animals were killed and the thalamus were dissected. We observed that TD affects the body weight gain, and food and water intake. In addition, we noted that the PTD animals showed deficits in performance during the learning process, which was reverted by training. The neuroproteomic analysis, using label-free quantification, revealed deregulation of 183 proteins, out of 1440 proteins identified. Among these 183 proteins, 153 were down-regulated and the remaining were up-regulated after the vitamin deficiency. Using bioinformatics tools, the proteins were categorized and associated according to functional annotation and signaling, and to metabolic pathways. These analyses showed that the TD affected proteins involved in different biological processes, cellular components and molecular functions. One of the biological processes affected was oxidative stress mechanism, which is involved in the TD neurodegeneration process. Seven of the proteins identified in the proteomic analysis were involved in this mechanism and were altered in comparison to the control animals. Other evidence relating oxidative stress mechanism dysregulation to TD is the alteration of a protein known as ferritin, which is

considered a marker of cells exposed to oxidative stress. Also, the pro-inflammatory cytokine up-regulated by TD indicates a possible defense mechanism in response to this process. The data also showed that the TD affects several proteins involved in the synaptic vesicle (SV) cycle function, such as complexin 2, dynamin 3, AP2 adaptor complex, V-ATPase. These down-regulations might interfere in processes such as exocytosis, endocytosis and filling of the VS and, consequently, affect the release of neurotransmitters. In addition, the synthesis of neurotransmitters can also be affected by TD, due to down-regulation of thiamine-non-dependent enzymes. These enzymes are important for the maintenance of the metabolic pathways in the thalamus by TD. A modification of the balance between functional dependent system of GABA and glutamate may be a possible explanation for the recovery of information learned after repetitions of tasks. The data obtained in the present work indicates that different molecular targets that affect different pathways can be explored in further studies. These findings contribute to understanding the role of different proteins and molecular components in neurodegenerative processes that will lead to impairment of cognitive aspects.

Key words: thiamine deficiency, thalamus, spatial learning, neuroproteome, neurotransmitter, rats.

1 Considerações iniciais:

A tiamina, também conhecida como vitamina B1, é um nutriente sintetizado naturalmente em plantas, fungos e outros microorganismos, sendo adquirida pelo nosso corpo através do consumo de alimentos, como carnes e cereais (Singleton e Martin, 2001). É um composto hidrossolúvel, que desempenha um papel central no metabolismo cerebral (Héroux e Butterworth, 1995; Martin *et al.*, 2003) como no desenvolvimento e na manutenção da função cerebral, participando da comunicação entre neurônios (Gibson e Blass, 2007), modulando sinais no sistema nervoso e participando do mecanismo de reparação de tecidos nervosos (Song *et al.*, 2009).

A Deficiência de Tiamina (DT) é considerada uma doença que envolve prejuízos no metabolismo oxidativo, podendo causar perda neuronal (Gangolf *et al.*, 2010), morte mitocondrial e apoptose celular (Singleton e Martin, 2001). Em seres humanos, a DT pode resultar em doenças nas quais os indivíduos apresentam sintomas de déficits cognitivos, como por exemplo, na Síndrome de Wernicke (SW) (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 DT 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). Esse modelo tem sido bastante útil nos estudos de mecanismos relacionados à neurodegeneração e também das bases neurobiológicas de aspectos comportamentais (Pires *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; De Freitas-Silva *et al.*, 2010; Vigil *et al.*, 2010; Resende *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2015; De Fátima Oliveira-Silva *et al.*, 2015).

Estudos iniciais sobre os efeitos da DT em ratos adultos, realizados pelo nosso grupo, mostraram que a DT associada ao consumo de etanol crônico causa prejuízos em 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 DT - também foram

observados sobre as atividades da acetilcolinesterase (AChE) no neocórtex e hipocampo (Pires *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2005). Também foi observado que a DT 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 (Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006). Esse efeito sobre aspectos cognitivos foi verificado ser também significativamente relacionado com o nível de fosforilação de uma proteína p86 no hipocampo (Pires *et al.*, 2007). Em estudo posterior, nosso grupo mostrou que a p86 é uma proteína envolvida com a liberação de neurotransmissores, denominada Sinapsina I (Resende *et al.*, 2012). Dados de outro estudo nos mostrou que a DT afeta de forma significativa os níveis de sete proteínas talâmicas, sendo quatro *reguladas* negativamente e três positivamente. Uma dessas proteínas alterada e relacionada com o desempenho cognitivo dos animais foi identificada como sendo o Canal Aniônico Voltagem Dependente (VDAC: *Voltage Dependent Anion Channel*) (Bueno *et al.*, 2015).

Os achados de que a DT causa disfunções nos processos de liberação de neurotransmissores e afeta proteínas que fazem parte do mecanismo de excitação e de sobrevivência celular, nos motivou a estudar a relação entre o efeito da DT sobre o proteoma talâmico e nos aspectos comportamentais. O tálamo foi escolhido como um primeiro alvo neste tipo de estudo, por se tratar de uma das regiões mais susceptíveis aos efeitos da DT e, além disto, por desempenhar um papel em funções cognitivas espaciais, devido à suas conexões com o hipocampo. O estudo realizado por Bueno *et al.* (2015) representa, para o nosso grupo, o início da utilização da análise proteômica como um instrumento para explorar os efeitos da DT sobre componentes moleculares, da classe proteica. Os dados obtidos por Bueno *et al.* (2015) foram as bases para decidirmos executar um estudo mais detalhado e amplo, utilizando uma técnica mais sensível e robusta, dando assim uma continuidade à essas investigações.

2 A Deficiência de tiamina

A vitamina B1, foi primeiramente mencionada na literatura médica chinesa a 4000 anos atrás (Said, 2011), isolada em 1926 (Jansen e Donath, 1926) e sintetizada pela primeira vez em 1936 (Williams e Cline, 1936).

Na sua forma livre (T⁺), a vitamina B1 é composta por um anel tiazol e um grupo pirimidina, que juntos formam uma estrutura de dois anéis contendo enxofre e unidos por um grupo metileno (Said, 2011). Após ser ingerida, é absorvida pelo intestino delgado por dois transportadores específicos ThTr1 e ThTr2 (produtos dos genes SLC19A2 e SLC19A3, respectivamente) (Martin *et al.*, 2003; Mayr *et al.*, 2011). Essa vitamina existe em 4 formas: não fosforilada (T⁺), tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato (TDP) ou tiamina pirofosfato (TPP) e tiamina trifosfato (TTP). De acordo com Bettendorff e cols. (1993), a fosforilação da forma livre T⁺ em TMP ocorre como um pré-requisito para que seja transportada através das membranas das organelas, principalmente nos casos da proliferação neuronal. Além disso, a TMP é considerada como um substrato para gerar a forma ativa (TDP ou TPP), através da ação da tiamina pirofosfoquinase (TPK) e para produzir T⁺ através da timina fosfatase (Gibson e Zhang, 2002; Lonsdale, 2006; Mayr *et al.*, 2011; Manzetti *et al.*, 2014). A TTP é originada a partir da fosforilação da TDP e compõe 5-10% da concentração de tiamina no corpo (Bettendorff *et al.*, 1993; Nakagawasai, 2005), atuando na modulação de canais de cloreto (Bettendorff *et al.*, 1994).

A TDP é considerada a forma ativa difosforilada da tiamina que tem sua principal função como coenzimas em reações em vias do metabolismo energético celular, como a reação do piruvato à acetil-CoA e reações das vias das pentoses e o ciclo de Krebs ou Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA: *tricarboxylic acid cycle*) (Haas, 1988; Berg *et al.*, 2004). No citoplasma, a TDP atua na via das pentoses como cofator da enzima Transcetolase, participando do metabolismo de glicose (glicólise/gliconeogênese) e na biossíntese de lipídio. Essa forma fosforilada da tiamina é transportada para a mitocôndria, onde atua como cofator do Complexo Piruvato Desidrogenase e da enzima α -Cetoglutarato Desidrogenase, sendo que essa última faz parte do TCA (Mayr *et al.*, 2011).

A redução dos níveis de T⁺ e de suas formas fosforiladas pode ser induzida pela inadequada ingestão e/ou absorção de tiamina, associada ou não com o abuso do álcool (Thomson *et al.*, 1970; Harper, 2009; Kopelman *et al.*, 2009). Essa deficiência também pode ocorrer pelo aumento da demanda ou pela perda de B1 por hiperemese, que ocorrem durante a gravidez (Butterworth *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 2002), na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Alcaide *et al.*, 2003) e em doenças gastrointestinais (Butterworth 2009).

A DT é considerada uma doença nutricional, metabólica enzimática e neuroinflamatória que afeta tanto o sistema nervoso quanto o sistema cardiovascular (Abdou e Hazell, 2015). A carência desta vitamina resulta no enfraquecimento da função mitocondrial associada à diminuição da atividade das enzimas dependentes de tiamina citadas acima, envolvidas no metabolismo da glicose, e que em consequência, causa prejuízo na síntese de ATP, mudanças na função cerebral, alterações em neurotransmissores, estresse oxidativo/nitrosativo, acidose láctica, diminuição do pH cerebral, excitotoxicidade, inflamação, estresse do Retículo Endoplasmático (RE), disfunção da barreira hemato-encefálica e apoptose (Jhala e Hazell, 2011). A falta de vitamina B1 afeta também a biossíntese de lipídios e, conseqüentemente, causa prejuízo na constituição da bainha de mielina (Okazaki *et al.*, 1990).

Estudos têm mostrado evidências de que a tiamina também possui outras funções no SNC, tais como participação na modulação de canais dependente de voltagem (Oliveira *et al.*, 2007; Moreira-Lobo *et al.*, 2016), em vias de transdução de sinais (Czerniecki *et al.*, 2004) e parece exercer ação protetora contra substâncias tóxicas como o acetaldeído (Aberle *et al.*, 2004).

A DT pode resultar em doenças neurodegenerativas como a Encefalopatia de Wernicke (EW). Os principais sintomas da EW são: oftalmoplegia, ataxia, perda de memória, confusão mental (Butterworth 2009) e hipoatividade da marcha e da postura (Zubaran *et al.*, 1997). Estudo prospectivo de necropsia realizado entre Janeiro de 1978 e Dezembro de 1990 mostrou que a prevalência da EW no Brasil é de 2,2% em adultos (Lana-Peixoto *et al.*, 1992).

A EW, se não tratada, leva a uma condição mais debilitante que é a Síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK), uma condição caracterizada pelo surgimento de déficits cognitivos, neurológicos e comportamentais, frequentemente encontrados em pacientes com diagnóstico de alcoolismo crônico (Dror *et al.*, 2014; Scalzo *et al.*, 2015). Há relatos na literatura de lesões cerebrais em pacientes com DT, as quais afetam, predominantemente, o tálamo, corpos mamilares, região periaquedutal, assoalho do quarto ventrículo, hipotálamo, vermis cerebelar, hipocampo, ponte, cerebelo e CPF (Torvik, 1986; Victor *et al.*, 1989; Sullivan e Pfefferbaum, 2009). A administração de tiamina em pacientes na fase aguda, EW, pode prevenir, reduzir ou reverter os sintomas, porém em casos crônicos (SWK), devido à lesões relacionadas à morte neuronal, os comprometimentos são irreversíveis (Sechi e Serra, 2007).

A DT também parece estar envolvida em outras doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson (DP) e Doença de Alzheimer (DA) (Tanev *et al.*, 2008). Múltiplas semelhanças existem entre a DT e a DA, principalmente em detrimento da redução do metabolismo da glicose no cérebro (Gibson *et al.*, 2016). Estudos utilizando modelos animais sugerem que a DT tem papel na patogênese da DA devido ao acúmulo de placas de β -amilóide, formação de placas e prejuízo cognitivo (Karuppagounder *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Em pacientes com DP foram diagnosticados baixos níveis de T+ no fluido cerebrospinal (Jiménez-Jiménez *et al.*, 1999) e diminuição da imunorreação da enzima do complexo α -cetoglutárico desidrogenase na substância nigra (Mizuno *et al.*, 1994; Gibson e Zhang, 2002). A suplementação com tiamina também tem sido utilizada em pacientes com essas doenças neurodegenerativas (Lu'o'ng e Nguyen, 2011; Costantini *et al.*, 2015).

As características compartilhadas entre a DT e doenças neurodegenerativas primárias constituem uma plataforma única na pesquisa sobre doenças neurodegenerativas (Gibson *et al.*, 2016). Trata-se de doenças com etiologias diferentes, eventos e sintomas distintos. No entanto, por possuírem etapas moleculares similares, relacionadas ao processo de morte neuronal, o uso do modelo da DT como instrumento na pesquisa básica se torna uma vantagem. Isto porque, diferentemente de outras doenças neurodegenerativas primárias, no caso da DT o pesquisador conhece a causa primária e, portanto, tem mais controle das variáveis.

Os mecanismos pelos quais a DT induz o processo neurodegenerativo são alvos de investigação. De acordo com Liu e cols. (2016), o estresse oxidativo, o estresse do RE e a autofagia são mecanismos que contribuem para a neurodegeneração mediada pela DT, destacando-se que se tratam também de mecanismos implicados na patogênese de outras doenças neurodegenerativas, por exemplo, DA, DP, doença de Huntington (DH) e esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Doyle *et al.*, 2011; Tanida, 2011). Prejuízo no metabolismo de glicose, inflamação e excitotoxicidade também são mecanismos importantes que levam à morte celular associada à DT (Hazell e Butterworth, 2009).

Para estudar os mecanismos que levam a neurodegeneração induzida pela DT e seus efeitos no SNC são utilizados modelos experimentais. A DT pode ser reproduzida através de um dos quatro protocolos: (i) dieta deficiente em B1; (ii) dieta deficiente em B1 associada ao tratamento crônico com etanol e (iii) dieta deficiente em B1 associada à administração

parenteral de piritiamina (DTP), um inibidor da pirofosfoquinase, enzima responsável pela produção da forma ativa da tiamina, a TDP e (iv) deficiência ou restrição maternal de B1 (Hakim e Pappius, 1983; Haas, 1988; Vortmeyer e Colmant, 1988; Langlais *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2007; De Freitas-Silva *et al.*, 2010). Esses modelos experimentais têm revelado que a DT induz disfunções em regiões cerebrais específicas, em um padrão bastante similar ao que ocorre nos seres humanos (Savage *et al.*, 2012).

Ao longo do episódio de DT, sinais clínicos acontecem e funcionam como evidências para se acompanhar os estágios de evolução do processo, que culmina com os animais apresentando um estado de DT grave. Os sinais clínicos observados são: alopecia, hipersensibilidade a estímulos, anorexia, perda do tônus muscular, ataxia, postura distônica (hopistótonos), perda do reflexo de endireitamento e convulsões. Nos últimos estágios, nos quais os animais apresentam sinais neurológicos da deficiência, se a tiamina não for rapidamente repostada, os animais podem morrer (Zhang *et al.*, 1995; Mousseau *et al.*, 1996; Mousseau *et al.*, 1996; Ciccia e Langlais, 2000). O tempo de aparecimento dos primeiros sinais variam de acordo com o protocolo seguido. No modelo de DTP (modelo utilizado no presente estudo: deficiência na dieta associada ao tratamento com piritiamina), a progressão das sequelas neurológicas é acelerada, sendo acompanhadas por alterações cognitivas, como déficit no aprendizado e memória espacial e neuroquímicas (Zhang *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Hazell e Butterworth, 2009; Vigil *et al.*, 2010; Resende *et al.*, 2012). Nesse modelo os sinais clínicos acontecem por volta do 10º dia de tratamento e os sinais neurológicos no 15º dia, com uma variação média de 2 a 3 dias (Zhang *et al.*, 1995; Hazell e Butterworth, 2009; Bueno *et al.*, 2015).

A neurodegeneração induzida pela DTP ocorre principalmente no tálamo e nos corpos mamilares, as quais são áreas mais afetadas em ratos e em seres humanos com DT (Langlais *et al.*, 1992; Matsushima *et al.*, 1997). Estudos mostram que o tempo de tratamento com DTP influencia na progressão das lesões neuropatológicas no tálamo. Quanto maior tempo para reverter o quadro de DT, após aparecimento de convulsões, mais núcleos do tálamo são lesados (Zhang *et al.*, 1995; Savage *et al.*, 2012). Outras regiões cerebrais, como hipocampo, neocórtex, substância cinzenta periaquiductal (PAG: *periaqueductal gray*), vérmis cerebelar e regiões periventriculares do tronco cerebral também são afetadas pela DTP, resultando em alterações neuroquímicas e déficits motores e cognitivos (Anzalone *et al.*, 2010; Savage *et al.*, 2012; Vetreno *et al.*, 2012).

2.1 *Alterações cognitivas induzidas pela deficiência de tiamina*

Dados obtidos em diversos estudos realizados pelo nosso grupo e outros autores, utilizando modelos experimentais, também têm mostrado evidências de que a DT pode ocasionar alterações cognitivas, representadas principalmente por déficit no aprendizado e memória espacial (Irle e Markowitsch, 1983; Langlais *et al.*, 1992; Langlais e Savage, 1995; Zhao *et al.*, 2008; Vigil *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2015) e na extinção de um comportamento (Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006).

2.1.1 *Aprendizado e memória*

Os fenômenos do aprendizado e memória receberam, ao longo do tempo, várias definições. Sweatt (2003) define o aprendizado como alteração de uma resposta comportamental devido a estímulos ambientais, ou seja, é quando há mudança de comportamento diante de uma nova experiência. A memória é definida pelo mesmo autor como um processo de estocagem do que foi aprendido (Sweatt, 2003).

Assim, o aprendizado, que é uma mudança do comportamento, é definido pelas experiências vividas e sem ele não há memória (Marshall, 1988). Após a aquisição, a informação é consolidada, mantida e recuperada, formando assim o processo de memória. A memória por sua vez, pode ser modificada pela reconsolidação e o desempenho alterado pelo processo de extinção (Abel e Lattal, 2001), o qual ocorre através da inibição de um comportamento aprendido, quando a resposta não é mais reforçada (Catania, 1999). Assim a extinção é um processo ativo de aprendizagem e não a perda da mesma (Abel e Lattal, 2001; Santini *et al.*, 2012). Apesar de esses processos terem sido intensivamente estudados no campo teórico, eles só começaram a ser estudados no campo molecular nas últimas décadas (Squire e Knowlton, 1995).

Os diferentes tipos de sistemas de memória vêm sendo classificados baseados em conteúdo, função e tempo de duração. As classificações ocorreram ao longo dos anos, como podemos ver a seguir:

- 1923: *memória explícita e implícita* (McDougall, 1923)
- 1949: *“saber como” e “saber o que”* (Ryle, 1949)

- 1970: memória de curto e de longo prazo (Baddeley e Warrington, 1970)
- 1972: memória semântica e episódica (Tulving, 1972)
- 1978: memória de referência e de trabalho (Honig, 1978)
- 1984: memória disposicional e representacional (Thomas, 1984)
- 1984: memória recente e remota (Schacter e Moscovitch, 1984).

De acordo Smith e Grossman (2008) existem três distintos sistemas de aprendizado e memória bem definidos: memória de trabalho, memória de longo prazo implícita e memória de longo prazo explícita (Smith e Grossman, 2008). A **Figura 1** é um esquema dessa classificação e das principais regiões do SNC relacionadas com esses processos.

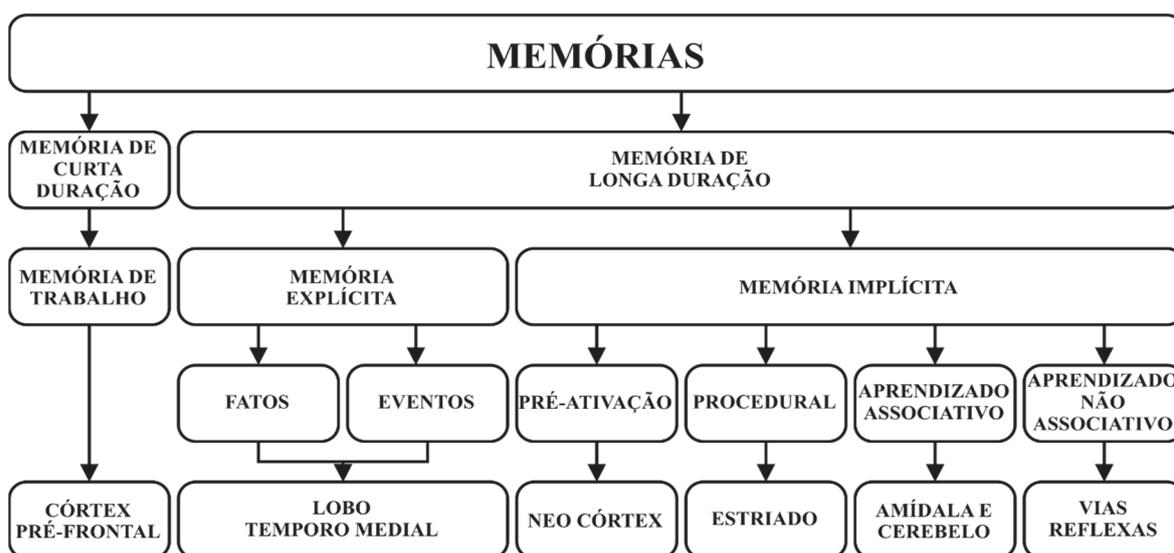


Figura 1 - Classificação dos sistemas de memória e as principais estruturas encefálicas relacionadas aos processos centrais. Figura retirada de Gasic et al., 2006

A memória de trabalho é uma memória de curta duração onde uma quantidade de informação limitada é mantida e manipulada por um intervalo de tempo também limitado (Jonides, 1995). De acordo com Sweatt (2003), esse tipo de memória não requer modificação bioquímica que persiste para que ocorra sua manutenção. A memória de curta duração está relacionada ao CPF (Janowsky et al., 1989), regiões occipital e parietal (Farah, 1988), giros supramarginal e angular (Vallar e Shallice, 2007) e cerebelo (Pascual-Leone et al., 1993).

A memória de longo prazo é considerada um processo de codificação e armazenamento de uma quantidade maior de informações por um longo período de tempo (com duração de

horas a anos) e é dividida em memória explícita ou declarativa e a implícita ou não declarativa (Milner *et al.*, 1998).

A memória de longo prazo explícita, ou memória declarativa, armazena informações por um longo tempo e a aquisição dessas informações ocorre através da evocação da consciência (Smith e Grossman, 2008). Ela está relacionada com o armazenamento de informações aprendidas sobre o mundo – regras, normas e fatos gerais - e sobre eventos dos quais participamos, esses dois tipos de informações subdivide a memória declarativa em dois componentes, o semântico e o episódico, respectivamente (Eisenkraemer, 2006). A partir delas, podemos relatar situações cotidianas e acontecimentos históricos (Lombrosoa, 2004). As estruturas do lobo temporal medial e diencéfalo estão relacionadas com a codificação e recuperação desse tipo de informação (Squire e Knowlton, 1995; Wheeler e Buckner, 2003).

A memória de longo prazo implícita ou não-declarativa também armazena informações por um longo período, porém essas informações são adquiridas e recuperadas de forma inconsciente, como tarefas ou habilidades. Elas são adquiridas de forma que não se sabe descrever como se adquiriu a habilidade (Smith e Grossman, 2008; Izquierdo *et al.*, 2013). Esse tipo de memória pode ser dividido em (a) pré-ativação, relacionada com estruturas do neocórtex, (b) procedural, relacionada ao estriado, (c) aprendizado associativo ou condicionamento, relacionado a amígdala e cerebelo e, (d) aprendizado não-associativo, relacionado a vias reflexas (Smith e Grossman, 2008).

Existem outros tipos de classificação de memória descritos na literatura que não foram contemplados pelos autores acima, como à memória espacial. Esse tipo de aprendizagem e de memória foi objeto de estudo desse trabalho e serão detalhados no próximo tópico.

2.1.1.1 Aprendizado e Memória espacial

A memória espacial está presente na interface de outras memórias, sendo subdividida em memória espacial de trabalho (componente de curta duração) e memória espacial de referência (componente de longa duração) (Morris e Frey, 1997). A memória espacial de trabalho consiste na aquisição de uma quantidade limitada de informação espacial em um curto período de tempo (Moscovitch *et al.*, 2005). Enquanto que a memória espacial de referência ocorre a partir da repetição de uma tarefa, com a aquisição e recuperação de uma

informação espacial a qual é armazenada por um longo período (Olton *et al.*, 1979; Kessels *et al.*, 2001).

Para avaliar o aprendizado e a memória espacial em modelos animais, têm sido utilizados labirintos, onde os animais aprendem uma tarefa dependente do conhecimento espacial (Tolman, 1948; Barnes, 1979; Morris, 1981), dentre esses o Labirinto Aquático de Morris (LAM), alternância espontânea (Langlais e Savage, 1995; Savage *et al.*, 2003; Resende *et al.*, 2012; Savage, 2012), alternância tardia, esquiva ativa e esquiva passiva (Mair *et al.*, 1985) têm sido alvos de estudo utilizando-se o modelo de DTP. Os autores mostraram que animais que passaram pela DTP e avaliados em tarefas de navegação espacial apresentaram déficits cognitivos espaciais (p.ex. aprendizagem / memória) e esses déficits foram persistente.

O LAM foi proposto por Morris em 1981 como instrumento de avaliação do aprendizado e memória espacial em roedores, utilizando um reforço positivo (plataforma) e um estímulo aversivo (água). Nas tarefas de aprendizado espacial de referência, o animal tem que localizar uma plataforma submersa a água utilizando dicas viso-espaciais, extra-labirinto e fixas, presentes na sala onde ocorre o teste. Durante o teste de memória espacial de referência, a plataforma é retirada e o comportamento do animal em tentar encontrar a plataforma, no local onde se encontrava previamente (durante a fase do aprendizado) é avaliado. A partir das dicas espaciais ocorre a formação de um mapa cognitivo espacial (Morris, 1981). Evidências sobre o papel do hipocampo e do córtex entorrinal na formação desse mapa espacial ocorreram pelas descobertas da existência de células piramidais do hipocampo de ratos, denominadas de “*place cells*” as quais disparam dependendo da localização do animal (O'keefe e Dostrovsky, 1971) e pela existência de células do córtex entorrinal que também disparam em locais específicos chamadas de “*grid cells*” (Hafting *et al.*, 2005).

Devido as suas vantagens, como a não necessidade de privação alimentar, nem de apresentação de choques elétricos (Gimenes Júnior, 2008) e devido a ser um instrumento sensível a mudanças cognitivas espaciais, o LAM é um instrumento utilizado em diversas subáreas de estudos de aspectos cognitivos (D'hooge e De Deyn, 2001).

2.1.2 Evidências do efeito da DT sobre aspectos cognitivos

Utilizando o LAM como tarefa comportamental para avaliar o efeito da DT sobre aprendizado e memória espacial, Langlais e cols. (1992) mostraram que ratos DTP apresentaram baixo desempenho para encontrar a plataforma e que animais que aprenderam a tarefa antes do episódio de DTP não tiveram prejuízo durante o teste de memória remota (avaliação da presença de amnésia retrógrada, que é a perda de informações adquiridas antes de estabelecido o quadro de DTP). Déficits durante as sessões de aprendizagem também foram observados pelo nosso grupo, onde os animais DTP tiveram um pior desempenho comparado com animais controle, entre a 2ª e a 4ª sessões (Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Vigil *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2015), porém com a repetição das tentativas, durante o treino, todos os animais DT foram capazes de aprender a tarefa. Pires e cols. (2005) e Carvalho e cols. (2006) também verificaram um efeito da DTP sobre a extinção de um comportamento, enquanto que Oliveira-Silva e cols. (2015) verificaram efeito da DT na dieta sobre a memória espacial.

O desempenho dos animais no LAM pode ser influenciado por características dos animais, como sexo, espécie/raça, idade, estado nutricional, exposição ao estresse ou infecção, e pelo protocolo utilizado. Uso de animais com lesões em regiões cerebrais ou a desconexão entre elas podem alterar o desempenho durante a aprendizagem espacial (D'hooge e De Deyn, 2001).

A formação hipocampal é uma estrutura do lobo temporal medial que consiste de quatro subregiões (córtex entorrinal, giro denteado, Cornuamonnis1 e 3 (CA1 e CA3 e subículo) ligadas unidirecionalmente (Amaral *et al.*, 2007). É uma área relacionada a tarefas de aprendizagem/ memória (Squire, 1992; Abrous *et al.*, 2005), sendo importante na consolidação da memória explícita ou declarativa (Eichenbaum, 2004; Dickerson e Eichenbaum, 2010), como por exemplo, possui um relevante papel na memória espacial (O'keefe e Nadel, 1978). Evidências sugerem que a DT causa alterações morfológicas (Pfefferbaum *et al.*, 2007), na neurogênese (Zhao *et al.*, 2008; Vetreno *et al.*, 2011) e em parâmetros neuroquímicos (Pires *et al.*, 2005; Savage *et al.*, 2007; Savage *et al.*, 2012) no hipocampo de animais deficientes de tiamina, contribuindo para o prejuízo nos processos de aquisição e na memória (Savage *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2005; Savage *et al.*, 2012).

Não somente o hipocampo, mas também o CPF é uma região cerebral crítica para a memória espacial (Martinet *et al.*, 2011). Estudos em humanos e primatas não humanos com lesões no CPF demonstram que essa região afeta a memória de trabalho (Fuster, 1989) e a flexibilidade comportamental (Milner *et al.*, 1984). Lesões no CPF de ratos também foram responsáveis pela piora na recuperação e ordenamento temporal de memórias (Winocur e Moscovitch, 1999). Estudos realizados pelo nosso grupo e outros, utilizando o modelo DTP, sugerem que alterações neocorticais (colinérgica e glutamatérgica) parecem estar associadas com o declínio cognitivo (Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006).

Além dessas regiões, o tálamo (região alvo do presente trabalho) também tem um papel importante em funções cognitivas, como aprendizado e memória. Os tálamos são estruturas diencefálicas, constituídas por substância cinzenta de forma ovóide e são unidas pela aderência intertalâmica, que passa pelo III ventrículo. Se relaciona com a cápsula interna lateralmente, com a fissura cerebral transversa, superiormente, e com o hipotálamo e o subtálamo, através da sua parte inferior. São estruturas organizadas por muitos pares diferentes de núcleos (**Figura 2, painéis A e B**) (Pinel *et al.*, 2005; Schünke *et al.*, 2007), os quais são divididos anatomicamente em grupos: lateral, anterior, mediano, intralaminar e núcleo reticular (Engelborghs *et al.*, 1998). Esses núcleos possuem conexões com o hipocampo, corpos mamilares e neocórtex (Aggleton e Brown, 1999) (**Figura 3**). Também desempenham funções sensitivas e funções relacionadas à aspectos emocionais, de motricidade e de ativação cortical (Cruikshank *et al.*, 2012; Bosch-Bouju *et al.*, 2013; Mazzola *et al.*, 2013).

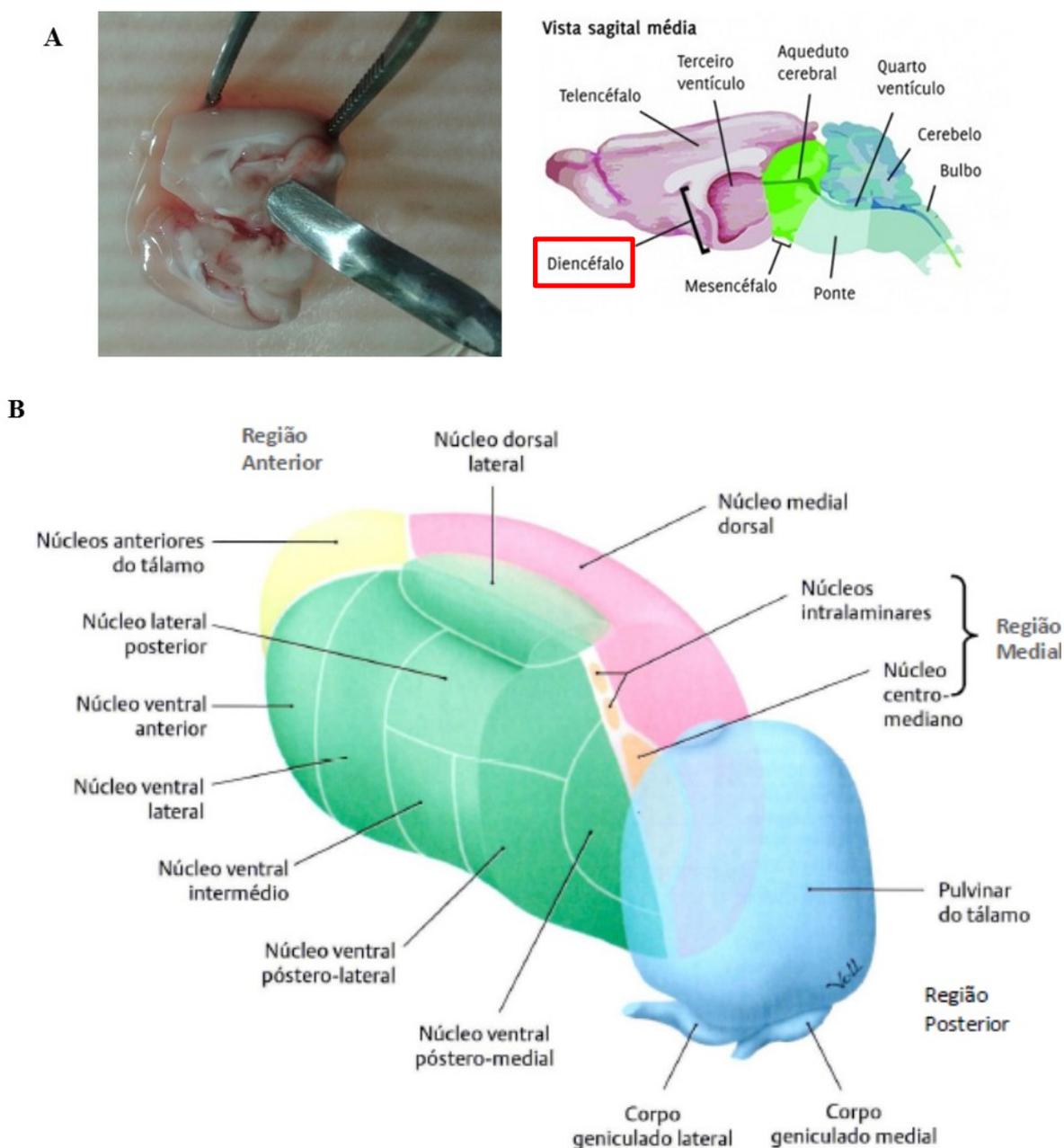


Figura 2 - Representação do Tálamo. Painel A: À esquerda, fotografia do tecido cerebral de rato em vista sagital média e esquema de um encéfalo à direita, destacando na foto o tálamo (ponta do instrumento) e no esquema a região diencefálica (vermelho). Painel B: representação esquemática da disposição espacial dos grupos nucleares do tálamo. Fonte. Schünke *et al.*, 2007.

Estudos mostram que danos em núcleos talâmicos são considerados preditores de perda de memória (Aggleton *et al.*, 2011) e lesões talâmicas lateral e anterior prejudicam sistemas de memória independentes (Mitchell e Dalrymple-Alford, 2006). Um desses estudos, verificou que humanos com lesões talâmicas apresentavam prejuízo na memória declarativa (Van Der Werf *et al.*, 2003). Dados obtidos em estudos com indivíduos com SW evidenciaram uma perda neuronal no núcleo anterior talâmico maior em paciente que apresentavam amnésia (SWK), quando comparados com aqueles não amnésicos (Harding *et*

al., 2000). Utilizando exames por imagem de pacientes com DT, Butterworth (2003) mostrou que algumas estruturas encefálicas como tálamo, corpos mamilares, região periventricular e cerebelo são mais susceptíveis e possuem seletividade à deficiência (Butterworth, 2003).

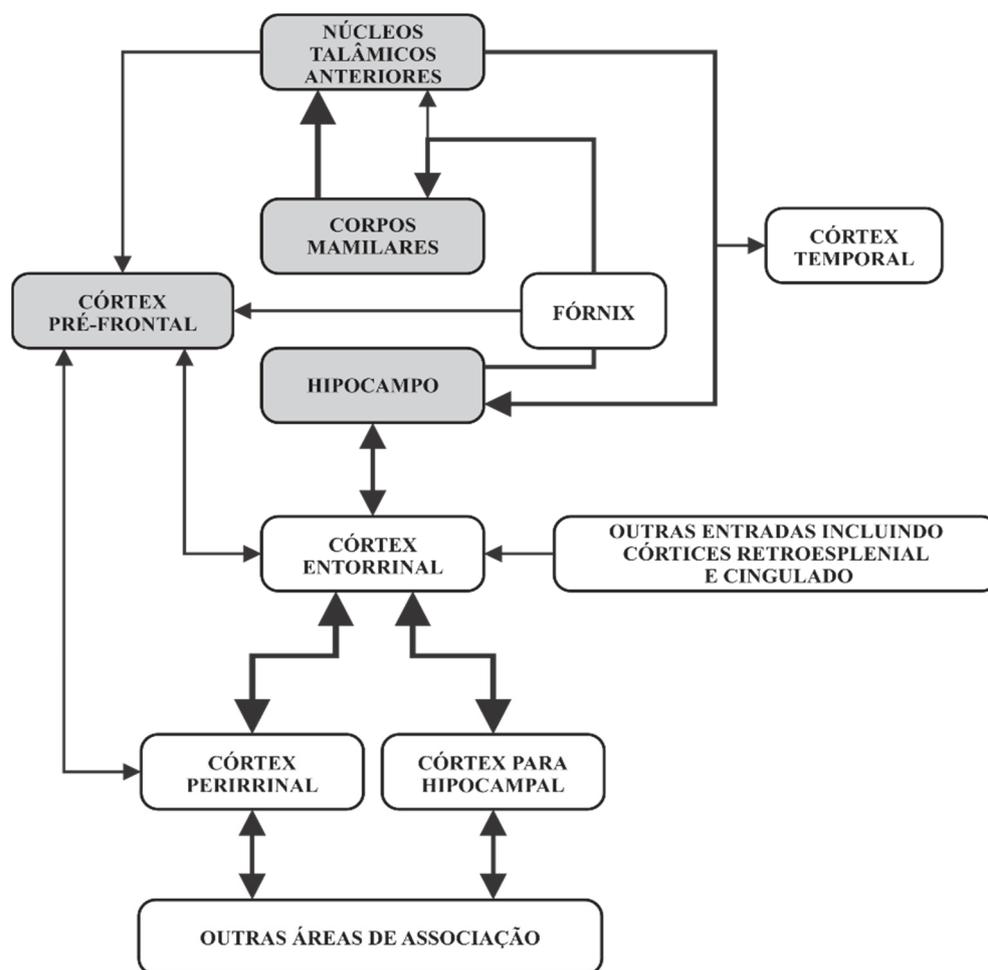


Figura 3 - Esquema das principais vias que permitem a codificação da informação episódica e fundamentam os aspectos subjacentes da recordação. A espessura relativa das linhas indica a importância putativa das diferentes ligações. Destacamos em cinza as regiões mais suscetíveis aos efeitos da deficiência de tiamina. Fonte: Adaptado de Aggleton e Brown, 1999

Estudos prévios usando modelo experimental de DT também mostraram que o tálamo juntamente com os corpos mamilares, é a área mais afetada pela DT, sendo considerada uma das primeiras regiões a apresentar sinais de neurodegeneração. As alterações nos núcleos talâmicos são observadas juntamente com alterações nos níveis de neurotransmissores e déficits cognitivos (Mair *et al.*, 1991; Langlais *et al.*, 1992; Mair, 1994). A perda da conexão entre tálamo, hipocampo e CPF, devido à lesões talâmicas, podem ser responsáveis pelas alterações comportamentais vistas em animais que passaram pela DT. Savage e cols. (2011) revelaram que lesões no núcleo anterior talâmico prejudicaram as funções hipocámpais incluindo aprendizado e memória espacial e também afetam a liberação de acetilcolina hipocámpal.

2.2 Alterações neuroquímicas induzidas pela deficiência de tiamina

A **Tabela 1** mostra os circuitos de neurotransmissores alterados em regiões cerebrais de animais que passaram pela DT. De acordo com a literatura, nós distinguimos as regiões onde as alterações ocorreram, se essas alterações foram para mais (↑) ou para menos (↓), e qual o modelo (protocolo) de DT utilizado no estudo: DTP, DT (dieta) associada ou não ao tratamento crônico com etanol e Restrição Maternal de B1.

Tabela 1 – Circuitos neuroquímicos afetados pela DT

<i>Circuitos</i>	<i>Região SNC</i>	↑↓	<i>Referência</i>	<i>Modelo</i>
GLUTAMATÉRGICO	Tálamo	↓	Langlais <i>et al.</i> 1988	DTP
		↓	Héroux e Butterworth, 1988	DTP
		↑	Langlais e Zang, 1993	DTP
		↑	Hazell <i>et al.</i> , 1993	DTP
		↓	de Freitas-Silva, 2010	DT maternal
	Hipocampo	↑	Langlais e Zang, 1993	DTP
		↓	Lê <i>et al.</i> , 1991	DTP
		↓	de Freitas-Silva, 2010	DT maternal
	Córtex Pré-Frontal	↓	Carvalho <i>et al.</i> , 2006	DTP / DT (dieta) + Etanol
		↓	de Freitas-Silva, 2010	DT maternal
	Cerebelo	↓	Ferreira-Vieira <i>et al.</i> , 2016	DT maternal
	Cérebro total	↓	Butterworth <i>et al.</i> , 1979	DTP
		↓	Butterworth, 1989	DTP
GABAérgico	Tálamo	↓	Langlais <i>et al.</i> 1988	DTP
		↓	Héroux and Butterworth 1988	DTP
		↓	de Freitas-Silva, 2010	DT maternal
	Cérebro total	↑	Ferreira-Vieira <i>et al.</i> , 2016	DT maternal
		↓	Butterworth <i>et al.</i> , 1979	DTP
		↓	Butterworth, 1989	DTP
Hemisfério cerebral	↑	Page <i>et al.</i> , 1989	DT (dieta)	
COLINÉRGICOS	Tálamo	↓	Nakagawasai <i>et al.</i> , 2000	DTP
	Hipocampo	↓	Nakagawasai <i>et al.</i> , 2000	DTP
		↓	Pires <i>et al.</i> 2001	DTP / DT (dieta) + Etanol
		↓	Vetreno <i>et al.</i> , 2008	DTP
		↓	Oliveira-Silva <i>et al.</i> , 2015	DT (dieta) + Etanol
	Córtex	↓	Nakagawasai <i>et al.</i> , 2000	DTP
		↓	Pires <i>et al.</i> 2001	DTP / DT (dieta) + Etanol
		↓	Pires <i>et al.</i> 2005	DTP / DT (dieta) + Etanol
	Córtex Pré-Frontal	↓	Anzalone <i>et al.</i> , 2010	DTP
córtex retroespinhal	↓	Anzalone <i>et al.</i> , 2010	DTP	

DOPAMINÉRGICO	Tálamo	↓	Mousseau <i>et al.</i> , 1996	DT (dieta)
	Córtex Pré-Frontal	↓	Mousseau <i>et al.</i> , 1996	DT (dieta)
	Hipotálamo	↓	Mousseau <i>et al.</i> , 1996	DT (dieta)
NORADRENÉRGICO	Tálamo	↓	Mousseau <i>et al.</i> , 1996	DT (dieta)
	Córtex Pré-Frontal	↓	Mousseau <i>et al.</i> , 1996	DT (dieta)
	Hipotálamo	↓	Mousseau <i>et al.</i> , 1996	DT (dieta)
	cortex-hippocampus	↓	Mair <i>et al.</i> , 1994	DT (dieta)
SEROTONINÉRGICO	Tálamo	↑	Langlais <i>et al.</i> 1988	DTP
	Córtex Pré-Frontal	↓	Mousseau <i>et al.</i> , 1996	DTP
	Hipocampo	↑	Vigil <i>et al.</i> , 2005	DTP
	Hipotálamo	↓	Mousseau <i>et al.</i> , 1996	DTP

2.2.1 Alterações nos circuitos glutamatérgicos e GABAérgicos pela DT

Dos vários circuitos de neurotransmissores afetados pela DT, os circuitos envolvendo os neurotransmissores glutamato e ácido gama-amino-butiílico (GABA: *γ-aminobutyric acid*) foram escolhidos como focos do presente estudo. Isto por se tratar de circuitos modulatórios conforme detalhado abaixo e, principalmente, pelos resultados obtidos pelo nosso grupo (Sena, 2015) de que o GABA parece ter um papel importante no processo de aquisição de uma informação espacial.

O glutamato e o GABA são neurotransmissores excitatório e inibitório, respectivamente. O balanço entre eles está envolvido na neurogênese, plasticidade neuronal e migração celular (Mcgee e Brecht, 2003; Nacher *et al.*, 2003; Foster e Kemp, 2006). A manutenção desse equilíbrio é fundamental para funções cognitivas, como aprendizado e memória (Foster e Kemp, 2006).

Esse balanço parece ser alterado pela DT. Estudos sugerem que a baixa atividade de α -cetoglutarato desidrogenase, enzima dependente de TDP, pode causar uma baixa produção de glutamato por essa via e, conseqüentemente, uma baixa conversão de glutamato para GABA (Gaitonde *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1984).

Redução de níveis de GABA e glutamato em regiões específicas do cérebro foram observados em animais que passaram pela DTP. A diminuição dos níveis desses neurotransmissores no tálamo foi observada logo após a um episódio de DT e essa alteração

parece persistir por mais tempo, já que foi observada até 9 semanas após recuperação da deficiência (Héroux e Butterworth, 1988; Langlais *et al.*, 1988).

Carvalho e cols. (2006) observaram uma diminuição da captação de glutamato no CPF de animais com DTP. Nosso grupo verificou diminuição nos níveis dos dois neurotransmissores, glutamato e GABA, no CPF, porém, um aumento nos níveis de GABA na PAG de ratos que passaram por um episódio de DTP. Além disso, foram observadas a existência de correlações significativas entre os níveis desses neurotransmissores e o desempenho dos animais no LAM (Andrade, 2011).

Por outro lado, dependendo do tipo de insulto e do estágio do processo, o glutamato pode desempenhar um papel no desenvolvimento de lesões causadas pela DT (Nardone *et al.*, 2013). A elevação dos níveis de glutamato extracelular foi observada em regiões vulneráveis à DT e, a excitotoxicidade foi o primeiro mecanismo de morte celular descrito no modelo de DTP, associado com uma amnésia diencefália (Hazell *et al.*, 1993; Langlais e Zhang, 1993). Esse aumento nos níveis de glutamato também poderia ser explicado pela perda de receptores glutamatérgicos em astrócitos (Hazell *et al.*, 2001; Hazell *et al.*, 2003).

2.2.2 Alterações em outros circuitos de neurotransmissores e suas relações com alterações comportamentais

Conforme apresentado na **Tabela 1**, outros tipos de neurotransmissores também foram afetados pela DT e essas alterações foram relacionadas com alterações cognitivas.

Nosso grupo de pesquisa verificou a existência de correlação entre déficits cognitivos e parâmetros neuroquímicos. Pires e cols. (2005) verificaram uma diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de animais que passaram por um tratamento crônico com etanol (E) e no hipocampo e neocórtex de animais que passaram pela DTP. Além disto, foi observado uma diminuição na liberação de acetilcolina (ACh) neocortical nesses dois grupos (E e DTP). Essas alterações no sistema colinérgico se correlacionam de forma significativa com déficits cognitivos espaciais. Oliveira-Silva e cols. (2015) também observaram efeito da DT na dieta, associada ou não ao etanol, sobre a atividade da AChE no hipocampo e, essa alteração foi observada estar relacionada de forma significativa com o déficit de memória espacial.

Ao avaliar animais que passaram também pela DTP e tiveram prejuízo durante o aprendizado espacial, Vigil e cols. (2010) observaram um aumento no nível do metabólito de serotonina (ácido 5-hidroxiindolacético – 5-HIAA) no tálamo, o qual foi significativamente relacionado com a latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma na 3ª sessão do treino, na tarefa do LAM. A 3ª sessão foi aquela em que os animais DTP apresentaram pior desempenho.

2.2.3 Outras alterações bioquímicas induzidas pela deficiência de tiamina

Além das alterações causadas pela DT sobre os níveis de neurotransmissores e/ou enzimas diretamente associadas à síntese ou degradação de um neurotransmissor, como no caso da AChE, em alguns estudos os pesquisadores também investigaram alterações proteicas / enzimáticas em regiões do SNC de animais submetido à DT.

Em indivíduos alcoolistas, Lavoie e Butterworth (1995) verificaram uma redução na atividade da transcetolase e do complexo piruvato desidrogenase, quando comparados com indivíduos controle. Butterworth e cols. (1993) também verificaram que essas enzimas juntamente com o complexo α -cetoglutarato desidrogenase foram significativamente diminuídas em autópsia de cérebro em condições de baixo nível de tiamina. Outros estudos utilizando modelos animais de DTP, também verificaram efeitos da DT sobre a atividade dessas enzimas dependentes de tiamina (Gibson *et al.*, 1984; Butterworth *et al.*, 1986; Sheu *et al.*, 1998).

Considerando o relevante papel das proteínas em todos os processos bioquímicos celulares, e conhecendo os efeitos da DT em alguns desses processos, como a neurotransmissão química, decidimos explorar os efeitos da DT, primeiro em uma classe específica de proteínas, as fosfoproteínas (Pires *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2012). Pires e cols. (2007) mostraram 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, depois identificada como sendo a Sinapsina I. Posteriormente, Resende e cols. (2012) usando modelo da DTP também observaram efeito da DT sobre a sinapsina I, fosfoproteína importante no processo de excitose. Seguindo essa linha, ampliamos o campo de avaliação das proteínas potencialmente afetadas pela DT, usando uma associação entre a técnica de separação por eletroforese, seguida por análise em

espectrômetro de massa (Bueno *et al.*, 2015). Bueno e cols. (2015) mostraram que a DT causa alterações em proteínas do tálamo e algumas dessas alterações se relacionam com o desempenho dos animais em tarefas cognitivas espaciais. Uma das proteínas identificadas, alterada pela DT foi um canal aniônico dependente de voltagem ou VDAC.

3 Neuroproteômica

O estudo das alterações no nível de proteínas no SNC ocorre atualmente contando com os avanços de uma importante área do conhecimento e instrumento de pesquisa, denominada neuroproteômica, uma subárea da proteômica que tem como objetivos identificar, quantificar e caracterizar proteínas presentes no SNC, investigar doenças neurodegenerativas e procurar possíveis marcadores para o tratamento dessas doenças (Hirano *et al.*, 2006).

Por sua vez, a proteômica é uma área do conhecimento que tem como objetivo analisar o proteoma, termo análogo ao genoma, que consiste do conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo, em um determinado momento e estado (Wilkins, 1997). Diferente do genoma, o proteoma se altera em diferentes condições. Técnicas proteômicas têm sido desenvolvidas para determinar a atividade bioquímica, estrutura, interações, localização e papel celular de proteínas (Ong e Mann, 2005).

Atualmente, a partir do uso de tecnologias de alto desempenho (do inglês, *high throughput*), a proteômica tem possibilitado a detecção e quantificação de proteínas em grande escala e com maior cobertura (Kumar *et al.*, 2016). O avanço dessas análises de alto desempenho tem sido facilitado pelo desenvolvimento da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS), uma técnica que permite a análise direta de misturas complexas de proteínas após proteólise e separação dos peptídeos mediante Cromatografia Líquida (LC) para posterior injeção no espectrômetro de massas (MS: *Mass Spectrometry*) (Wu e Maccoss, 2002) (**Figura 4**).

A LC e nano LC tem sido acopladas à espectrometria de massas sequencial (MS/MS) uma vez que permitem a separação tanto de proteínas quanto de peptídeos, podendo ser utilizados diferentes métodos cromatográficos, individualmente ou em combinação, como fase reversa, troca iônica, exclusão molecular e afinidade entre outros (Shi *et al.*, 2004).

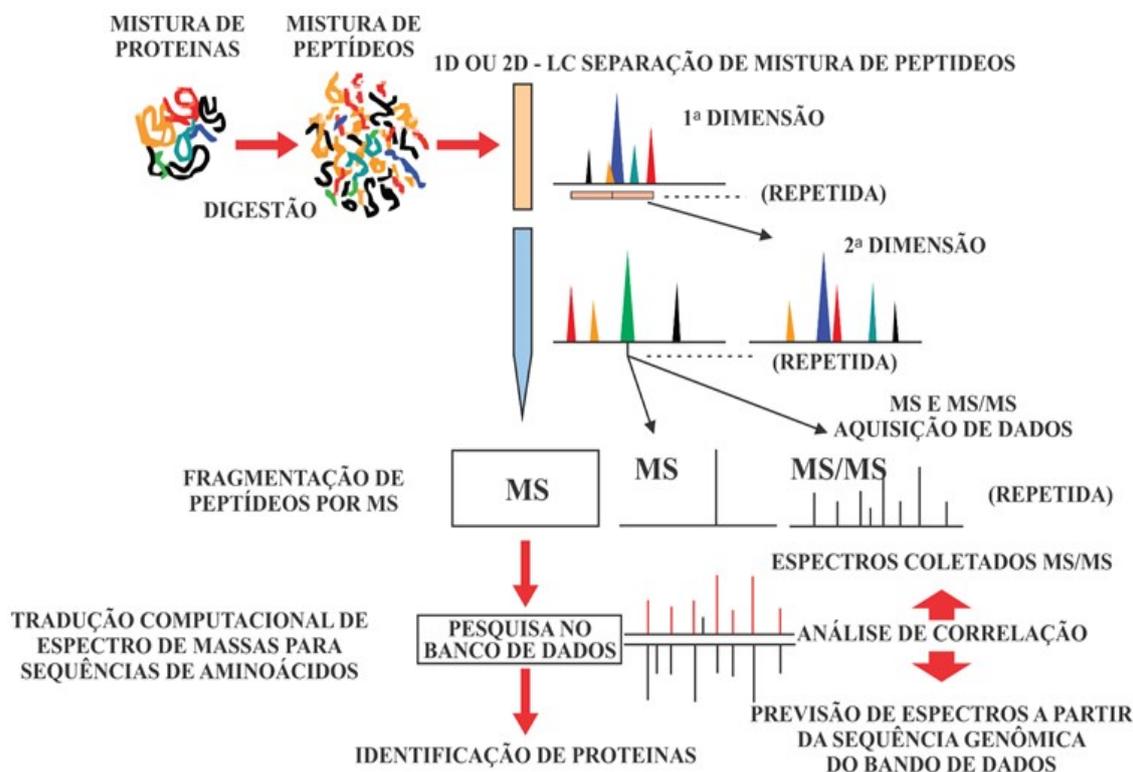


Figura 4 - Esquema das etapas do processo de análise por LC-MS/MS: Identificação de proteínas.
 Fonte: Adaptado de Motoyama e Yates, 2008

Como princípio básico, a espectrometria de massas gera íons a partir de compostos orgânicos e inorgânicos em função da sua massa/carga (m/z) e detecta os mesmos, quantitativa ou qualitativamente, considerando sua abundância relativa e respectiva m/z (Murray *et al.*, 2013).

No caso das análises proteômicas os peptídeos provenientes da LC são ionizados na fonte de ionização e, posteriormente, detectados e fragmentados no Espectrômetro de Massas para obtenção de espectros MS/MS que são comparados com espectros teóricos das sequências de proteínas, provenientes de bancos de dados, para a identificação dos peptídeos (Motoyama e Yates Iii, 2008) (**Figura 4**).

O espectrômetro de massas consiste de uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector, os quais operam em condições de vácuo (**Figura 5**). Os analitos separados no cromatógrafo, como os líquidos de alta performance (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*) ou os líquidos de ultra performance (UPLC: *Ultra Performance Liquid Chromatography*), são inseridos no espectrômetro de massas através de uma Fonte de Ionização como a Ionização por Eletrospray (ESI: *Electrospray Ionization*), onde ocorre a ionização dos analitos em fase líquida passando para a fase gasosa (Bayés e Grant, 2009).

Outro tipo de fonte de ionização é a Dessorção/ionização de Matriz Assistida por Laser (MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), na qual ocorre a geração de íons em fase gasosa por dessorção /ionização de uma matriz cristalina formada de pequenas moléculas voláteis (Yates *et al.*, 2009). Após a ionização, os íons são analisados em analisadores de massas.



Figura 5 - Esquema da sequência dos processos em uma análise por *Espectrometria de Massas*. A fonte de inserção da amostra pode ser acoplada à fonte de ionização.

A espectrometria de massas de alto desempenho tem sido revolucionada com o desenvolvimento de espectrômetros de massas híbridos, que combinam as capacidades dos analisadores de massas mais utilizados na análise proteômica, como o quadrupolo (Q), armadilha de íons, tempo de voo (TOF: *Time of Flight*), ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FTICR: *Fourier-transform ion cyclotron resonance*), Orbitrap (Yates *et al.*, 2009) e mobilidade iônica pelo T-Wave (Gray *et al.*, 2016).

Assim, a espectrometria de massas é considerada uma análise qualitativa, pois é utilizada para identificação da composição elementar de compostos, bem como sua elucidação estrutural. Além disto, mediante a LC-MS é possível também extrair informações quantitativas sobre mudanças na abundância das proteínas (Ackermann *et al.*, 2008).

A proteômica quantitativa é dividida em duas abordagens: quantificação com marcação química de peptídeos (*label*) e quantificação livre de marcação (*label free*) (Silva *et al.*, 2006; Neilson *et al.*, 2011).

Entre as técnicas que envolvem a marcação química, as mais utilizadas são Quantificação isobárica para quantificação absoluta e relativa (iTRAQ: *isobaric tags for relative and absolute quantitation*), Marcação isotópica e separação por afinidade (ICAT: *Isotope-coded affinity tag*) e Marcação isotópica em aminoácidos em cultura de células (SILAC: *stable isotope labels with amino acids in cell culture*). Essas técnicas são consideradas precisas e mais acuradas em relação à quantificação relativa da abundância de

proteínas, porém seu uso é limitado em relação à quantidade de amostras e ao tipo de amostras usadas, além de ser necessário um custo e tempo elevados para marcação da amostra (Kuhner e Gavin, 2007).

Por outro lado, a abordagem livre de marcação, envolve a medição das áreas dos picos (AUC: *area under the curve*) cromatográficos de cada peptídeo e a existência de uma relação linear entre essa área e a concentração da proteína na amostra (Chelius e Bondarenko, 2002). A quantificação baseada na AUC envolve a determinação das abundâncias de íons em um tempo de retenção específico para os peptídeos ionizados (Podwojski *et al.*, 2010). Este tipo de quantificação representa uma alternativa de baixo custo e sem limite de número de comparações de amostra, resultando em ampla cobertura do proteoma (Bantscheff *et al.*, 2007).

Para obter uma identificação e quantificação precisa de proteínas é necessário um equilíbrio na energia de colisão para gerar íons fragmentados. A fragmentação ocorre a partir de dois tipos de estratégias de aquisição: dependente de dados (DDA: *data-dependent acquisition*) e independente de dados (DIA: *data-independent acquisition*) (Distler *et al.*, 2014; Distler *et al.*, 2016).

Na DDA tem como finalidade submeter os íons precursores à fragmentação sequencial (MS/MS) seletiva de acordo com a sua abundância. Por outro lado, métodos de fragmentação e identificação por DIA, como o utilizado no presente trabalho, ocorre a partir da alternância entre baixa e alta energia de colisão no espectrômetro de massas, onde todos os peptídeos são fragmentados, sem a necessidade de selecionar íons precursores. Esse tipo de fragmentação é independente de características específicas, tais como intensidade e estado de carga (Silva *et al.*, 2006; Chapman *et al.*, 2014).

A análise por DIA é denominada como MS^E (MS de alta energia), a qual juntamente com a abordagem livre de marcação fornece informações quantitativas das análises da abundância relativa de proteínas. Essa análise ocorre a partir da média da intensidade dos três peptídeos trípticos mais abundantes por proteína (técnica *Hi 3*), sendo que a abundância é diretamente proporcional à quantidade da proteína na amostra analisada (Silva *et al.*, 2006; Distler *et al.*, 2016).

A caracterização proteômica utilizando LC-MS/MS com fragmentação do tipo DIA e quantificação livre de marcação é possível a partir do uso de espectrômetros de massas como o Synapt G2-S HDMS (*High Definition Mass Spectrometry*) (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a um sistema nano UPLC (Waters, Milford, MA, USA). Esse equipamento foi utilizado no presente trabalho, conforme mencionado em Material e Métodos.

Avanços tecnológicos consideráveis têm sido feitos em novos métodos de instrumentação, estratégias experimentais e as ferramentas da bioinformática para a análise do proteoma (De Hoog e Mann, 2004). As ferramentas de bioinformática podem ser usadas a partir de programas específicos que permitem investigar sobre anotações funcionais, interações proteína-proteína, associação com doenças, vias biológicas, homologias, função gênica, entre outras categorias (Huang *et al.*, 2009).

Um dos dados de bases, ferramenta da bioinformática, denominado *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)* consiste no conhecimento biológico integrado em ferramentas analíticas com o objetivo de extrair informações biológicas de listas de genes e proteínas. Esse recurso foi utilizado no presente trabalho, conforme mencionado em Material e Métodos. A partir de informações proteicas em bancos de dados, o *DAVID* utiliza bancos internos como *Gene Ontology (GO)* e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG)* para categorizar as proteínas em anotações funcionais e vias metabólicas e de regulação, respectivamente (Huang *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009).

A LC-MS/MS em estudos neuroproteômicos fornece uma essencial fonte de biomarcadores para estudos clínicos, com o propósito tanto para diagnóstico quanto para prognóstico (Bayés e Grant, 2009; Shevchenko *et al.*, 2015).

Uma visão geral de estudos neuroproteômicos em modelos experimentais (ratos e camundongos) recentemente publicados, utilizando LC-MS/MS, podendo diferir quanto ao tipo de fragmentação – DDA e DIA e do tipo de abordagem, como por exemplo com marcação (iTRAQ, SILAC, ICAT) ou sem marcação (*label free*), estão listados na **Tabela 2**, onde contém informações das amostras de tecidos de regiões do SNC em que a análise proteômica foi realizada, o tipo de pesquisa e a quantidade de proteínas identificadas em cada análise.

Tabela 2 - Recentes estudos neuroproteômicos em modelos experimentais utilizando a técnica LC-MS/MS

<i>Regiões SNC</i>	<i>Pesquisa</i>	<i>Referência</i>	<i>Método</i>	<i>Proteínas identificadas</i>
Cerebelo	Análise proteômica de modelo animal de depressão maior	Shao <i>et al.</i> , 2015	LC-MS/MS - DDA - iTRAQ	1815
Cérebro total	Análise de proteínas de membrana e hidrofílicas de cérebro de camundongos	Wetterhall <i>et al.</i> , 2011	LC-MS/MS - DDA - iTRAQ	1825
	Caracterização proteômica do cérebro de camundongos em modelo de doença de Alzheimer	Shevchenko <i>et al.</i> , 2012a	LC-MS/MS - DDA - <i>label free</i>	599
	Comparação de métodos de extração para análise proteômica de cérebro de camundongo	Shevchenko <i>et al.</i> , 2012b	LC-MS/MS - DDA - <i>label free</i>	541
	Análise proteômica da mitocôndria de cérebro de camundongos durante o envelhecimento	Stauch <i>et al.</i> , 2015	LC-MS/MS - DDA - SILAC	549
	Estriado	Análise proteômica da densidade pós-sináptica estriatal pós tratamento com morfina	Stockton <i>et al.</i> , 2015	LC-MS/MS - DDA - iTRAQ
Hemisfério cerebral	Neuroproteômica em modelo animal de isquemia cerebral	Datta <i>et al.</i> , 2011	LC-MS/MS - DDA - iTRAQ	2242
	Neuroproteômica de cérebro de ratos com acidente vascular cerebral isquêmico intracerebelar	Ren <i>et al.</i> , 2014	LC-MS/MS - DDA - <i>label free</i>	590
Hipocampo	Perfil proteômico da densidade pós-sináptica do hipocampo de camundongo	Distler <i>et al.</i> , 2014	LC-MS/MS - DIA - <i>label free</i>	4558
	Proteoma hipocampal de ratos em tratamento crônico com fenciclidina (modelo de esquizofrenia)	Wesseling <i>et al.</i> , 2015	LC-MS/MS - DIA - <i>label free</i>	937
	Efeito da radiação e do medo contextual condicionado no proteoma hipocampal	Huang <i>et al.</i> , 2016	LC-MS/MS - DIA - <i>label free</i>	400
	Alteração proteômica no hipocampo de ratos expostos ao álcool (subunidade GluN2B)	Swartzwelder <i>et al.</i> , 2016	LC-MS/MS - DDA - <i>label free</i>	693

Hipótese: A deficiência de tiamina altera os níveis de proteínas e também as concentrações de GABA e glutamato no tálamo, sendo que essas alterações se relacionam com déficits cognitivos espaciais.

O nosso grupo de pesquisa, do Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LaNeC) da Universidade Federal de Minas Gerais, têm investigado os mecanismos moleculares que participam como componentes dos substratos neurobiológicos de aspectos comportamentais, como por exemplo, os processos de aprendizagem e memória espacial.

A utilização de modelos animais, roedores, com neurodegeneração representa um instrumento de pesquisa bastante interessante e útil para se contribuir no entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de neurodegeneração e também no esclarecimento sobre as bases neurobiológicas de aspectos do comportamento. Dentre esses modelos de neurodegeneração, a DT em roedores é extremamente vantajosa, pois, ao se conhecer a causa primária que induz o processo de morte neuronal, o pesquisador tem maiores condições de controlar a variável independente que é a base do modelo. Esse modelo está bem estabelecido na literatura, o que também é uma vantagem e, apesar da variabilidade individual em termos de susceptibilidade à deficiência, seu estabelecimento apresenta alta reprodutibilidade. A escolha do tálamo como região cerebral a ser analisada no presente estudo, se deve à dois fatos principais, estabelecidos na literatura: (i) é uma das áreas mais afetadas, nos níveis bioquímico e morfológico, pela DT (Langlais e Savage, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Savage *et al.*, 2012) e (ii) tem papel em processos cognitivos espaciais (Aggleton e Brown, 1999; Aggleton *et al.*, 2011).

O presente trabalho representa a continuação de uma série de estudos que vem sendo realizados pelo nosso grupo, nos quais mostramos evidências de que a DT causa disfunções cognitivas, que estão associadas com alterações em componentes moleculares envolvidos com a neurotransmissão química e a atividade de circuitos neuroquímicos (Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Pires *et al.*, 2007; De Freitas-Silva *et al.*, 2010; Vigil *et al.*, 2010; Oliveira-Silva *et al.*, 2015). Entre essas alterações destacamos a regulação de fosfoproteínas (Pires *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2012) e a expressão de proteínas no tálamo (Bueno *et al.*, 2015) ambas relacionadas ao desempenho cognitivo dos animais.

A caracterização dos componentes moleculares expressos no SNC é importante para entender os mecanismos de maior complexidade envolvidos na regulação e funcionalidade do cérebro (Katagiri *et al.*, 2010). Trabalhos que possibilitem ampliar os conhecimentos

acerca das disfunções cerebrais causadas pela DT adquirem relevância à medida que podem contribuir para o entendimento de questões a respeito da participação de proteínas nos mecanismos responsáveis por lesões cerebrais associadas com alterações cognitivas. Além disto, podem ajudar a desvendar as bases moleculares de disfunções na neurotransmissão e na atividade de circuitos neuroquímicos, previamente descritos como sendo alvos dos efeitos da DT e de outros processos neurodegenerativos.

A identificação e quantificação da abundância relativa das proteínas que sofrem alterações como consequência da DT podem contribuir para orientar, de forma mais lógica, futuros estudos, nos quais se objetiva esclarecer mecanismos de um processo tão complexo, como a neurodegeneração. Como consequência, a partir de estudos como este, pode-se também esclarecer outros possíveis papéis fisiológicos da tiamina e/ou seus derivados fosforilados, além da função como coenzimas de reações metabólicas. Até o presente momento não temos conhecimento de nenhum estudo visando uma análise proteômica de amostras do tálamo de animais DT, com vistas a identificar componentes que possam desempenhar papel funcional no processo de neurodegeneração e/ou déficits cognitivos causados pela deficiência de B1.

1 Geral

Estudar os efeitos de um episódio grave de DT sobre o proteoma do tálamo e as relações com níveis de neurotransmissores e desempenho cognitivo de ratos *Wistar*.

2 Específicos

2.1 Avaliar, em ratos adultos, machos Wistar, os efeitos da DT sobre:

- a) variação do peso corporal;
- b) consumo de ração e de água;
- c) desempenho cognitivo em tarefa de navegação espacial.

2.2 Determinar os seguintes parâmetros bioquímicos:

- a) *expressão* diferencial de proteínas, mediante quantificação livre de marcação dos extratos proteicos provenientes do tálamo;
- b) níveis de GABA e glutamato no tálamo.

2.3 Avaliar as relações entre os parâmetros bioquímicos e entre esses e o desempenho cognitivo espacial dos animais.

1 Modelo Animal e Delineamento Experimental

Foi executado um experimento utilizando 24 ratos Wistar, machos, 3 meses de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos no biotério em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Os cuidados e o uso dos animais foram de acordo com o *National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animal* (National Research Council, 1985). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (CEUA188/2014): **Anexo 1**.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: controle (C, n = 12) e deficiente em tiamina (DTP, n = 12) (**Figura 6**). Os animais dos dois grupos foram submetidos à tratamentos onde receberam ração sem tiamina e foram distintos quanto ao seguinte tratamento: animais DTP receberam injeções diárias de piritiamina (0,25 mg/kg i.p., *Sigma Chemical Co.*) - inibidor da enzima responsável pela produção da forma ativa da tiamina, a tiamina difosfato (TDP) - enquanto que, os animais do grupo C receberam injeções diárias de tiamina (0,4 mg/kg i.p., *Sigma Chemical Co*) (Resende *et al.*, 2012).

O primeiro dia de tratamento foi considerado o Dia 0 (D0), onde os animais foram pesados, receberam injeções e foram colocados em gaiolas isoladas, juntamente com uma quantidade de ração e água igual para todos. Durante os dias do tratamento de DT os animais foram mantidos isolados e foram feitos registros do consumo de água e ração e de peso corporal, por aproximadamente 13 dias. Esses registros foram realizados com o intuito de verificar os primeiros sinais clínicos da deficiência, que são anorexia e perda de peso.

Após o aparecimento de um dos últimos sinais neurológicos, perda de reflexos de endireitamento ou convulsões, que ocorreu entre 13-15 dias de tratamento, o episódio de DT foi interrompido pela administração de duas doses de injeções i.p. de tiamina (100 mg / kg cada) intercaladas com intervalo de 8h. Os animais do grupo C receberam tratamento pareado na forma de injeções de salina (1 ml/kg i.p.) (Mousseau *et al.*, 1996; Ciccia e

Langlais, 2000). Após o tratamento, todos os animais foram submetidos a um período de recuperação, recebendo ração e água livremente, durante 15 dias (**Figura 6**).

Após a recuperação do peso dos ratos DTP, todos os animais foram submetidos à uma tarefa cognitiva no LAM, onde foram avaliados os seguintes aspectos cognitivos: aprendizado e memória espacial. Vinte e quatro horas após o teste de memória, esses animais foram mortos por decapitação, os cérebros foram retirados e as regiões cerebrais foram dissecadas (**Figura 6**).

Desenho experimental

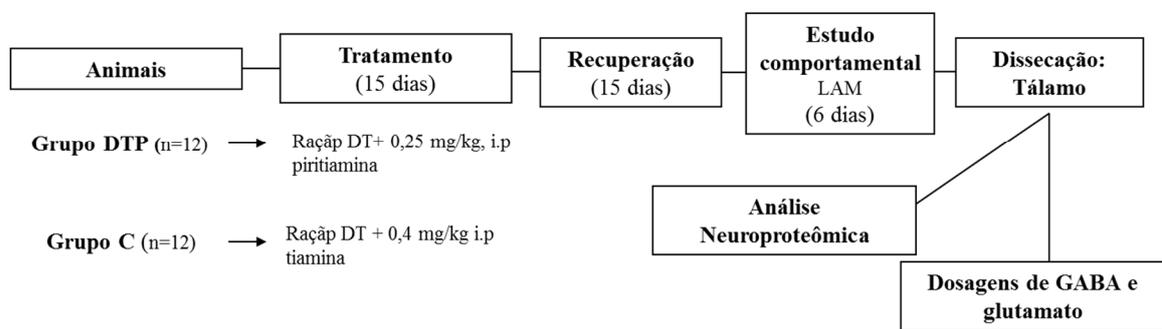


Figura 6 - Esquema do desenho experimental indicando as etapas gerais. O delineamento inclui o período de tratamento (DT na dieta com injeções i.p. de piritiamina ou com i.p. de tiamina), recuperação, estudo comportamental (LAM), dissecção do tálamo, análise neuroproteômica e dosagens de GABA e glutamato.

As rações sem tiamina foram produzidas no próprio Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LaNeC) (**Tabelas 3,4,5**).

Tabela 3 - Composição da ração 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 ^b	10
Celulose	10
Colina-HCl	4
Tocoferol (vitamina E)	0,4
BHT (conservante)	0,1

*A caseína foi autoclavada, secada e triturada antes do uso para garantir a ausência de vitamina B1 na mesma.

** A Mistura de Sais da ração deficiente em tiamina está representada na tabela 2.

Tabela 4 - Composição da mistura de sais da ração deficiente em tiamina

Sais minerais	% (m/v) por mistura de sais
NaCl	13,93
KI	0,08
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,73
CaCO ₃	38,14
MnSO ₄ .H ₂ O	0,4
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,7
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02
KH ₂ PO ₄	38,9

Tabela 5 - Composição da mistura de vitaminas da ração deficiente em tiamina

Vitaminas	% (m/v) por mistura de vitaminas
Acetato de Retinol	0,4
Colecalciferol	0,06
Menadiona	0,05
i-Inositol	1
Niacina	0,4
Pantotenato de Cálcio	0,4
Riboflavina	0,08
Piridoxina-HCl	0,05
Ácido fólico	0,02
Biotina	0,004
Vitamina B ₁₂	0,0003
Sacarose	97,49

2 Estudo Comportamental

A avaliação do desempenho cognitivo dos animais, aprendizagem e memória espacial, foi realizada utilizando-se o modelo comportamental do LAM. Esse modelo foi desenvolvido e validado por (Morris, 1984).

2.1 Equipamento

O LAM consiste em uma piscina circular de fibra de vidro, com aproximadamente 1,80m de diâmetro, contendo água a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ até o nível de 30cm conforme previamente descrito (Morris, 1984) (**Figura 7**). A piscina é dividida em quatro quadrantes imaginários denominados NO (noroeste), SO (sudoeste), NE (nordeste) e SE (sudeste). Uma plataforma de resgate, circular (15 cm de diâmetro) preta foi fixada no centro de um desses quadrantes, a dois centímetros abaixo do nível da água. Para impedir a localização visual da plataforma e para obter o contraste da detecção do animal pela câmera, 50ml de tinta preta (Acrilex, São Bernardo do Campo, Brasil) foram dissolvidos na água. A piscina não possui nenhuma pista, marca ou sinal interno, mas se encontra alocada numa sala de 3m x 3m, com algumas pistas estáveis visuais extra-labirinto (exemplo: mangueira, pôster, televisão, mesa, armário) que servem de referência para estabelecimento de coordenadas espaciais, para que o animal localize a plataforma. Uma câmera com lente angular foi fixada no teto da sala na direção central da piscina para captar as imagens e registrar o desempenho dos animais durante a execução da tarefa. As atividades dos animais durante as tentativas foram gravadas para análise posterior, que foram realizadas mediante o programa *Any Maze* - versão 4.5 (Stoelting Co., USA)

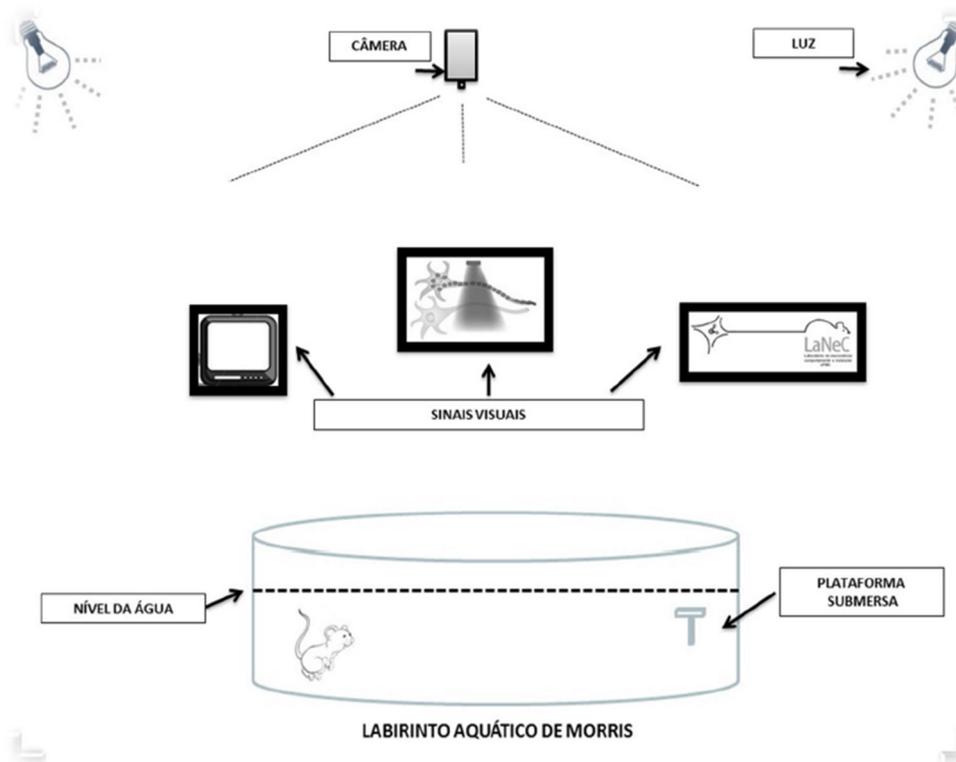


Figura 7 - Desenho esquemático da sala onde o Labirinto Aquático de Morris está localizado. Na imagem pode-se observar a piscina no centro da sala, algumas das pistas visuais extra-labirinto e a piscina com uma plataforma submersa.

2.2 Experimento

2.2.1 Treino

Foram realizadas cinco sessões de treino, sendo uma por dia em dias consecutivos, sendo que cada sessão foi constituída por 4 tentativas. Cada tentativa teve uma duração máxima (teto) de 60s. A plataforma estava localizada em uma posição fixa no centro de do quadrante NO (quadrante alvo). Em cada tentativa o animal foi colocado na piscina em um dos quatro quadrantes escolhidos aleatoriamente, com o focinho voltado para a parede da piscina. O pesquisador libera o animal e permiti que ele permaneça na piscina até encontrar a plataforma ou até no máximo 60s. Portanto, cada tentativa era finalizada quando o animal encontrava a plataforma ou quando o tempo de 60s era atingido, momento que o animal era gentilmente conduzido até a plataforma pelo experimentador. Depois de encontrar ou ser guiado até a plataforma, o rato era deixado neste local por 15s e em seguida retirado da piscina. O intervalo entre as tentativas foi de aproximadamente 10min. Como mencionado acima, todas as sessões foram gravadas e, posteriormente, as imagens analisadas no programa de computador *Any Maze*, onde as variáveis “latência” (s) = tempo gasto pelo animal até encontrar a plataforma, “distância percorrida” (m) e “velocidade de nado” (m/s) foram calculadas. A latência (s) e a distância percorrida (m) foram parâmetros considerados para expressar o desempenho cognitivo dos animais. A velocidade de nado (m/s) foi considerada um parâmetro para avaliar a atividade motora. Em cada sessão, os dados foram obtidos a partir do cálculo da mediana da respectiva variável, considerando as quatro tentativas. Os dados foram expressos através da média das medianas +/- erro padrão (S.E.M).

2.2.2 Teste comprobatório

Um dia após a última sessão do treino (6º dia) foi realizado o teste comprobatório para avaliar a memória espacial e a extinção do comportamento aprendido. Neste teste, a plataforma foi retirada da piscina e cada rato foi colocado para nadar uma única vez por um tempo de 120s. Usando as imagens dos vídeos, o desempenho dos animais foi registrado como tempo gasto no quadrante alvo no primeiro (t1) e segundo minutos (t2) do teste. Além do tempo gasto no quadrante NO, a distância entre o animal e o lugar onde a plataforma estava localizada nas sessões do treino foi medida, no primeiro e no segundo

minuto do teste (d1 e d2, respectivamente). A velocidade de nado no primeiro e segundo minutos (v1 e v2) foram utilizadas para avaliar a atividade motora dos animais. A extinção do comportamento aprendido foi avaliada a partir do índice de extinção (IE), o qual foi calculado pelas razões $d2/d1$ (distância média do animal ao alvo no segundo minuto dividido pela distância no primeiro minuto) e $t2/t1$ (tempo que o animal permaneceu no quadrante alvo no segundo minuto pelo tempo em que o animal permaneceu no quadrante alvo no primeiro minuto). Se $d2$ for maior que $d1$ ou $t2$ for maior que $t1$, o IE será maior que 1, sugerindo assim a extinção do comportamento.

3 Obtenção das amostras biológicas

No dia seguinte (7º dia) ao teste comportamental os animais de cada grupo foram eutanasiados por decapitação. Os encéfalos foram rapidamente retirados das cavidades cranianas, pesados e dissecados, de acordo com as coordenadas apresentadas no Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2006). Os encéfalos foram posicionados ventralmente sobre uma superfície com indicações de escala milimetrada, tomando-se como ponto zero a parte mais distal da região anterior. Um corte coronal foi feito a 2mm na região antero-posterior para a retirada do córtex pré-frontal (CPF). O cerebelo foi separado do cérebro e do tronco encefálico. Um corte sagital foi realizado para a separação dos dois hemisférios. De forma aleatória, um hemisfério foi mantido em uma matriz para seccionamento criostático, o meio Tissue Tek (Sakura), para futuras análises de imunohistoquímica e o outro hemisfério foi destinado a dissecação imediata das regiões cerebrais. Os tálamos foram retirados da superfície medial da região diencefálica e separados em direito e esquerdo de acordo com o hemisfério. Após a remoção do mesencéfalo, o hipocampo exposto foi cuidadosamente dissecado da região cortical. As amostras foram então armazenadas a -80°C para a posterior realização da análise proteômica e dos ensaios cromatográficos de neurotransmissores no Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC= *High Performance Liquid Chromatography*).

4 Análise Proteômica

Para análise proteômica foram utilizados tálamos de 6 animais do grupo C e 6 animais DTP (n=6 por grupo). Um esquema do delineamento desta parte do estudo está representado na **Figura 8**. As amostras do grupo C foram escolhidas de forma aleatória enquanto que as amostras do grupo DTP foram selecionadas de acordo com o desempenho (latência) desses animais na 2ª sessão do LAM (pior desempenho), sendo escolhidos 3 animais com desempenho acima da média do grupo e 3 que estavam abaixo da média. Este critério foi escolhido para se assegurar da representação da amostra com indivíduos dos dois polos, já que o déficit cognitivo seria uma das variáveis consideradas nas análises de regressão.

Análise Neuroproteômica

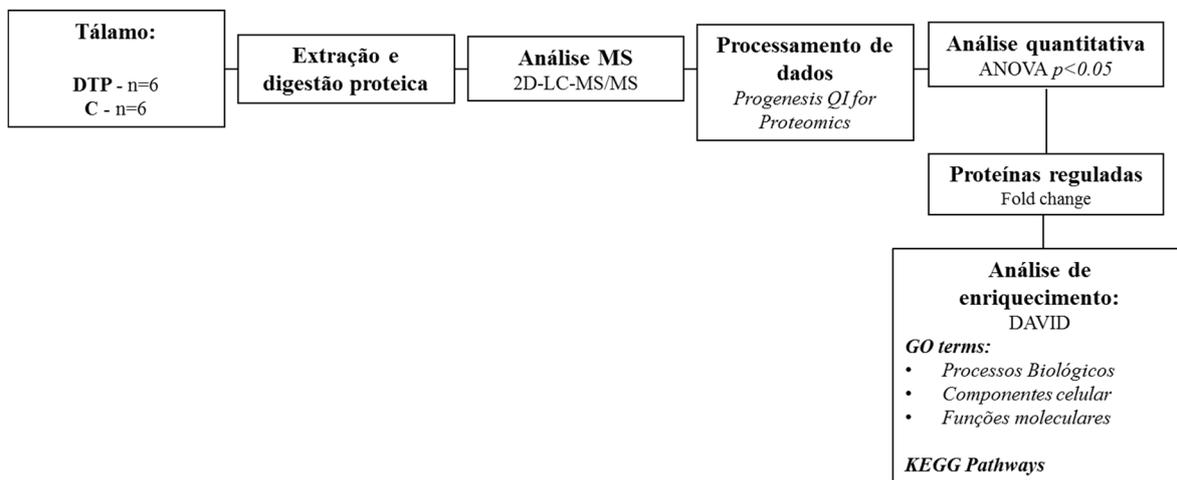


Figura 8 - Delineamento experimental detalhando as etapas da Análise Neuroproteômica. Foram utilizados 6 tálamos de cada grupo (DTP e C) e os mesmos passaram pelas etapas de extração e digestão de proteínas, purificação de peptídeos, análise por espectrometria de massas, processamentos de dados e análise de bioinformática.

4.1 Extração e digestão de proteínas

Aproximadamente 15mg de tecido da região do tálamo, obtidos dos dois hemisférios cerebrais de cada rato, foram homogeneizados em 150µL de tampão de lise contendo 4% (m/v) de SDS, 100mM de Tris/HCl pH 7,6 e 0,1 M de DTT e incubados a 95°C por 3min. Imediatamente depois, as amostras foram sonicadas por 20min e centrifugadas a 16000 x g por 10min à temperatura ambiente e o sobrenadante foi recuperado (Wiśniewski *et al.*, 2009). Para a precipitação de proteínas, foi adicionado ao sobrenadante 4 volumes de acetona 100% (v/v) gelada e, posteriormente, incubados a -20°C durante a noite. No dia

seguinte a suspensão contendo as proteínas precipitadas foi centrifugada durante 15min a 2000 x g a 4°C e os *pellets* lavados duas vezes com solução gelada de acetona 80% (v/v). Os tubos contendo as amostras foram secados à temperatura ambiente, em capela de extração, por aproximadamente 30min (Humphrey *et al.*, 2015). Os precipitados foram ressuspendidos em tampão contendo Ureia/Tioureia 7/2M e 100mM de NH₄HCO₃, e posteriormente, as soluções foram agitadas em vortex e sonicadas em banho sonicador durante 20min, para dosagem de proteína usando o método de Bradford (Bradford, 1976).

Um volume de solução correspondente a 50µg de proteínas foi misturado com NH₄HCO₃ 1M (concentração final: 100mM) e reduzida em solução de DTT (Sigma-Aldrich) 100mM (concentração final: 10mM) por 1h a 30°C. Resíduos de cisteína foram alquilados adicionando solução de Iodoacetamida (Sigma-Aldrich) 400mM (concentração final: 40mM) e incubados à temperatura ambiente, durante 3 min, protegidas da luz. As proteínas foram digeridas com 0,1µg/µL de Tripsina (Promega Madison, WI) na proporção 1:50 tripsina:proteína. Para digestão as amostras foram incubadas a 37°C durante à noite.

Após o tempo de digestão, a reação foi interrompida pela adição de solução de TFA 10% (v/v). A solução de peptídeos trípticos obtidos após a digestão foi dessalinizada mediante a utilização de *Spin Columns* (Harvard Apparatus, Holliston, MA) conforme instruções do fabricante. Os eluatos contendo os peptídeos trípticos dessalinizados foram secos no *speed vac* e, posteriormente, ressuspendidos em solução de formato de amônio 20mM para análise por espectrometria de massas, conforme detalhado abaixo.

4.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

4.2.1 Espectrômetro de massas SYNAPT G2-Si 2D

As análises por espectrometria de massas sequencial acoplada à cromatografia líquida bidimensional (2D-LC-MS/MS) foram realizadas usando um equipamento de *Ultra Performance Liquid Chromatograph* (UPLC- ACQUIT System- Waters, Manchester, UK) acoplado por um sistema *online* ao espectrômetro de massas SYNAPT G2-Si 2D (Waters, Manchester, UK), localizados no Laboratório Aquacen da Escola

Veterinária, UFMG. O esquema do espectrômetro de massas utilizado no presente trabalho está representado na **Figura 9**.

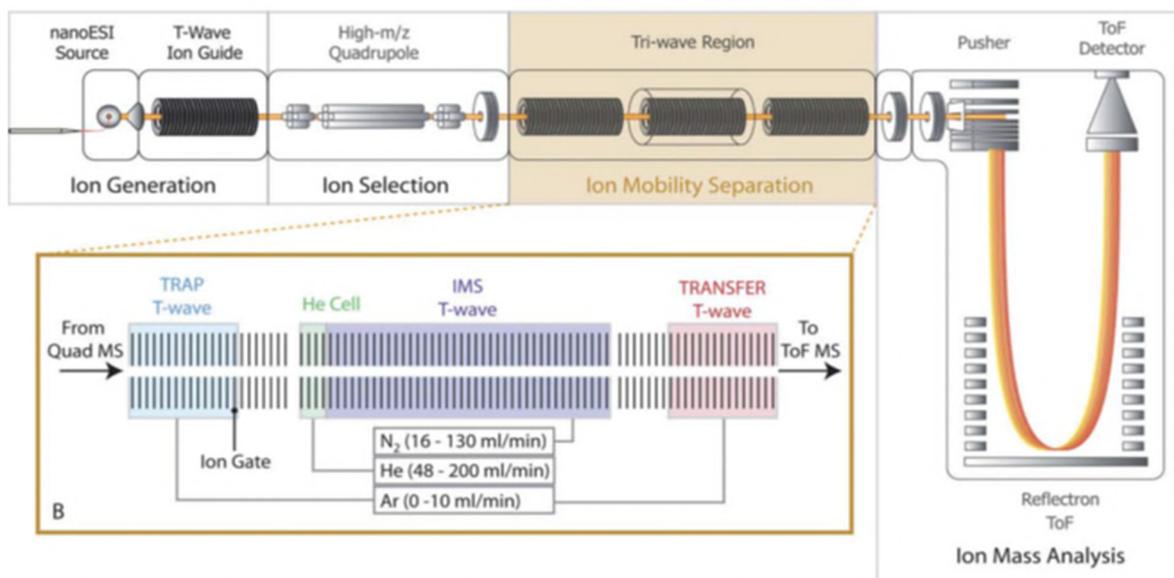


Figura 9 - Esquema do Espectrômetro de massas Synapt G2-Si da Waters e utilizado na análise proteômica do presente trabalho. Fonte: Zhong et al., 2011

O sistema Synapt G2-S HDMS encontra-se acoplado ao UPLC, onde os peptídeos tripticos provenientes da amostra são injetados e separados antes de entrar no espectrômetro de massas. Esse sistema é composto por uma fonte de ionização, *ElectroSpray Ionization* (ESI), por três componentes de analisadores diferentes, um Quadrupolo, um T-Wave e um tempo de voo (TOF) e por um detector.

O quadrupolo é responsável por filtrar os íons com base em sua relação m/z . Consiste de quatro hastes paralelas ligados a um gerador de radiofrequência e um potencial de corrente contínua. A trajetória dos íons é dependente do campo elétrico produzido de tal forma que apenas íons com uma determinada m/z atingem o detector, selecionando-os (Bayes e Grant, 2009).

O T-Wave é responsável pela mobilidade iônica de alta eficiência, permitindo utilização de uma dimensão adicional de separação, com base no tamanho e na forma molecular. Dentre suas vantagens considera-se a separação de isômeros, eliminação de interferências, geração de espectros mais limpos e separação de íons estruturalmente similares (Waters).

Finalmente, o analisador TOF possui uma região livre de campo elétrico e baixa pressão onde os íons com a mesma quantidade de energia são acelerados. O tempo de voo dos íons até atingirem o detector determinará a massa dos mesmos (Bayes e Grant, 2009).

Os detectores convertem o feixe de íons em uma corrente de sinais (sinal elétrico) que por sua vez formam o espectro de massas. Mediante ferramentas computacionais, os dados de massa são avaliados para posterior identificação dos peptídeos e consequentemente das proteínas (Bayes e Grant, 2009).

4.2.2 Análises por espectrometria de massas 2D-LC-MS/MS

Para normalizar o valor molar de cada amostra foram realizadas medidas de estequiometria. A réplica técnica foi feita em triplicata de duas amostras, sendo essas a primeira e a última amostra injetadas.

Para cada amostra, 500ng de proteínas provenientes da suspensão obtida após digestão, conforme descrito no item 4.1 acima, foram injetadas na primeira coluna de fase reversa RP (BEH C18, 5 μ m, 300 μ m \times 50mm, Waters). Peptídeos foram eluídos dessa coluna a 2 μ L/min e separados em 5 frações de 10.8, 14.0, 16.7, 20 e 65% (v/v) de acetonitrila em formato de amônio 20mM (pH = 10). Em seguida, foram injetados na segunda coluna, a coluna *trap* (M-Class Trap 2D Symmetry C18,100 Å, 5 μ m, 180 μ m x 20 mm). Os peptídeos da coluna *trap* foram separados na coluna analítica (M-Class HSS T3 1.8 μ m 75 μ m x 150 mm) usando o gradiente linear de 0,1% de ácido fórmico em água (v/v) (fase móvel A) e 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) em um fluxo de 0.450 μ L/min. A separação foi efetuada usando a fase móvel B em diferentes concentrações e tempos: 7% (v/v) por 40 minutos, 40% (v/v) por 1 minuto, e 40–85% por 5 minutos. Finalmente, o gradiente linear volta a 7% (v/v) da fase B por 14 minutos. A temperatura da coluna analítica foi mantida a 45°C.

Após a separação, os peptídeos pré-fracionados foram inseridos no espectrômetro de massas através de uma fonte de ionização, *ElectroSpray Ionization* (ESI) com *NanoLock-Spray* (Waters, Manchester, UK). A partir da formação de um *spray*, os eluentes foram imediatamente inseridos para dentro do analisador de massas do tipo *Ion Mobility Spectrometry* (T-Wave-IMS) que opera em LC-MS^E modo íon positivo, alternando entre

baixa (3 eV) e elevada energias de colisão (19–55 eV) com um tempo de aquisição de 0,80 s em cada modo e a uma faixa de 50 a 2000m/z. Como calibrador interno, foi usando os íons fragmento do [Glu-1] FibrinoPeptídeo B (Sigma-Aldrich) (GFP), 100fmol/μL em solução de acetonitrila: água: ácido fórmico nas proporções 50:50:1. O *spray* de referência do GFP foi injetado a cada 30s e em fluxo de 0,2μL/min durante todo o tempo de aquisição de dados.

4.3 Análise Bioinformática

Os espectros LC-MS^E foram processados no *software* Progenesis QI for Proteomics V3.0 (Nonlinear Dynamics, Waters Corporation) e a identificação das proteínas foi feita contra o banco de dados UniprotKB Rattus norvegicus (UniProtKB - 28.650 entradas em 05/2016) (<http://www.uniprot.org/>). A intensidade dos íons de 12 corridas foi automaticamente alinhada e os peptídeos iônicos com carga estável de +1 ou >+7 foram filtrados. Os parâmetros da busca incluíram 1) até duas perdas na clivagem da tripsina, 2) tolerância de até 10ppm, 3) carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa e 4) oxidação da metionina como modificação variável. Foram consideradas buscas confiáveis aquelas que apresentaram no mínimo um peptídeo único por proteína identificada. O *false-discovery rate* (FDR) aceito para as identificações foi de 1%. As abundâncias das proteínas foram calculadas pela técnica *Hi 3*, onde é realizada a média dos 3 peptídeos mais abundantes de cada proteína. Esse valor de N=3 é considerado o valor máximo de peptídeos utilizados nessa técnica.

As proteínas com valor de $p < 0.05$ obtido a partir da Análise de Variância (ANOVA) *One way* foram consideradas como diferencialmente *reguladas* e as mesmas foram categorizadas como *super reguladas* (ou *reguladas* positivamente ou induzidas) quando o valor do *fold change* ≥ 2 e *sub reguladas* (ou *reguladas* negativamente ou suprimidas) quando o valor de *fold change* < 2 . O *fold change* é a razão entre as abundâncias relativas das proteínas encontradas nas amostras dos animais DTP e dos animais C. Essas proteínas passaram pelos seguintes filtros: quantidade mínima de peptídeo por proteína = 2; proteínas com no mínimo 1 peptídeo único; eliminar sequencias peptídicas reversas.

Para representação gráfica das proteínas identificadas foi construído o gráfico *Volcano* a partir do cálculo do $\text{Log}_2(\text{fold change})$ e $-\text{Log}_{10}(\text{valor de } p)$, utilizando ferramentas do programa GraphPad Prism 5.0/2007.

A representação gráfica do tipo *Heat Map* com agrupamento hierárquico foi construída com o auxílio do programa XLSTAT (versão *trial*), onde a análise de agrupamento e classificação hierárquica foram realizadas a partir da abundância das proteínas diferentemente *reguladas* ($p < 0,05$) e do número de acesso das mesmas. A variação de cores entre vermelho e verde, representa um fluxo contínuo entre os menores e maiores valores de abundância, respectivamente.

As proteínas diferencialmente *reguladas* foram submetidas à análise de enriquecimento funcional usando o banco de dados *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID Bioinformatics Resources) versão 6.8 Beta (<https://david.ncifcrf.gov/>). A análise de enriquecimento funcional ocorre através da integração de dados de diferentes bancos com o objetivo de identificar e categorizar processos biológicos e vias através de genes diferencialmente expressos (Huang *et al.*, 2009). A partir da lista de acesso do UniProt, foram selecionadas no DAVID as categorias dos bancos internos *Gene Ontology* (GO) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG *Pathway Database*), onde as proteínas foram associadas de acordo com anotações funcionais e vias de sinalização e metabólicas, respectivamente (Kanehisa e Goto, 2000). As proteínas então foram classificadas pelo GO de acordo com suas características e categorizadas em Processos Biológicos (PB), Componentes Celular (CC) e Função Molecular (FM) (Huang *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009). As categorias foram consideradas significativas com os seguintes critério: mínimo de 2 proteínas por categoria e um *score* $< 0,05$.

5 Análises Cromatográficas de neurotransmissores - HPLC

5.1 Equipamento cromatográfico e princípios de funcionamento

As análises bioquímicas para dosagens dos neurotransmissores, GABA e glutamato, descritas abaixo foram realizadas utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência- CLAE (*HPLC: High Performance Liquid Cromatography*). O sistema de HPLC funciona a partir do bombeamento de um tampão de separação (fase móvel), passando por uma pré-coluna e chegando até uma coluna (fase estacionária). Quando a amostra é injetada no sistema por uma válvula de injeção, a fase móvel a arrasta até a coluna, onde os componentes da mistura serão separados de acordo com sua polaridade, se a coluna é de fase reversa (*RP: Reverse Phase*). Depois de separados os compostos serão detectados por um detector. O detector utilizado nas análises dos neurotransmissores GABA e glutamato foi o detector fluorimétrico. A fluorescência de cada componente é detectada através de comprimentos de onda de excitação e emissão e sua intensidade é registrada em forma de picos em um integrador, o qual está acoplado a um computador (**Figura 10**).

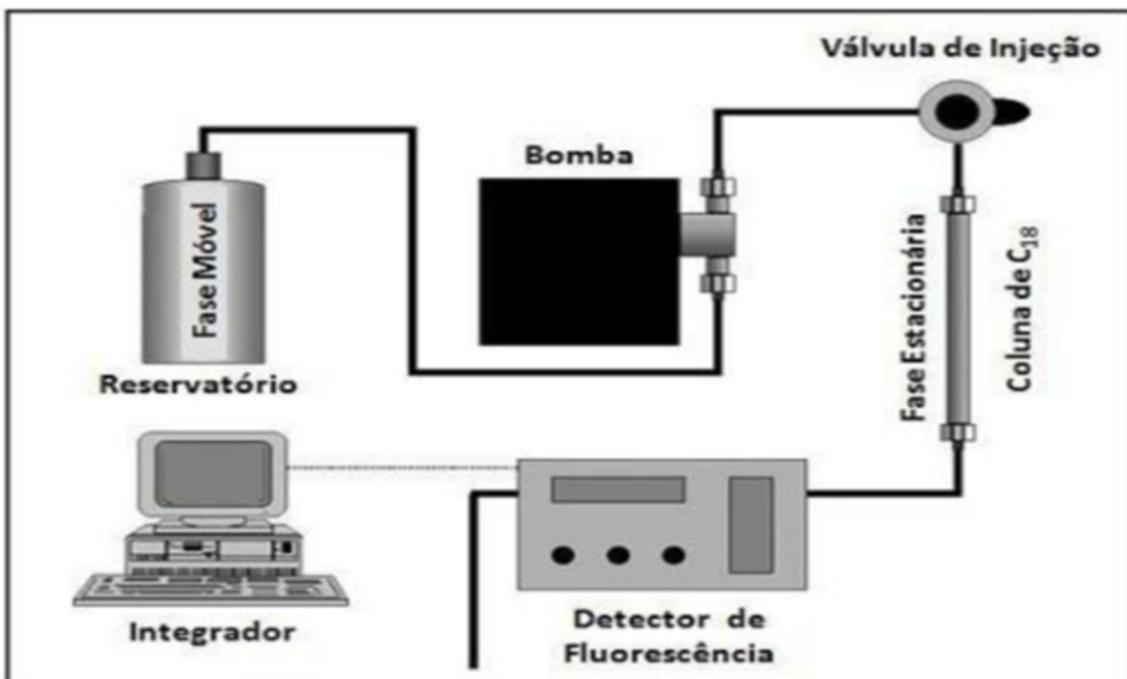


Figura 10 - Diagrama representativo dos componentes de um HPLC.

Fonte: <http://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>, acesso em 04-10-16.

O sistema cromatográfico utilizado no presente trabalho foi um cromatógrafo (LC-10AD, Tokyo, Japão) e um detector fluorescente (FLD - Shimadzu spectrofluorometric detector RF-551, Tokyo, Japan) da Shimadzu, uma bomba LC-10, uma válvula injetora de 200 μ L (Rheodyne 7725-I, California, USA) e um integrador (PC/Chrom+, software; versão 4.2.0).

5.2 Dosagem de GABA e Glutamato

As dosagens de GABA e glutamato foram realizadas utilizando o método detalhado abaixo e estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa (De Freitas Silva *et al.*, 2009) (**Figura 11**).

Dosagens de GABA e glutamato

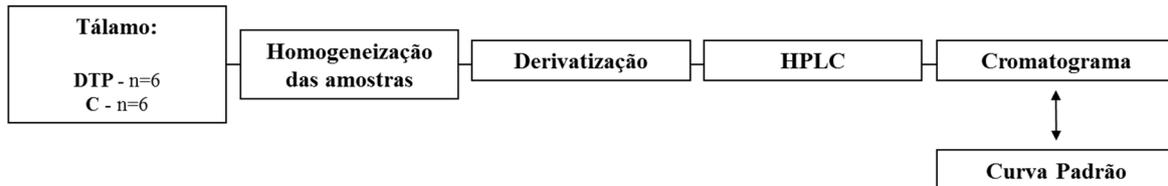


Figura 11 - Delineamento experimental detalhando as etapas das Dosagens de GABA e glutamato. Foram utilizados 6 tálamos de cada grupo (DTP e C) e os mesmos passaram pelas etapas de homogeneização, derivatização e condições cromatográficas.

5.2.1 Processamento das amostras biológicas

Amostras de tálamos provenientes aos hemisférios opostos dos mesmos animais utilizados para análise proteômica, foram processados para as dosagens neuroquímicas. Essas amostras foram descongeladas e homogeneizadas com solução metanol:água (85:15 v/v), sendo o volume 15 vezes o peso do tecido – tálamo - presente em cada amostra. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 7800 x g (Sorvall RC-5B), na temperatura de 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi separado do *pellet* e o mesmo foi coletado, filtrado (Millipore 0,45µm, 13mm) e conservado no gelo até a derivatização e análise no HPLC.

5.2.2 Derivatização

Devido os neurotransmissores GABA e glutamato não possuírem características fluorescentes ou eletroativas naturais, é necessário que a amostra sofra uma reação de derivatização pré-coluna para que os mesmos sejam identificados ao passar pelo fluorímetro. Um minuto antes de injetar a amostra no HPLC, foi realizada a reação de derivatização, sendo constituída de 20µL de ortoftaldeído (OPA) metanólico (5 mg/mL) preparado no dia do ensaio, 75µL de tampão borato (pH 9,9) e 5µL de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). Essas quantidades de reagentes foram adicionadas à 100 µL

de amostra e a solução resultante foi agitada e injetada no HPLC após um minuto de reação. A derivatização pré-coluna foi realizada de acordo com Mengerink e cols. (2002) e Kutlán e Molnár-Perl (2003).

5.2.3 Condições cromatográficas

Para dosagens de GABA e glutamato, foram utilizados os comprimentos de onda de excitação de 337nm e de emissão de 454nm. Uma pré-coluna (RT 250-4 E. Merck, Darmstadt E.R., Germany) e uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (150 mm×4,6mm, ID) foram utilizadas nas análises.

No presente estudo, a fase móvel isocrática utilizada consistiu de uma solução 0,05M de acetato de sódio, tetrahydrofurano e metanol (50:1:49 v/v), pH 4,0. A mesma foi filtrada em filtro membrana Durapore 0,45µm (Millipore) e, posteriormente, degazeificada. Os componentes foram eluídos isocraticamente em menos de 10min de corrida, em um fluxo de 1mL/min. O tempo de retenção aproximado desses dois compostos foi 3 minutos para glutamato e 8 minutos para GABA. Curvas padrões foram feitas com o intuito de calcular as concentrações de GABA e glutamato nas amostras de tálamo e essas foram obtidas a partir da média das triplicatas de cada amostra em µg /g de tecido.

6 Análises Estatísticas

Todos os dados obtidos foram avaliados com relação ao tipo de distribuição, usando-se o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*.

Os dados dos pesos corporais, consumo de ração e água (n = 24) foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) fatorial 2 x 13, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: tratamento (dois níveis: C e DTP) e peso / consumo ao longo do tratamento, sendo os números de registros iguais a 13. Essa análise foi seguida pelo teste *post-hoc* Bonferroni.

Os dados coletados durante o Treino (latência, distância e velocidade de nado) no LAM foram analisados por ANOVA 2 x 5, com medidas repetidas no último elemento,

sendo os fatores: tratamento (dois níveis: C e DTP) e desempenho nas cinco sessões consecutivas de treino. Esses dados foram obtidos a partir da média das medianas de cada tentativa. Para verificar diferenças entre os grupos, os dados foram submetidos ao teste *post-hoc* Bonferroni. As variáveis medidas no teste comprobatório: tempo gasto no quadrante alvo e distância média do local onde se encontrava a plataforma no primeiro minuto do teste, e índice de extinção foram analisados utilizando teste *t-student*. As velocidades do nado no primeiro e no segundo minuto foram analisadas pela ANOVA *One-Way*.

As dosagens de GABA e glutamato foram realizadas em triplicata. A média das réplicas foram analisadas pelo teste *t-student*.

Todas as análises de correlação, entre as diferentes variáveis dependentes foram realizadas através de análises de regressão linear (Winer *et al.*, 1991).

As análises foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5.0/2007*. Os valores correspondentes a *pesos corporais, consumo de ração e água, desempenho cognitivo (aprendizado, memória e índice de extinção)* foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M). Diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % ($p < 0,05$).

1 Modelo Experimental

Para identificar os primeiros sinais clínicos foram feitos registros do peso corporal e do consumo de ração e água de cada animal ($n=12$ para cada grupo) durante 13 dias de tratamento. ANOVA com medidas repetidas no último elemento, 2×13 mostrou efeito do fator tempo sobre o peso corporal [$F_{13,143} = 13,51$, $p < 0,0001$], o consumo de ração [$F_{13,143} = 13,51$, $p < 0,0001$] e ingestão de água [$F_{13,143} = 13,51$, $p < 0,0001$]. Entre os 10º e 15º dias de episódio, os animais DTP reduziram o consumo de ração e de água e em consequência eles perderam peso quando comparados com os animais C ($p < 0,05$). Interações significativas entre o tratamento (DT) e o tempo de tratamento foram observadas [peso: $F_{13,143} = 33,43$, $p < 0,0001$; ração: $F_{12, 264} = 8,246$, $p < 0,0001$; água: $F_{12, 132} = 6,967$, $p < 0,0001$] (**Figura 12 painéis A, B e C**). Nenhum sinal clínico foi observado nos animais do grupo C. Antes do episódio de DT e após o período de recuperação, não foram observadas diferenças entre os dois grupos experimentais em relação ao peso corporal, ao consumo de ração e a ingestão de água (os dados brutos do peso corporal dos animais no último dia de recuperação estão apresentados no **Anexo 2**).

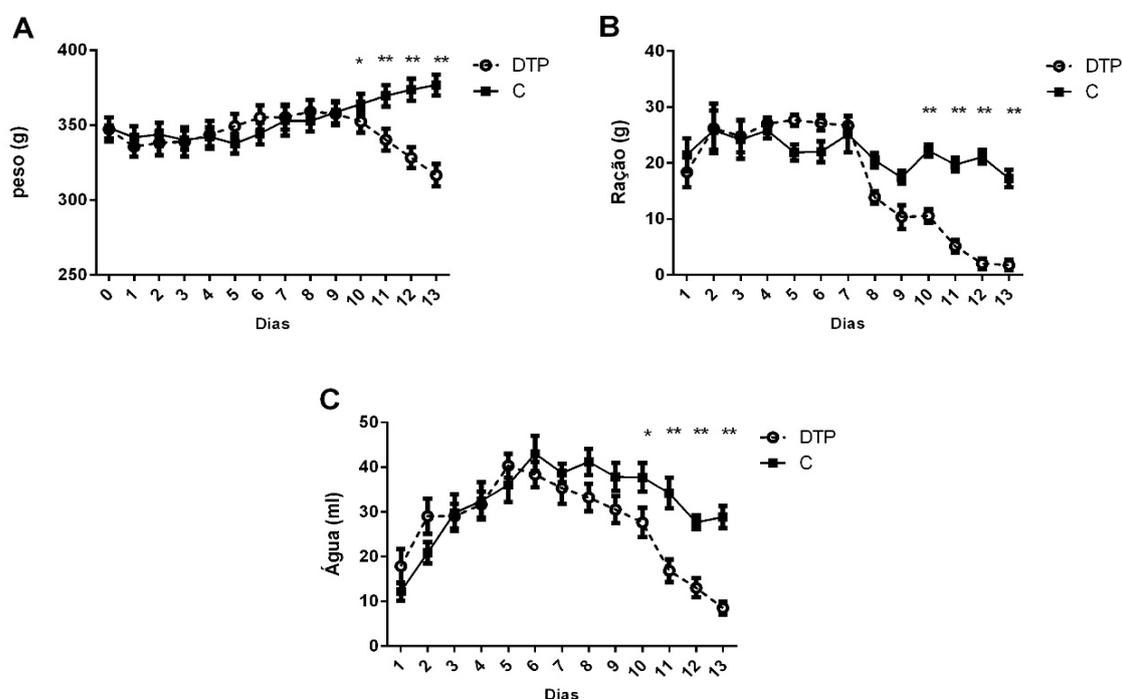


Figura 12 - Três parâmetros fisiológicos medidos durante o episódio de deficiência de tiamina nos animais DTP e C. Nos painéis A, B e C estão representados os pesos dos animais, consumo de ração e de água ao longo da deficiência de tiamina (13 dias). Grupos: DTP (deficiente de tiamina - $n=12$) e C (controle - $n=12$). Os dados estão representados como a média do grupo \pm S.E.M.. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os dados brutos estão apresentados nos Anexos 2, 3 e 4.

2 Estudo Comportamental

A aquisição da informação (aprendizado) foi expressa em latência (s, tempo gasto pelo animal para encontrar a plataforma), distância percorrida (m) e velocidade de nado (m/s) durante as cinco sessões de treino no LAM (**Figura 13**).

2.1 Treino no LAM

O desempenho dos animais DTP e C durante o treino no LAM, expresso em latência de escape (s) ao longo das cinco sessões, revelou que os dois grupos foram capazes de aprender a tarefa, porém os ratos DTP demoraram mais tempo para aprender. Esses dados estão mostrados na **Figura 13, painel A**, onde observa-se diferenças significativas na segunda ($t = 3,04, p=0,014$) e na terceira sessões ($t = 3,33, p=0,005$). Análise de variância ANOVA 2x5 com medidas repetidas no último elemento mostrou efeitos significativos do tempo [$F_{4,84} = 34,27, p < 0,001$] e da deficiência de tiamina [$F_{1,21} = 7,45, p = 0,012$]. Não foi observado interação significativa entre esses dois fatores [$F_{4,84} = 2,16, p = 0,079$].

Adicionalmente, para a distância percorrida, ANOVA 2x5 mostrou efeito significativo do tempo [$F_{4,84} = 26.87, p < 0,0001$] e da deficiência de tiamina [$F_{1,21} = 10.54, p = 0,008$]. Os ratos DTP percorreram maior distância do que os ratos C (**Figura 13, painel B**) na segunda ($t = 2.70, p=0,04$) e na terceira sessões ($t = 3.46, p=0,003$).

Figura 13, painel C, mostra dados da velocidade de nado. Análise ANOVA 2x5 mostrou efeito significativo do tempo [$F_{4,84} = 6,5, p = 0,0002$]. Não foi observado efeito do tratamento (DT) sobre a velocidade de nado e nem interação entre os fatores ($p>0.05$), o que sugeri que a DT não afetou diretamente a atividade motora desses animais avaliados.

Um rato DTP não foi capaz de aprender as tarefas, caracterizando um ponto *outlier* que foi removido das análises (C: $n=12$; DTP: $n=11$).

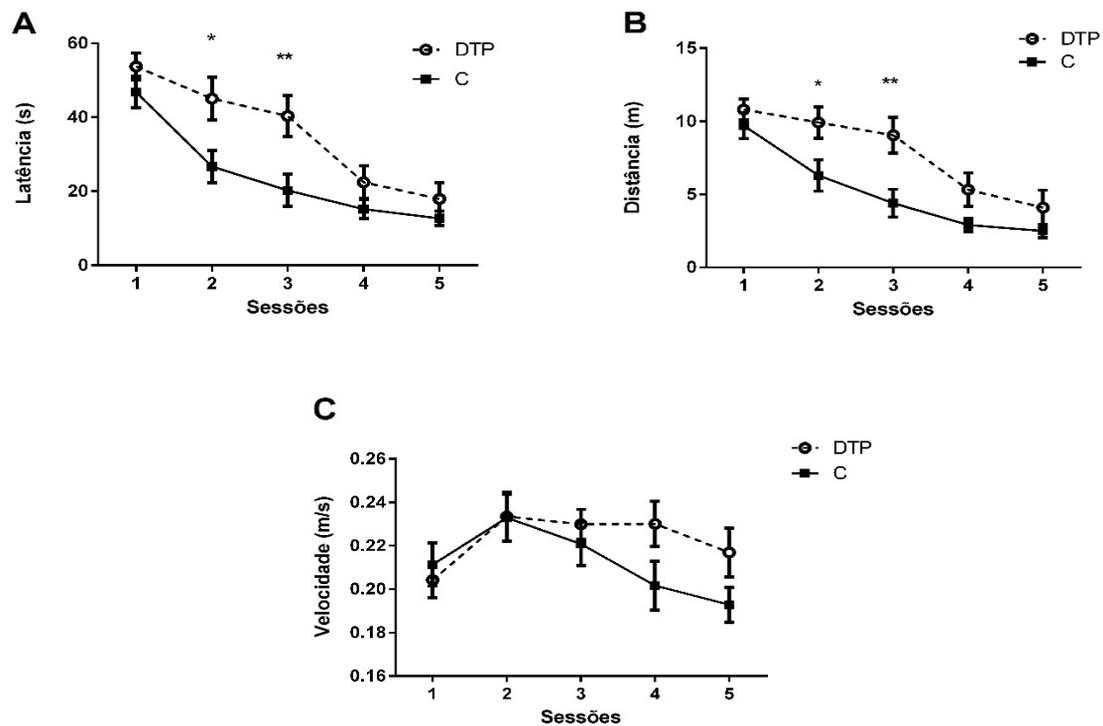


Figura 13 - Desempenho comportamental durante o treino no LAM expresso em latências (s) (painel A), distância percorrida (m) (painel B) e velocidade de nado (m/s) (painel C) dos animais dos grupos DTP (n=11) e C (n=12). Os dados estão representados como a média do grupo \pm S.E.M.. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Os dados brutos estão apresentados nos Anexos 5, 6 e 7.

2.2 Teste comprobatório

Para avaliar a memória espacial de referência foram utilizados o tempo de permanência dos animais no quadrante alvo e a distância média da plataforma no primeiro minuto do teste. As análises pelo teste *T-student* mostraram que não houve diferença significativa entre os dois grupos avaliados (DTP e C) em relação ao tempo de permanência no quadrante alvo [$t = 1,93$, $p = 0,067$] e à distância média à plataforma [$t = 0,39$, $p = 0,694$], indicando que a memória espacial de referência não foi afetada pela deficiência de tiamina. A distância total percorrida [$t = 1,28$, $p = 0,213$] e a velocidade de nado [$t = 1,28$, $p = 0,212$] no primeiro minuto também não foram afetadas pela DT (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Parâmetros comportamentais avaliados durante o primeiro minuto do teste comprobatório no LAM

Grupos	Parâmetros Comportamentais			
	Tempo no quadrante alvo (s)	Distância ao alvo (m)	Distância total (m)	Velocidade de nado (m/s)
C (n=12)	16,44 \pm 1,75	1,126 \pm 0,005	14,08 \pm 0,55	0,2347 \pm 0,01
DTP (n=11)	21,46 \pm 1,93	1,130 \pm 0,008	15,08 \pm 0,54	0,2514 \pm 0,01

Valores representam média do grupo \pm S.E.M. Os dados brutos se encontram nos Anexos 8, 9, 10 e 11.

Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos DTP e C em relação ao índice de extinção, o qual foi calculado a partir do tempo de permanência no quadrante alvo (t_2/t_1) [$t = 0,29$, $p = 0,77$] e da distância média ao alvo (d_2/d_1) [$t = 0,77$, $p = 0,446$] no segundo minuto sobre o primeiro minuto. O teste ANOVA *One-Way* indicou não haver diferença significativa entre a velocidade de nado no primeiro e segundo minutos do teste comprobatório [$F_{3,42} = 1,02$, $p = 0,39$].

3 Análises Proteômica

3.1 Variações no proteoma talâmico induzido pela deficiência de tiamina

Para investigar o efeito da DT sobre o proteoma do tálamo após testes cognitivos, foram feitas análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS). Essa análise foi realizada em 12 amostras (tálamos) sendo 6 amostras para cada grupo (C e DTP) ($n=6$ réplicas biológicas).

A análise identificou um total de 2016 proteínas nas amostras analisadas. Após eliminar sequências peptídicas reversas, proteínas identificadas com menos de 2 peptídeos, proteínas sem peptídeos únicos e proteínas não específicas para *Rattus norvegicus*, 1440 proteínas foram mantidas. Desse total, a análise de variância ANOVA mostrou efeito significativo da DT sobre 183 proteínas o que correspondeu a 12,7 % das proteínas identificadas (ANOVA $p < 0,05$) (**Tabela 7**). De acordo com o critério de análise pelo valor de *fold change* (razão das abundâncias relativas do grupo DTP sobre do grupo C), foi verificado que a maioria dessas proteínas (153 proteínas) foram negativamente reguladas pela DT (*fold change* < 2) (**Figura 14, painel A**). O *heat map* nos mostra a distinção de 2 grupos de proteínas e de 2 grupos de tratamento (C e DTP) (dendograma hierárquico) de acordo com a abundância das proteínas (**Figura 14, painel B**). **Figura 15** mostra a escala dinâmica de proteínas identificadas em todas as amostras como controle de qualidade das análises DIA por LC-MS.

Tabela 7 - Proteínas significativamente reguladas identificadas no tálamo de ratos DTP e C.

Acesso	Quantidade de peptídeos	Peptídeos Únicos	Score	Anova (p)	Fold change	DTP						C					
						R15	R23	R22	R24	R17	R20	R1	R9	R12	R4	R10	R2
Q6TUD6_RAT	15	1	98,55	0,0164	0,202	4,33	24,22	8,50	369,98	2,69	624,23	137,10	2016,15	875,24	166,51	1103,32	830,16
D3ZME3_RAT	5	2	47,05	0,0376	0,211	512,68	426,29	352,58	250,37	464,38	906,02	684,46	1721,87	2733,43	293,41	7106,85	1256,50
CC105_RAT	6	3	30,68	0,0234	0,234	561,63	1439,56	460,73	402,45	337,30	210,16	2786,08	2319,18	485,53	7020,69	783,84	1205,35
D4AEG3_RAT	3	1	13,85	0,0353	0,323	1,30	39,66	36,52	43,97	3,19	105,35	44,87	220,18	134,72	91,36	149,51	71,93
FILPJ7_RAT	2	1	11,68	0,0134	0,353	4657,47	17178,88	12690,57	14301,36	9932,18	6989,09	10878,08	32158,20	44076,13	16151,12	58937,59	23845,83
ATP5J_RAT	3	3	29,83	0,0308	0,360	197,04	5709,57	3251,93	5234,59	751,68	1460,51	4361,48	8953,67	6395,15	10252,26	12721,83	3494,03
E9PTU4_RAT	9	6	70,23	0,0177	0,404	3503,51	8752,75	5024,07	11320,17	5166,93	13987,94	5903,46	24163,70	25874,27	15771,12	27935,70	18541,88
A0A0G2K7A8_RAT	2	1	18,68	0,0221	0,416	4670,61	18421,65	12141,78	25167,81	5699,43	10363,78	11945,89	33150,99	31764,25	39171,32	50480,53	17181,58
S4A8_RAT	3	2	16,01	0,0353	0,418	2269,88	31355,78	29603,27	198000,28	13395,16	37841,55	75623,48	103246,82	145983,74	242950,12	63123,44	116190,03
CPLX2_RAT	3	3	26,73	0,0048	0,426	1578,62	5995,78	3273,64	1820,67	2876,65	3865,51	4502,30	12239,40	5414,91	7569,02	9236,80	6587,53
OXRI_RAT	15	1	96,67	0,0445	0,454	1038,13	8418,00	5167,92	11918,57	3185,02	8661,23	7372,01	16923,64	14851,03	26240,36	10547,35	8597,03
D3ZIP8_RAT	3	1	25,37	0,0060	0,469	5180,27	5101,47	3292,53	2661,19	3090,47	4637,53	7997,37	7953,65	7990,22	5303,39	16530,05	5355,25
Q4V8H5_RAT	4	3	24,36	0,0430	0,479	1516,34	4963,49	2192,93	4399,74	1489,56	1398,00	3466,66	6984,34	3135,04	10617,46	6533,15	2601,53
Q63144_RAT	3	1	18,34	0,0464	0,498	1264,00	11468,54	9738,50	25064,91	2819,35	25504,98	27263,93	29693,46	16420,26	26585,61	29171,27	23146,35
FIM5N3_RAT	46	1	302,71	0,0167	0,501	954,20	2254,34	1989,26	2169,92	600,53	802,56	2052,94	3282,81	2610,48	2600,30	4852,45	2103,72
SPF30_RAT	2	1	10,05	0,0083	0,508	1047,83	4139,75	2346,37	3619,19	1933,18	2693,02	5046,98	4958,71	3884,03	5629,57	7649,55	3915,29
Q0GLB5_RAT	3	2	25,46	0,0037	0,523	3191,48	2701,28	2209,96	4732,30	1535,33	2931,36	3760,05	6341,60	6586,20	5896,69	6245,90	4250,36
RAB26_RAT	3	1	30,75	0,0187	0,523	3782,16	3728,87	3524,95	3788,80	2014,28	5126,96	4988,59	8163,14	5489,44	12507,72	11432,85	6275,60
PIMT_RAT	3	3	22,20	0,0032	0,524	12290,17	32884,84	23281,89	30838,80	15653,66	20503,55	33571,51	45418,50	42209,26	54328,73	50825,58	32367,64
G3V8Q6_RAT	8	5	50,95	0,0152	0,549	5581,62	6167,82	7046,16	11833,06	4586,51	8383,19	7191,68	11070,79	19542,81	10909,76	18223,46	12534,56
D3ZS39_RAT	2	1	10,29	0,0183	0,568	652,74	1377,06	1238,42	3308,80	928,51	888,09	2037,28	2888,39	1862,59	3132,79	2843,46	2019,65
B2RYE1_RAT	2	2	18,48	0,0265	0,575	4357,61	10101,26	5933,78	19048,96	3738,96	9068,75	20850,00	13201,35	17188,74	16048,08	11117,80	12394,61
A0A0G2JYY8_RAT	3	1	24,98	0,0076	0,586	1376,65	1272,63	1127,97	894,16	2315,98	1939,13	2448,71	2425,81	2302,26	2741,65	3525,60	1785,55
NDKB_RAT	8	3	85,53	0,0141	0,597	31946,26	53651,78	52913,44	69180,81	37542,50	55081,84	48681,65	79548,87	92603,86	74968,74	126781,21	80808,37
A0A0G2K7Y2_RAT	16	2	102,85	0,0278	0,601	12953,53	31877,64	20070,69	30226,25	24191,02	25629,02	26064,44	44151,38	39287,72	66803,17	37211,06	27612,19
SYUA_RAT	17	12	190,46	0,0005	0,607	138089,66	151629,45	91662,19	89059,14	131174,49	148811,21	211669,44	210397,14	197217,69	202519,51	230875,31	183870,18
NPTN_RAT	6	5	37,37	0,0386	0,630	3060,41	5103,35	4465,27	2938,80	5520,45	4985,36	5789,31	6330,98	9371,80	4311,98	10652,53	4921,17
M0RA39_RAT	4	2	23,21	0,0336	0,632	6515,21	5639,86	5821,93	8060,83	7499,53	4534,73	11661,59	5348,02	9026,08	15018,18	11618,52	7615,29
B0BMV0_RAT	2	2	12,18	0,0263	0,632	1809,20	1734,35	1288,23	1251,02	1558,44	1946,72	2833,37	3496,30	3136,09	1443,92	2572,08	1688,57
M0R3X7_RAT	6	1	37,35	0,0013	0,653	2469,11	2221,38	1968,19	3066,83	2514,37	2490,81	3118,62	3240,94	5100,93	4010,59	3688,93	3396,57
G3V9L3_RAT	2	2	13,37	0,0444	0,653	1645,48	2780,40	2373,63	3270,66	2146,28	1848,59	3125,05	3664,09	2631,13	6493,03	2974,95	2647,79
A0A096MJE6_RAT	41	28	312,12	0,0052	0,656	37499,47	71319,00	55399,58	59288,87	57830,07	75472,34	83188,93	95781,68	98408,85	67787,93	110674,96	87936,51
GTR3_RAT	7	7	58,28	0,0007	0,675	31069,06	37557,78	30506,09	33750,70	29277,47	41387,73	37873,16	48438,32	57096,13	53278,74	54284,41	50457,42
PYGL_RAT	7	2	61,65	0,0132	0,678	6977,62	15849,69	16073,58	13735,50	11771,03	15157,20	19623,97	19925,67	15626,18	22478,72	21006,21	18695,10
Q6TXJ1_RAT	20	3	123,44	0,0355	0,678	3530,77	3999,81	3076,73	4451,56	2610,18	2524,92	7958,94	4212,72	4589,34	5598,16	3576,32	3828,03
A0A0G2JXZ3_RAT	11	8	63,02	0,0440	0,680	17230,01	36754,04	32556,24	18012,45	36763,32	36073,76	41486,44	41784,89	46363,02	28043,78	59633,62	43541,31
GNAZ_RAT	13	10	87,51	0,0179	0,691	11178,82	16792,41	14702,00	21723,54	11619,65	14141,04	18957,53	21092,66	20373,03	31918,76	20896,59	17195,64
A0A0H2UHB7_RAT	19	17	175,93	0,0264	0,698	33159,69	62574,08	68450,43	99298,50	51095,19	77422,53	90305,37	84237,13	96813,08	105509,41	85382,57	99316,29

PTPRZ_RAT	7	4	54,66	0,0163	0,705	21687,75	37004,58	26342,32	29669,11	22962,68	35499,83	54078,90	33734,89	39218,82	39195,72	47600,40	31787,74
RAB13_RAT	6	2	51,63	0,0314	0,708	661,14	786,44	674,14	614,69	728,50	483,73	705,93	936,59	953,40	655,23	1406,05	916,23
VATF_RAT	6	4	60,28	0,0273	0,710	16579,14	27134,15	21976,44	24350,13	17486,08	28639,73	37888,11	44333,54	24483,23	31397,06	27477,25	26237,21
G3V8V3_RAT	32	5	263,93	0,0236	0,720	23021,67	51284,44	51614,85	37905,91	33984,56	44618,14	63977,27	60186,62	50795,11	60660,73	54201,53	46785,44
SFXN3_RAT	15	1	118,97	0,0252	0,725	23401,08	14129,16	16048,60	15482,18	22703,81	14683,98	17270,63	31698,91	22655,54	25799,76	26818,87	22555,97
VOME_RAT	2	1	18,53	0,0439	0,737	6485,03	10157,31	8759,88	11185,11	7111,32	5250,06	8980,76	11800,27	8480,58	13928,11	12326,79	10926,88
A0A096MKE2_RAT	3	2	24,34	0,0486	0,741	1989,51	3734,01	3204,79	3371,44	2864,80	2784,89	3979,04	3663,20	4559,61	3207,23	5758,66	3057,48
EAA4_RAT	3	1	21,16	0,0321	0,745	595,13	439,50	333,64	410,48	435,62	544,01	478,36	545,84	874,74	610,98	571,06	622,33
Q6P503_RAT	16	13	128,55	0,0039	0,751	58992,76	54597,40	43714,46	41702,65	46087,28	51197,33	75120,76	61453,75	55783,62	70661,00	74041,76	57434,50
MCF2L_RAT	3	2	18,47	0,0384	0,752	431,26	588,44	632,80	547,13	632,00	614,71	566,29	792,13	850,53	573,30	758,23	1042,66
A0A0G2K9J2_RAT	17	13	113,63	0,0079	0,753	42173,89	59015,72	47727,75	57944,40	47063,03	55332,17	67947,40	65158,75	73060,23	86404,59	53387,44	64717,78
I433E_RAT	45	34	389,06	0,0010	0,754	174702,40	211558,60	205209,41	231546,80	175259,08	192526,15	277069,34	228693,75	263481,33	257418,05	308494,99	243737,85
M0RAQ6_RAT	53	5	430,24	0,0129	0,757	29785,67	36113,68	30292,28	42692,54	24671,31	38826,62	51651,27	40855,51	45930,29	48143,23	36974,19	43716,25
Q45QL8_RAT	9	2	72,97	0,0493	0,763	3161,82	3252,63	2659,14	3173,78	4282,28	5937,75	4382,93	6068,08	4043,25	4992,79	4463,80	5507,29
KINH_RAT	8	2	54,47	0,0064	0,768	1499,17	1729,86	2257,19	2019,43	1859,61	1804,35	2398,93	2108,74	2552,96	2384,60	2973,79	2121,38
Q4KSH6_RAT	4	2	25,73	0,0425	0,770	6099,73	11325,32	9985,03	7469,73	8231,64	9386,21	9588,36	10264,42	11761,13	12222,67	14907,18	9423,59
PGK1_RAT	46	16	445,92	0,0002	0,771	342529,63	429207,60	377218,15	381222,74	402616,20	402963,25	462083,31	491050,67	512299,90	498985,70	585115,29	478863,38
LRRC7_RAT	22	15	116,27	0,0336	0,779	12263,64	14127,55	9776,90	8023,11	13282,80	14848,70	14460,11	15008,94	15354,18	14000,08	19288,10	14722,62
D3ZBB8_RAT	27	17	157,16	0,0159	0,781	20020,73	24792,68	19653,31	17803,89	19846,76	17011,01	24009,08	23568,28	23787,43	32967,52	27499,57	20766,08
D4ABK9_RAT	11	7	67,52	0,0079	0,783	13119,71	10362,06	9153,25	9440,16	9875,09	12306,04	15129,67	13921,01	15800,86	11975,83	12536,72	12717,10
ENOG_RAT	53	36	491,33	0,0097	0,801	396898,36	510907,08	427689,81	380678,98	497430,07	534081,63	551230,98	652469,49	584283,08	500044,58	526285,56	616226,73
D4A3V2_RAT	4	3	42,52	0,0311	0,820	21256,35	28250,00	24322,75	29437,38	27520,78	22231,36	30198,54	29248,86	28638,08	33377,76	38905,90	26199,69
PFKAL_RAT	15	7	100,64	0,0281	0,823	27268,45	31756,78	32875,51	33128,00	30137,15	34719,48	41782,44	36206,97	36255,04	48899,03	30796,91	36669,26
D3ZCZ9_RAT	4	4	29,02	0,0411	0,828	19989,53	18258,88	16058,30	15087,07	15816,03	15218,73	16502,08	20373,50	19045,48	18231,34	26052,05	21087,94
WDR1_RAT	19	15	164,19	0,0278	0,829	53135,12	47225,26	46751,42	56449,95	48278,56	46128,10	61708,85	52601,39	59839,38	76447,45	59614,59	49284,76
KAP3_RAT	21	15	164,89	0,0363	0,832	45983,06	48704,49	37966,01	38886,53	43339,60	37284,07	44891,77	49588,52	44217,90	62732,91	56689,57	44956,43
MIC25_RAT	4	3	24,83	0,0464	0,834	6534,65	6669,39	5959,89	6608,05	5319,18	5287,99	8860,68	6960,97	5712,18	6994,32	8325,60	6791,33
F1LX07_RAT	33	13	301,41	0,0300	0,835	28612,70	45885,08	38559,90	39891,48	36927,54	34927,28	47165,30	49454,89	44262,36	47902,27	41204,63	39269,64
VATE1_RAT	27	1	192,22	0,0030	0,837	148739,06	169412,56	136601,18	145571,20	151116,70	173006,23	191760,50	162834,79	179854,80	184328,07	195769,38	189391,65
G3V7L8_RAT	27	1	192,90	0,0030	0,837	1094,77	1246,94	1005,43	1071,46	1112,27	1273,39	1411,43	1198,52	1323,80	1356,72	1440,93	1393,99
Q5XI3_RAT	8	8	58,54	0,0007	0,838	39247,04	40936,65	40736,65	38307,43	43155,01	44776,60	55703,92	46578,17	46606,09	48127,35	49974,59	48021,10
M0R7G4_RAT	2	2	15,11	0,0476	0,839	27786,11	27791,81	23221,97	20952,04	27817,07	29893,75	29766,68	26390,38	37540,84	28074,02	35158,18	30839,19
GABT_RAT	31	26	306,75	0,0386	0,844	182900,02	134490,93	143323,50	150553,70	174743,98	172095,16	207893,47	167675,57	207301,50	170690,12	166168,22	216123,87
SAHH2_RAT	34	8	263,17	0,0067	0,847	49471,00	45830,35	51108,55	57382,26	48879,72	49112,65	62594,92	52928,97	58734,08	68771,60	56098,25	57196,23
ACY1A_RAT	7	5	51,73	0,0103	0,851	11468,36	11189,88	12217,57	15113,14	11676,05	11715,50	14321,67	13244,43	14423,69	15902,47	13520,10	14862,67
D4A6C5_RAT	4	2	23,30	0,0307	0,853	10227,10	11570,20	9609,61	8525,95	12657,14	11629,68	12829,61	11751,34	11372,39	12863,32	13761,68	12673,55
VATB2_RAT	34	22	320,11	0,0268	0,856	143062,81	153567,16	134055,92	126798,97	152457,97	177147,91	163534,40	168733,58	172908,95	153488,29	201773,81	175918,84
AP2M1_RAT	30	24	235,50	0,0223	0,859	116730,99	103220,73	88349,32	90610,65	105222,38	95087,85	109091,73	104306,79	121316,36	114220,36	135575,37	113422,70
OLA1_RAT	4	2	25,09	0,0013	0,864	18814,01	18580,22	18947,51	18457,52	19087,05	19867,16	22399,03	19749,04	20701,90	24632,39	22446,49	21803,48
PGAM1_RAT	29	23	227,02	0,0198	0,887	479528,99	492863,19	425617,20	397890,93	513784,19	503460,46	530974,21	513858,82	514664,05	527986,85	568463,08	516365,55

ALDH2_RAT	6	5	43,11	0,0036	1,388	14933,93	9992,34	14471,02	14164,76	16016,83	11374,94	10896,26	8817,92	10397,13	8934,42	8825,37	10433,24
RSI4_RAT	4	3	23,95	0,0057	1,410	12986,64	8919,31	12031,45	9258,70	10895,44	8174,80	6653,14	8144,58	7612,80	8469,83	5626,48	7659,53
CPT1B_RAT	3	2	29,62	0,0295	1,415	17847,22	9719,23	11065,21	12967,62	9808,12	11687,78	9202,28	8738,31	8261,66	5680,10	7504,07	12261,99
PAK1_RAT	6	3	37,63	0,0177	1,431	24832,59	13935,54	16912,93	11732,28	19734,05	16553,17	14792,23	11646,61	11395,78	11690,74	10152,74	12793,07
ARPC2_RAT	9	8	71,73	0,0140	1,433	70231,87	44346,23	54495,81	40888,37	53232,47	40297,26	36289,36	40086,31	38027,21	37894,39	23265,45	36214,35
A0A0G2K930_RAT	9	8	68,52	0,0469	1,436	45125,21	29559,49	36315,33	38507,67	38133,50	24729,05	31679,28	23806,38	20702,81	35784,06	12431,70	23471,01
CAC1G_RAT	5	3	27,05	0,0108	1,465	56526,93	32629,15	33812,96	28973,62	34065,01	32811,15	29548,71	18379,58	23237,67	27555,25	26429,53	24203,95
TBA8_RAT	34	1	290,76	0,0198	1,468	798,48	1441,94	1105,65	968,19	1276,42	841,03	1108,19	784,38	531,52	612,57	655,13	688,94
G3V8C4_RAT	4	2	24,83	0,0403	1,471	10801,65	11711,81	14168,12	12470,47	13450,60	7133,30	12625,80	9364,28	7335,44	7195,61	4430,91	6456,16
B0BMY8_RAT	8	5	55,14	0,0180	1,475	61684,23	43803,18	81810,92	52543,52	80038,25	79016,75	34667,85	39202,86	50861,89	38122,06	50536,09	57107,13
RS7_RAT	3	2	27,58	0,0024	1,477	8404,41	5169,22	7096,58	5705,10	6039,68	4964,95	3975,63	4219,65	4874,59	4712,98	3619,33	3906,24
F1M6Z1_RAT	35	21	176,43	0,0087	1,487	61859,24	49167,22	54626,69	40191,41	76391,53	61056,49	29322,93	41058,78	42391,53	29509,93	43907,20	44665,44
H2A1E_RAT	7	4	68,97	0,0070	1,515	262031,71	200122,31	279178,76	206471,37	350920,22	333968,04	207381,69	153873,18	192893,19	133757,90	183832,31	205740,94
GPX1_RAT	6	4	37,21	0,0049	1,523	9488,51	8583,22	15228,96	12426,13	9507,12	10922,33	8451,00	6455,88	6020,34	8258,25	5645,55	8606,50
E9PSN4_RAT	19	12	119,84	0,0489	1,525	95782,25	34212,99	42726,78	57546,99	38829,72	57049,76	36887,79	30824,94	34293,43	44097,83	39645,78	28151,04
H10_RAT	3	2	25,81	0,0049	1,529	15034,87	12202,62	16830,84	12672,61	18861,50	12732,33	11741,26	9258,09	10956,38	9817,63	6018,92	9973,13
G3V8K5_RAT	3	1	13,25	0,0225	1,536	4971,62	2424,59	3729,56	4949,96	3986,62	4311,54	2297,92	1647,48	2277,40	2600,45	3960,94	3083,64
H4_RAT	18	17	168,60	0,0063	1,553	556983,15	339053,34	488045,17	329159,56	526027,06	419945,35	349632,38	299539,93	270926,81	260509,62	192841,91	339038,60
A2VD16_RAT	2	2	16,90	0,0066	1,555	17965,15	10727,79	12946,35	12900,96	16743,76	9382,96	10447,45	8689,21	8631,11	9451,75	6129,16	8527,74
A0A0G2KAN7_RAT	15	2	95,07	0,0052	1,563	6831,44	4998,60	9117,69	10549,04	5985,08	6484,78	5041,07	4295,80	4772,45	4613,86	4281,68	5120,79
AMPL_RAT	11	8	70,69	0,0011	1,582	12688,64	12172,95	20463,57	12643,55	17181,35	15104,44	9078,68	9746,02	9689,90	9758,66	11195,03	7567,67
H14_RAT	9	5	67,43	0,0023	1,615	79855,77	53534,67	94252,76	70170,07	81644,73	81716,83	31793,25	45967,55	53389,67	43005,71	55684,20	55746,04
H2B1_RAT	13	10	81,33	0,0008	1,622	607730,71	334771,89	492415,03	409853,04	549641,38	527456,97	295253,74	273952,95	325897,70	263273,39	297569,17	345394,27
DYN3_RAT	34	14	268,58	0,0279	1,646	49365,82	24076,25	29326,35	17121,10	43653,81	27250,41	24091,09	16731,89	19681,11	18479,98	15013,76	21932,39
CATD_RAT	12	9	100,42	0,0120	1,660	30696,72	23058,88	56263,66	41935,80	24950,86	37924,76	23010,35	17249,87	28479,53	20254,85	20349,99	20092,99
PTGDS_RAT	2	2	20,88	0,0059	1,668	5155,17	4194,32	6480,46	6137,46	5725,43	4125,85	4328,84	3714,19	3931,63	2896,79	1891,07	2313,35
GELS_RAT	4	3	40,77	0,0031	1,668	50838,44	25362,83	30321,14	24243,25	39289,64	34179,34	21676,67	19691,01	18789,77	19304,28	25287,97	17657,70
PNPH_RAT	9	7	55,62	0,0031	1,699	37210,41	25169,12	54192,00	40437,10	33024,09	51796,77	22867,71	22748,88	19256,22	21959,06	27793,78	27705,55
M0R9C6_RAT	3	3	14,45	0,0211	1,718	1396,34	995,40	1008,86	519,92	944,24	1008,82	691,56	355,30	494,60	361,87	510,43	1004,27
F7EPE0_RAT	9	9	86,27	0,0048	1,738	119744,76	70205,83	141446,96	108371,16	88046,47	82037,47	71162,49	55306,51	55182,89	77559,53	35530,77	56224,54
D3ZWD0_RAT	2	2	12,09	0,0063	1,787	42347,50	29653,74	33169,22	20922,37	43595,24	22668,79	25736,29	17213,83	15757,44	17071,93	11614,51	20251,48
RASM_RAT	3	2	17,73	0,0444	1,805	6922,57	1834,38	3298,20	3658,71	3594,15	3295,67	2839,11	1113,84	1807,23	3414,50	1006,15	2339,43
CATZ_RAT	2	2	12,36	0,0039	1,863	14429,92	6087,01	15047,46	10698,50	10136,16	12584,17	8607,00	4867,55	6268,56	4775,81	6276,38	6229,04
A0A0G2JSH5_RAT	49	4	405,52	0,0008	1,963	225645,68	124258,05	252140,75	155750,71	254883,34	178742,87	118477,64	110105,49	110970,55	75760,49	85815,04	105775,67
ALBU_RAT	51	4	416,27	0,0008	1,963	141610,03	77981,49	158237,72	97745,56	159958,92	112174,91	74353,84	69099,67	69642,56	47545,54	53855,54	66382,37
GFRA1_RAT	2	1	18,17	0,0049	2,051	1834,24	1094,81	3144,38	1462,88	1660,40	2502,93	826,71	776,41	698,80	797,96	1098,75	1505,86
PLMN_RAT	2	1	13,68	0,0089	2,187	1422,66	1527,18	3711,79	4080,69	1590,72	2288,90	1122,74	893,66	960,75	1868,83	803,30	1037,41
VIME_RAT	34	18	316,26	0,0079	2,203	70474,44	29669,41	116956,51	108236,87	56492,73	62695,64	35098,02	24770,94	33535,77	33700,11	35227,22	39449,28
A0A096MIT7_RAT	9	5	82,23	0,0053	2,211	121290,12	32669,92	76401,74	71912,37	61434,13	69756,68	41896,49	27092,28	25241,56	42232,08	39467,82	20100,70
Q63363_RAT	29	2	252,95	0,0158	2,240	5124,51	3405,28	7891,87	5223,39	6349,88	9515,40	873,63	2952,32	3882,74	1144,18	2545,82	5345,48

A0A0G2KB92_RAT	6	1	50,38	0,0191	2,259	2038,61	1892,46	4031,73	3233,67	4496,57	2144,71	1873,41	1308,77	1696,24	1953,23	308,17	756,57
D3ZZS8_RAT	10	2	83,64	0,0359	2,374	3171,92	1736,83	3705,58	1249,58	8492,32	2976,78	1457,75	1262,00	1433,80	1028,16	2184,56	1621,62
RAN_RAT	8	2	83,54	0,0092	2,510	2603,92	1346,03	3229,72	3169,07	2030,46	769,09	1316,92	697,81	666,69	985,30	561,96	1009,82
C9E895_RAT	11	4	81,13	0,0007	2,613	9976,17	5739,73	13478,18	13802,04	9088,45	7204,73	4212,47	2407,24	3399,74	6437,98	3460,94	2769,30
CYTC_RAT	4	3	27,98	0,0002	2,698	69035,42	24690,21	58568,67	51316,46	44571,12	60315,49	20213,90	19852,84	21800,00	15358,42	14898,81	22233,35
FABP7_RAT	5	3	47,76	0,0005	2,701	56701,62	38277,08	77204,62	91149,53	54712,04	41434,80	29434,39	19149,56	21280,32	23308,62	11808,53	28109,36
ANXA3_RAT	11	8	100,50	0,0015	2,714	60631,78	23150,12	80288,34	56166,11	35655,22	81741,04	15267,50	21388,67	21240,74	19786,85	24465,67	22240,84
E9PSP1_RAT	4	4	36,59	0,0133	2,734	50442,07	18849,78	78936,79	97792,46	21546,77	49673,25	18495,39	17803,72	17991,17	27449,84	17263,88	17043,66
TAGL2_RAT	4	2	34,55	0,0001	2,892	2591,75	1466,37	3273,69	2670,34	1503,31	2958,73	678,60	1087,35	792,45	784,05	901,92	756,64
TBA3_RAT	55	2	397,41	0,0396	2,952	15375,20	3515,59	3507,17	1407,42	7247,44	3190,36	2329,09	1813,10	1599,30	1367,39	1858,36	2632,32
MYH10_RAT	84	5	599,39	0,0120	3,102	177127,82	49092,26	81187,95	37954,01	109812,19	27986,32	53450,12	17282,52	18563,69	25863,04	16633,48	23944,17
GFAP_RAT	59	48	518,20	0,0001	3,108	446018,17	239963,39	553430,16	558117,32	386700,32	408637,82	203914,56	114056,09	128643,72	128248,97	76063,47	183285,66
D4ADD7_RAT	3	2	28,20	0,0028	3,216	1116,76	1127,93	4066,89	3084,41	2178,99	2223,74	1028,57	385,91	438,54	563,93	1389,07	485,03
Q5XI38_RAT	4	2	24,25	0,0003	4,304	10997,42	4065,98	17632,87	14335,39	6582,37	12357,35	3220,63	2433,65	3184,79	2487,18	1412,93	2587,56
M0R597_RAT	2	1	13,16	0,0477	4,438	689,42	3832,73	12206,43	7957,14	2334,83	1739,30	1823,09	568,21	661,29	2588,25	49,27	789,73
APOE_RAT	31	24	294,23	0,0001	4,600	208360,20	89543,84	219935,97	247736,43	71113,20	226383,40	62413,31	37443,20	32738,71	34139,55	32977,26	31393,73
CLUS_RAT	9	9	79,61	0,0013	4,783	87251,83	12284,71	63111,76	83476,61	29135,07	60804,08	10333,46	10675,77	12643,04	11986,50	12467,29	12155,32
YBOX1_RAT	2	2	12,16	0,0040	7,039	5730,56	422,08	4197,51	3355,88	993,95	1205,63	301,60	204,17	198,62	860,62	401,68	292,94
IL4_RAT	4	2	21,65	0,0461	7,371	5561,48	334,48	508,26	655,75	665,03	38,99	177,77	14,95	56,44	741,67	33,85	28,67
CIQB_RAT	2	1	18,62	0,0141	9,183	1634,37	300,45	1922,73	3228,50	234,02	133,13	80,00	152,97	131,26	228,83	79,96	138,61
TMX2_RAT	2	2	10,76	0,0469	10,281	15380,19	1116,86	8226,53	1275,95	39607,19	794,34	3200,65	441,19	693,71	1058,24	437,01	627,83
NABI_RAT	2	1	12,39	0,0003	19,629	2479,91	1086,21	6757,11	3235,16	5667,49	2443,31	656,12	15,38	17,21	25,46	16,67	373,12
FILN1_RAT	8	5	43,50	0,0024	45,222	55125,34	1927,23	12050,11	821,01	12707,23	1335,46	300,79	223,73	42,90	366,68	125,40	797,25
E9PTK9_RAT	4	1	22,69	0,0252	47,096	28720,69	163,85	275,87	271,20	1256,78	615,49	62,54	125,84	52,32	55,19	205,73	163,07
D3ZWW2_RAT	7	1	63,47	0,0011	49,687	559,37	52,11	102,65	13,26	733,13	45,11	14,03	1,38	1,76	1,81	0,74	10,58

Número de acesso, quantidade de peptídeos e peptídeos únicos das 183 proteínas identificadas nas amostras de tálamos e desreguladas pela DT. Essas colunas são seguidas pelo score, valor de p (ANOVA) e fold change. A abundância relativa de cada proteína pode ser observada para cada amostra (n=6 em cada grupo DTP e C). As amostras são denominadas com R seguida pelo número dado para o animal. A descrição de cada proteína a partir do seu número de acesso se encontra no Anexo 12.

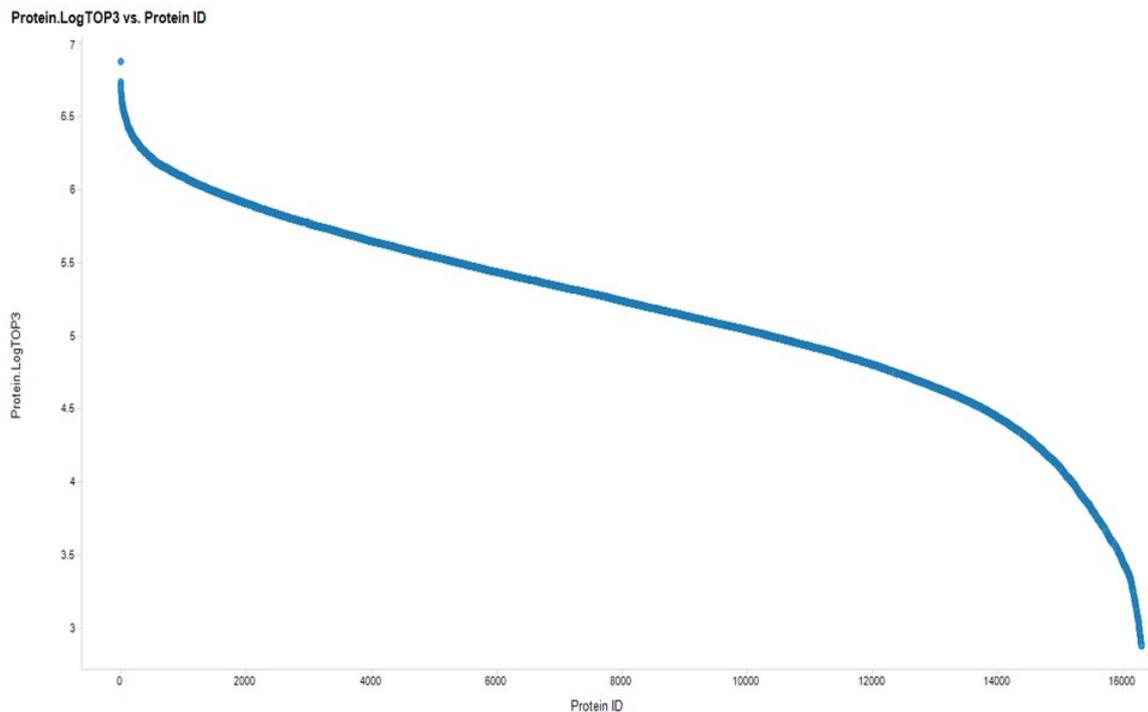


Figura 15 - Controle de qualidade das análises DIA por LC-MS a partir da escala dinâmica de proteínas identificadas em todas as amostras, em relação ao Log das abundâncias dos peptídeos Hi 3 ou TOP3.

3.2 Análise bioinformática das proteínas reguladas pela deficiência de tiamina

Usando o software *DAVID Bioinformatics Resources 6.8 Beta*, as 183 proteínas passaram por análise de enriquecimento pelo Gene Ontology (GO) e análise de vias por *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG pathway)*. Um total de 133 proteínas foram anotadas em 3 categorias GO: 43 em Processos Biológicos (PB), 41 em Componentes Celular (CC) e 21 em Função Molecular (FM), considerando o valor de $p < 0,05$. Os *top 10* termos GO para cada categoria – PB, CC e FM – estão representados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Top 10 termos GO para as proteínas diferencialmente reguladas pela deficiência de tiamina.

Processos Biológicos			
<i>Termos</i>	<i>Quantidade de proteínas</i>	<i>%</i>	<i>Valor de p</i>
Transdução de sinais mediada por pequenas GTPases	11	8.3	7,00E-06
Envelhecimento	12	9	1,60E-05
Processos glicolíticos	5	3.8	1,50E-04
Regulação de morte neuronal	4	3	1,80E-04
Resposta ao estresse oxidativo	7	5.3	6,40E-04
Hidrólise de ATP acoplado ao transporte de prótons	4	3	2,30E-03
Processo catabólico de glicogênio	3	2.3	2,40E-03
Endocitose	6	4.5	2,50E-03
Resposta a lesão	5	3.8	2,70E-03
Processos metabólicos dependente de ATP	4	3	4,10E-03
Componentes Celular			
Exosomo extracelular	79	59.4	5,30E-33
Adesão focal	17	12.8	2,10E-08
Axônio	16	12	4,20E-08
Citosol	32	24.1	2,00E-07
Membrana	38	28.6	2,50E-07
Projeção neuronal	15	11.3	5,40E-07
Citoplasma	62	46.6	1,50E-06
Corpo celular neuronal	16	12	4,30E-06
Corpo celular	8	6	4,70E-06
Bainha de mielina	10	7.5	6,30E-06
Funções Moleculares			
Atividade GTPase	13	9.8	1,10E-08
Ligantes à GTP	16	12	9,50E-08
Ligantes de proteínas	27	20.3	0,00004
Ligantes de ácido graxo	5	3.8	0,000045
Componente estrutural do citoesqueleto	6	4.5	0,000076
Ligantes de quinases	6	4.5	0,00053
Ligantes de actina	9	6.8	0,00055
Ligantes de piridoxal fosfato	5	3.8	0,00074
Ligantes de drogas	6	4.5	0,0014
Ligantes da cauda Poly (A) RNA	19	14.3	0,0017

Os top 10 termos GO e suas respectivas proteínas estão detalhadas nos Anexos 13, 14 e 15.

A análise GO para a categoria PB revelou que, entre os 10 primeiros termos, os processos glicolíticos, hidrólise de ATP acoplado ao transporte de prótons, processo catabólico de glicogênio e processos metabólicos dependente de ATP foram compostos somente por proteínas *reguladas* negativamente, enquanto os outros processos tiveram

uma ou mais proteínas *reguladas* positivamente. 37 proteínas *sub reguladas* e 9 super *reguladas* foram distribuídas nos 10 termos na **Tabela 8** de PB. A aparente discrepância em relação ao número total de proteínas mostrados na **Tabela 8** é porque uma proteína específica pode participar em mais do que um processo biológico.

Além disso, a análise para categoria CC mostrou que 19 proteínas *reguladas* positivamente e 88 *reguladas* negativamente foram distribuídas entre os *top* 10 termos GO. A maioria dessas proteínas *reguladas* negativamente pela DT foram associadas com citosol e membrana.

Finalmente, 71 proteínas foram categorizadas na análise para FM e dessas, 12 proteínas foram super *reguladas* pela DT. Observando o primeiro e o segundo termos, a atividade GTPase e a ligação à GTP, verificamos que essas funções compartilhavam as mesmas proteínas *reguladas* positivamente e também a maioria das proteínas *reguladas* de forma negativa.

Analisando quais proteínas se repetiam mais nesses termos, observamos que a proteína LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2* - gene: *Lrrk2* – acesso: F1LNJ1), uma proteína induzida pela DT, apareceu mais vezes em diferentes termos GO. Esta proteína foi encontrada em quatro processos PB: transdução de sinal mediada por GTPase, resposta ao estresse oxidativo, regulação da morte neuronal e endocitose. Além desses e de outros PB, a proteína LRRK2 foi associada com o comportamento de locomoção exploratória (Fonte: ParkinsonsUK-UCL: UniProt). Esta proteína foi encontrada em 7 termos CC, tais como, exossomo extracelular, axônio, citosol, membrana, projeção neurônio, citoplasma e corpo celular neuronal. Atividade GTPase, ligação ao GTP e ligante à actina são funções moleculares (FM), onde a proteína LRRK2 faz parte.

Com o intuito de entender as vias que foram afetadas pela DT, 91 proteínas do total de 183 proteínas diferentemente *reguladas* foram mapeadas e analisadas no banco de dados KEGG *Pathways* pela análise de enriquecimento no banco de dados DAVID. Essa análise revelou 18 vias de sinalização e metabólicas diferentes (**Tabela 9**), sendo que a maioria dessas foram representadas por proteínas *reguladas* negativamente pela DT (13 vias). Apenas três proteínas estavam *reguladas* positivamente e entre essas se encontra a

proteína GAD1 (*glutamate decarboxylase 1* - gene: Gad1 – acesso: C9E895), a qual foi encontrada em três vias.

Tabela 9 - Vias de sinalização e metabólicas enriquecidas pela análise KEGG pathways a partir de proteínas diferentemente reguladas pela deficiência de tiamina

KEGG Pathways			
Termos	Quantidade	%	Valor de p
Ciclo da vesícula sináptica	8	6	6,50E-06
Glicólise / Gliconeogênese	7	5.3	1,50E-04
Biossíntese de antibióticos	11	8.3	2,10E-04
Biossíntese de aminoácidos	7	5.3	3,80E-04
Fosforilação oxidativa	8	6	1,40E-03
Vias metabólicas	27	20.3	2,20E-03
Metabolismo de carbono	7	5.3	2,60E-03
Secreção ácida do ducto coletor	4	3	3,60E-03
Metabolismo de beta-Alanine	4	3	7,00E-03
Fagossomo	8	6	7,50E-03
Junção apertada ou oclusiva (<i>tight junctions</i>)	6	4.5	1,10E-02
Fagocitose mediada por receptor Fc gamma	5	3.8	1,70E-02
Endócrino e reabsorção de cálcio regulada por outros fatores	4	3	1,70E-02
Artrite reumatóide	5	3.8	1,90E-02
Via de sinalização de glucagom	5	3.8	2,90E-02
Metabolismo de glutatona	4	3	2,90E-02
Regulação de actina de citoesqueleto	7	5.3	4,10E-02
Metabolismo de butanoato	3	2.3	4,10E-02

Os termos KEGG pathways e suas respectivas proteínas estão detalhados no Anexo 16.

Entre as 18 vias detectadas usando o KEGG, o ciclo da vesícula sináptica foi mais afetado pela DT ($p < 0,05$), sendo que a mesma apresentou apenas proteínas *reguladas* negativamente: *complexin 2* (gene: Cplx2 – acesso: CPLX2); *dynamina 3* (gene: Dnm3 – acesso: DYN3); *adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit* (gene: Ap2m1 – acesso: AP2M1); *ATPase, H⁺ transporting, VI subunit F* (gene: Atp6v1f – acesso: VATF), *subunit H* (gene: Atp6v1h – acesso: A0A0G2K9J2), *subunit E1* (gene: Atp6v1e1 – acesso: VATE1), *subunit D* (gene: Atp6v1d – acesso: Q6P503) e *subunit B2* (gene: Atp6v1b2 – acesso: VATB2).

As vias glicólise / gliconeogênese, biossíntese de aminoácidos e metabolismo de carbono também foram afetadas pela DT e essas três vias compartilham as mesmas proteínas *sub reguladas*. As proteínas que fazem parte dessas vias são: *phosphofruktokinase 1, liver type and muscle* (gene: Pfk1 / Pfk2 – acesso: PFKAL /

PFKAM); *phosphoglycerate kinase 1* (gene: Pkg1 – acesso: PGK1); *phosphoglycerate mutase 1* (gene: Pgam – acesso: PGAM1); *gamma-enolase-like* (gene: LOC100911625 – acesso: ENOG); *mitochondrial-like enoyl-CoA hydratase* (gene: Echs1 – acesso: ECHM); *aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)* (gene: Aldh2 – acesso: ALDH2); *aldo-keto reductase family 1, member A1* (gene: Akr1a1 – acesso: AK1A1); *isocitrate dehydrogenase 3 (NAD) gamma* (gene: Idh3g – acesso: Q5XIJ3); *aminoacylase 1* (gene: Acyl – acesso: ACY1A).

4 Níveis de Glutamato e GABA no tálamo

Na **Figura 16**, painéis **A**, **B** e **C**, estão representadas as médias das concentrações de glutamato e GABA nas amostras de tálamo dos animais dos dois grupos experimentais e, a razão calculada entre esses dois neurotransmissores (n=6 para cada grupo).

Os resultados da análise pelo teste *t student* entre animais do grupo DTP e C, mostrou que não houve efeito significativo da DT sobre os níveis de glutamato [$t = 0,297$, $p=0,772$], de GABA [$t = 0,293$, $p=0,775$] e sobre a razão [glutamato]/[GABA] [$t = 0,66$, $p=0,522$].

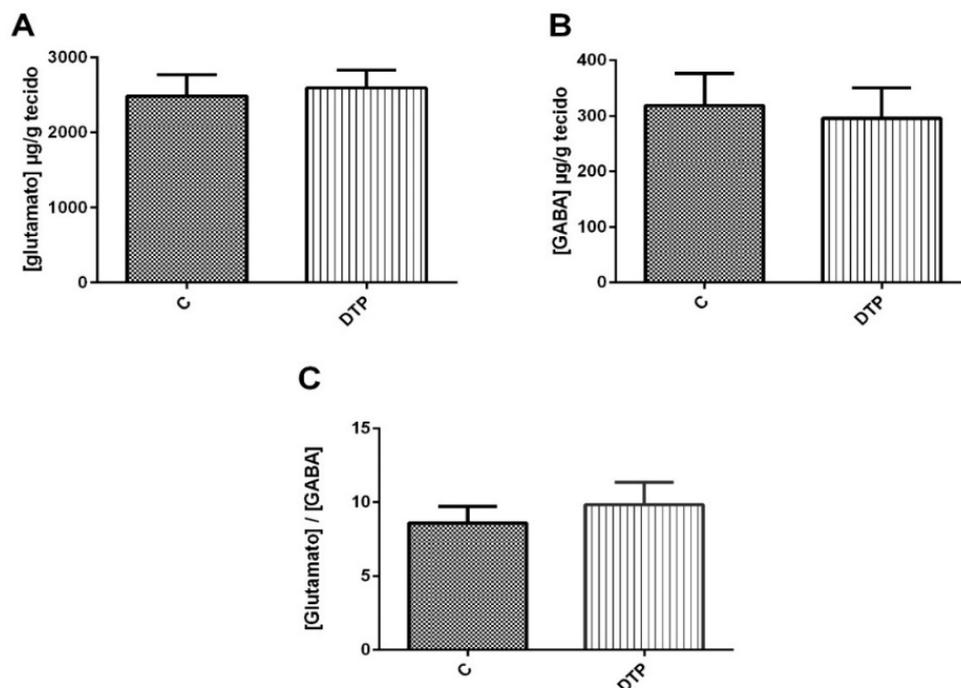


Figura 16 - Concentrações de Glutamato e GABA no tálamo de ratos Wistar dos dois grupos experimentais. Concentração média do grupo, para glutamato (painel A); GABA (painel B) e Razão [glutamato]/[GABA] (painel C). Os dados estão expressos como média ± erro padrão de cada grupo: controle (C - n=6) e deficiente de tiamina (DTP - n=6). As dosagens foram feitas em triplicatas. As concentrações médias de glutamato e GABA e os dados brutos da razão entre os neurotransmissores estão apresentados no Anexo 17.

5 Análise de regressão linear

Análises de *Regressão Linear* foram realizadas para avaliar a existência de possíveis correlações significativas entre os parâmetros bioquímicos e comportamentais. Foram avaliadas as relações entre a abundância das proteínas *desreguladas* pela DT – apenas aquelas abordadas na seção “Discussão” do presente trabalho –, níveis de GABA e de glutamato e parâmetros comportamentais. Os resultados de todas essas análises se encontram nos Anexos 18, 19 e 20.

Através das análises de regressão entre as concentrações de glutamato, GABA e razões entre os dois neurotransmissores, nas amostras de tálamo, e latência (s) para encontrar a plataforma em cada sessão do treino no LAM, foram verificadas correlações significativas entre: níveis de glutamato e latência dos animais controle na 2ª sessão no LAM [$r = 0,68$, $p = 0,041$]; níveis de GABA e latência dos animais controle na 2ª sessão no LAM [$r = 0,94$, $p = 0,004$]. Na **Figura 17, painéis A, B, C e D** estão representados os dados de glutamato no grupo C (**Painel A**) e no grupo DTP (**Painel B**) e os dados de GABA no grupo C (**Painel C**) e no grupo DTP (**Painel D**), em relação a latência para encontrar a plataforma na 2ª sessão do treino no LAM. As análises foram realizadas com um tamanho de amostra relativamente pequeno, não adequado para esse tipo de análise. Portanto, em vista disto, esses dados precisam ser repetidos para confirmação dos efeitos descritos aqui.

Não foram observadas correlações significativas entre as abundâncias de nenhuma proteína específica *desregulada* pela DT e o desempenho cognitivo dos animais durante o treino no LAM.

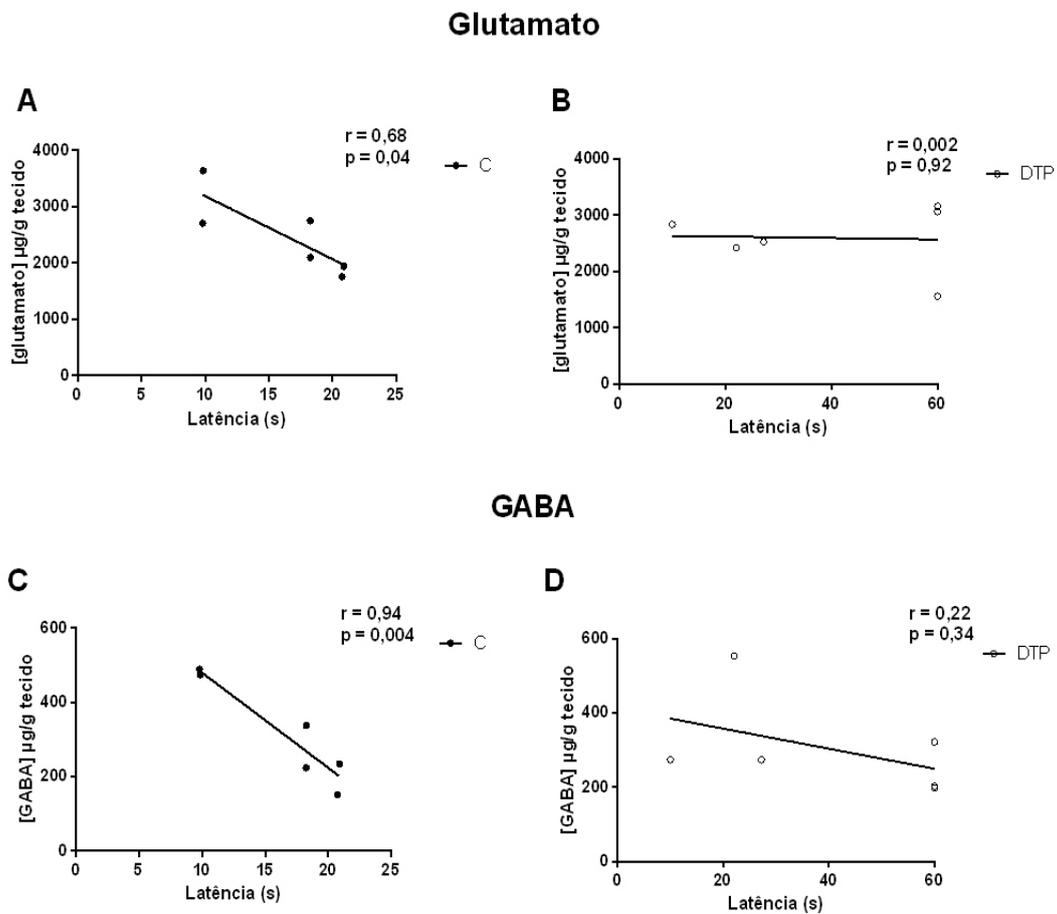


Figura 17 - Gráficos de Dispersão, mostrando as correlações entre as concentrações de glutamato e GABA e latência dos animais, C (n=6) e DTP (n=6), na 2ª sessão no LAM. Nos painéis A e B estão representadas as correlações para glutamato, respectivamente. Nos painéis C e D estão representadas as correlações para GABA, respectivamente. As análises foram realizadas usando os dados das concentrações de glutamato e GABA nas amostras de tálamo (µg/g de tecido) e o tempo (latência) que os animais gastaram para encontrar a plataforma durante a 2ª sessão do treino. Os resultados das análises de regressão estão apresentados no Anexo 18.

No presente estudo foram avaliados os efeitos **da deficiência de tiamina** sobre parâmetros comportamentais, sobre o proteoma e níveis de GABA e glutamato no tálamo. Os dados obtidos indicam que **a deficiência de tiamina** afeta os animais quanto: (a) à variação do peso corporal; (b) ao consumo de ração e água e; (c) o desempenho em tarefa cognitiva espacial. Além disso, os dados mostram que 183 proteínas talâmicas foram *desreguladas* pela **deficiência de tiamina**.

O modelo experimental animal de DT utilizado no presente trabalho, foi desenvolvido de acordo com Resende e cols. (2012), no qual os animais dos dois grupos experimentais receberam a mesma ração deficiente em tiamina, sendo que a única diferença entre os grupos deficiente e controle foi o tratamento com injeções *i.p.* de piritiamina (grupo DTP) e de tiamina (grupo C). Desta forma, a constituição da ração consumida por todos os animais foi exatamente a mesma, controlando-se melhor o método para a produção da ração. Esse modelo se mostrou adequado uma vez que os animais DTP apresentaram uma evolução sequencial de sinais clínicos, como perda de peso, perda de reflexo de endireitamento, ataxia e convulsões, exatamente como previsto pela nossa experiência em estudos realizados anteriormente pelo nosso (Pires *et al.*, 2005) e também por outros autores (Zhang *et al.*, 1995; Vigil *et al.*, 2010; Savage *et al.*, 2012).

Adicionalmente, nos nossos resultados observamos o efeito do episódio de DT e do tempo de tratamento sobre o ***peso corporal e consumo de ração e de água*** dos animais. Anorexia e perda de peso foram os primeiros sinais clínicos observados durante o episódio de DT e aconteceram entre o 10º e 15º dias de deficiência. Esses resultados estão de acordo com trabalhos realizados pelo nosso grupo (Pires *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2005) e por outros grupos de pesquisa (Mousseau *et al.*, 1996; Ciccia e Langlais, 2000; Vetreno *et al.*, 2011). Liu e cols. (2014) sugeriram que o consumo de ração e o peso corporal podem ser afetados pelo nível de tiamina no corpo e que a DT pode inibir a atividade da proteína cinase hipotalâmica, *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), com consequente indução de anorexia.

Depois de um período de recuperação de duas semanas, os animais DTP aparentavam estar clinicamente bem. Eles recuperaram o peso corporal e reiniciaram o consumo de ração e água em um nível semelhante ao de antes do episódio DT. No entanto,

sequelas cognitivas crônicas foram detectadas durante o teste cognitivo realizado no LAM. Os animais do grupo DTP mostraram pior desempenho em comparação com os animais C durante a 2ª e 3ª sessões de treinamento. No entanto, ao longo do processo de aprendizagem, nas sessões 4 e 5, os animais DTP atingiram um desempenho cognitivo similar ao dos animais C, indicando que eles foram capazes de melhorar o seu desempenho depois de tentativas repetidas. Um fenômeno similar de prejuízo no aprendizado e na recuperação da informação após o treinamento foi previamente descrita por nossa equipe (Carvalho *et al.*, 2006; Vigil *et al.*, 2010) e também por outros autores (Langlais *et al.*, 1992). No entanto, Vigil e cols. (2010) encontraram diferenças na 3ª e 4ª sessões, ou seja, um deslocamento de uma sessão em relação ao resultado obtido aqui. Se plotarmos os desempenhos utilizando todas as tentativas e não a média das medianas das 4 tentativas/dia, iremos perceber que em ambos os casos, o déficit acontece em fases intermediárias do processo de aprendizado, sendo a 3ª sessão, um ponto central. Apesar dessa pequena variação entre os resultados, nos quais os dois experimentos também tiveram um desenho um pouco diferente, em termos da duração do período de recuperação, ambos indicam exatamente o mesmo fenômeno, ou seja, uma possível maior susceptibilidade aos efeitos da DT em uma determinada fase do treino. E em ambos os casos a repetição da tarefa reverte o efeito. Interessante, que um fenômeno similar também foi observado em ratos idosos comparados com adultos. O processo de envelhecimento afeta o desempenho cognitivo espacial na 2ª sessão e se a tarefa é repetida, os idosos também são capazes de atingir desempenho similar ao dos adultos na última sessão do treino (Oliveira *et al.*, 2010). Uma hipótese que podemos levantar a partir desses dados é que a demanda neurobiológica é distinta durante as fases do processo de aprendizado.

Em relação a velocidade de nado dos animais, a mesma não foi afetada pela DT, reforçando os resultados de que o déficit no processo de aprendizado induzido pela DT, discutido acima, não é devido a um problema motor e sim à um prejuízo cognitivo. Esse achado é corroborado com o resultado da análise *post-hoc*, que mostrou que não há diferença entre a velocidade dos dois grupos em nenhuma das sessões do treino. Esses dados também estão de acordo com o obtido em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo, no qual utilizando-se um modelo experimental diferente, restrição de tiamina durante a lactação, observou-se efeito similar da restrição da tiamina sobre o desempenho cognitivo da prole, nos primeiros dias pós-lactação (De Freitas-Silva *et al.*, 2010). Esse efeito também foi reversível, não sendo mais detectado na prole adulta.

Adicionalmente, a memória espacial de referência dos ratos, avaliada pelo tempo de permanência no quadrante alvo e pela distância média ao alvo no primeiro minuto do teste comprobatório, não foi afetada pela DT. De uma certa forma, esse achado indica que a informação aprendida durante o treino - lembrando que os animais deficientes foram capazes de aprender com a repetição da tarefa - foi consolidada e recuperada, sem interferência do tratamento, durante o teste de memória. Ao avaliar a memória remota de ratos que passaram pela DT induzida por piritiamina, associada ou não ao consumo de etanol, nosso grupo verificou que esse tipo de memória foi afetada pelo consumo do etanol, mas não foi afetada pela DT (Pires *et al.*, 2005).

Em outro estudo, Vedder e cols. (2015) verificaram que aspectos cognitivos, como a memória espacial avaliada no teste de alternância espontânea, não foi afetada nos animais logo após nos primeiros estágios da DT. Esse estágio foi indicado pelo momento em que um grupo de animais DTP receberam injeções de tiamina dentro de 1h, logo após o sinal clínico opistótonos, sinal seguido de convulsão. Esses autores sugerem que esse tipo de tratamento, logo após o aparecimento do sinal que precede a convulsão - pode ser o limite para que a DT não prejudique o desempenho cognitivo.

Resumindo, verificamos que a memória e a extinção não foram afetadas pela DT o que indica que a DT prejudica o aprendizado, mas não a memória. A partir desses dados, levantamos as hipóteses que os substratos neurobiológicos dos três aspectos cognitivos espaciais podem ser distintos, porém o mais provável, é que durante o treino repetitivo as eventuais disfunções na memória também tenham se revertido.

Lesões cerebrais ou disfunções induzidas pela DT poderiam estar relacionadas com os efeitos no processo de aprendizagem espacial observado aqui. Ajustes neuroquímicos podem acontecer com o intuito de compensar insultos que afetam a cognição. Como observamos no estudo com modelo de restrição de tiamina durante a lactação e avaliação das consequências na prole (De Freitas-Silva *et al.*, 2010).

O hipocampo é considerado a principal região do cérebro associada com o desempenho cognitivo espacial (Morris *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 2013). No entanto, existem conexões entre o hipocampo e outras regiões do cérebro, tais como o tálamo (Aggleton e Brown, 1999). Existem evidências que diferentes regiões do tálamo contribuem com o

processo de aprendizagem e memória (Aggleton *et al.*, 2011; Savage *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2015).

Estudos utilizando modelo animal de DTP mostraram que os déficits de aprendizagem e memória podem ser resultados de danos nos núcleos talâmicos (Mair, 1994; Langlais e Savage, 1995; Langlais *et al.*, 1996; Savage *et al.*, 2011) levando a disfunções neuroquímicas nessa região, como por exemplo parâmetros GABAérgico, glutamatérgico (Héroux e Butterworth, 1988; Langlais *et al.*, 1988), serotoninérgicos (Langlais *et al.*, 1988; Vigil *et al.*, 2010), noradrenérgicos e dopaminérgicos (Mair *et al.*, 1985).

Além disso, em estudos anteriores os autores observaram que os níveis de acetilcolina no hipocampo e no córtex frontal são também afetados devido a lesões no tálamo de ratos DTP provocando, conseqüentemente, mudanças comportamentais nesses animais (Roland e Savage, 2009; Savage *et al.*, 2011; Savage, 2012). Em estudos prévios, nosso grupo de pesquisa encontrou resultados que apoiam os achados desses autores. Observamos que o prejuízo da neurotransmissão hipocampal está associado com déficits de aprendizagem e memória espacial associado à deficiência de tiamina (Pires *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2007).

Outros achados interessantes se referem aos efeitos da DT sobre componentes pré-sinápticos, envolvendo alterações em proteínas que são importantes no mecanismo da exocitose. Nossos resultados indicam que a deficiência de tiamina perturba as associações normais entre níveis de sinapsina I e sinapsina I fosforilada hipocampal e o desempenho em tarefa espacial dependente do hipocampo (Resende *et al.*, 2012). A sinapsina I é um componente importante na liberação de diferentes tipos de neurotransmissores (Song e Augustine, 2016). Além disso, usando eletroforese bidimensional (2DE-PAGE) seguida por análise de espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF, o nosso grupo mostrou alterações significativas, aumento ou diminuição, de sete proteínas do tálamo e uma delas foi identificada como sendo o VDAC (Bueno *et al.*, 2015).

No presente estudo, uma abordagem proteômica quantitativa livre de marcação foi realizada através da análise LC-MS/MS para investigar em mais detalhes o proteoma talâmico. Diferentemente de Bueno e cols. (2015), nós utilizamos uma técnica que não

necessita de separação em gel e sim separação por cromatografia líquida (LC) de ultra performance (UPLC). A combinação de LC com MS/MS permite a identificação de um maior número de proteínas dentro de misturas complexas, sendo considerada uma técnica de alta confiança e de alto desempenho (Pienaar *et al.*, 2008; Bayés e Grant, 2009).

Uma diferença entre as duas técnicas, ambas utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa (Bueno *et al.*, 2015 e no presente trabalho) se refere ao método de quantificação das proteínas. Na análise por 2DE-PAGE, a quantificação das proteínas ocorre em relação aos volumes de *spots* ou intensidades das proteínas, através da comparação entre os géis obtidos pela eletroforese bidimensional (Dowsey *et al.*, 2003). Diferentemente, a análise por LC-MS/MS fornece informações quantitativas das análises da abundância relativa de proteínas, a qual é calculada pela média da intensidade dos três peptídeos mais abundantes por proteína, sendo que a abundância é diretamente proporcional à quantidade da proteína na amostra analisada (Silva *et al.*, 2006; Distler *et al.*, 2016). Resumindo, as variáveis utilizadas nas análises estatísticas se diferem nos estudos, sendo que o primeiro utiliza a intensidade das proteínas obtidas pelo volume dos *spots*, enquanto que no segundo, utiliza a abundância das proteínas. Uma hipótese é que essa diferença na unidade de expressão dos níveis da proteína na amostra, poderia ser uma possível explicação para a diferença encontrada nos dois estudos. A proteína VDAC foi identificada nas amostras de tálamos dos grupos DTP e C nos dois estudos citados, sendo que no presente estudo ela foi identificada nas suas 3 isoformas. Porém, não verificamos diferença estatística entre os grupos DTP e C, ou seja, nas condições utilizadas no presente estudo, essa proteína não foi diferencialmente *regulada* pela DT.

A análise LC-MS/MS no presente estudo identificou um total de 2016 proteínas e, após o uso de filtros, 1440 proteínas foram mantidas. Desse total, 183 proteínas foram afetadas pela DT. Seguindo o critério de análise pelo valor de *fold change* (razão das abundâncias relativas do grupo DTP sobre a razão do grupo C), verificamos que 153 proteínas foram negativamente *reguladas* pela DT ($\text{fold change} < 2$) e as demais positivamente *reguladas*.

Análises de enriquecimento pelo GO agruparam as proteínas em categorias: Processos Biológicos (PB), Componente Celular (CC) e Função Molecular (FM). Dentre

a categoria de PB, a *regulação de morte celular* e o *estresse oxidativo* apareceram entre os 10 termos significativos.

O estresse oxidativo é considerado um dos mecanismos subjacentes ao processo de neurodegeneração mediada pela DT (Liu *et al.*, 2016), além de estar envolvido na progressão de outras doenças neurodegenerativas primárias, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Radi *et al.*, 2014; Cobb e Cole, 2015). Estudos utilizando modelos animal e celular da DT têm mostrado que a deficiência desta vitamina causa uma cascata de reações que aumentam espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo e morte neuronal (Todd e Butterworth, 1999; Hazell e Butterworth, 2009).

No presente trabalho, 7 proteínas *desreguladas* pela DT foram agrupadas como proteínas de resposta ao estresse oxidativo. Uma delas, a proteína antioxidante *glutathione peroxidase* (*glutathione peroxidase 1*- gene: Gpx1 – acesso: GPX1) foi *regulada* negativamente pela DT. Este resultado está em concordância com o relatado de Sharma e cols. (2013) que mostraram redução dessa e de outras proteínas antioxidantes no cérebro de animais DTP.

Mudanças nos níveis de proteínas que são consideradas marcadores do estresse oxidativo também foram vistas no cérebro de animais que passaram pela DT (Liu *et al.*, 2016). Investigando um desses marcadores, observamos nos dados obtidos no presente estudo, que a *ferritina* (*ferritin* – gene: LOC100362384 – acesso: M0R597) foi *regulada* positivamente pela DT. Calingasan e cols. (1998) verificaram um aumento dessa proteína na micróglia de camundongos submetidos à DT.

Além disto, outros estudos mostraram que o estresse oxidativo está envolvido com a neuroinflamação e observaram um aumento de citocinas pró inflamatórias em animais com DT (Hazell *et al.*, 2013). Dentre essas citocinas notamos que a *interleucina 4* (*interleukin 4* – gene Il4 – acesso: IL4) uma proteína pró inflamatória foi *regulada* positivamente nos tálamos dos animais DTP. A partir desses dados, levantamos a hipótese de que a DT causou alteração no sistema antioxidante no tálamo de animais DTP e, conseqüente, resultou em um aumento de citocinas pró inflamatórias, como um disparo de mecanismo de defesa.

Além da análise realizada a partir do GO como vimos anteriormente, foi avaliado o envolvimento das proteínas alteradas em relação à diversas vias metabólicas. Os resultados da análise proteômica obtidos através do KEGG *pathway*, indicaram que vias, tais como o *ciclo das vesículas sinápticas* (VS), foram significativamente afetadas pela DT. Este ciclo consiste na liberação de neurotransmissores por exocitose, sua recuperação por endocitose, preenchimento das vesículas, e nova liberação de neurotransmissores a partir do botão pré-sináptico (Purves e Lichtman, 1985; Sudhof, 2004). Esta via tem sido relacionada com o processo de neurodegeneração (Fernández-Chacón *et al.*, 2004; Burré *et al.*, 2010) uma vez que as proteínas e lipídeos que participam desse processo, ciclo das VS, têm sido associados com doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Huntington, Doença de Parkinson, e doença de Alzheimer (Scott *et al.*, 2010; Esposito *et al.*, 2012).

Figura 18 mostra um esquema dos passos do ciclo da vesícula sináptica, onde as proteínas afetadas pela DT estão destacadas com uma seta indicando que são proteínas *reguladas* negativamente. Estas proteínas são importantes para a manutenção do ciclo normal da vesícula sináptica funcional (Esposito *et al.*, 2012).

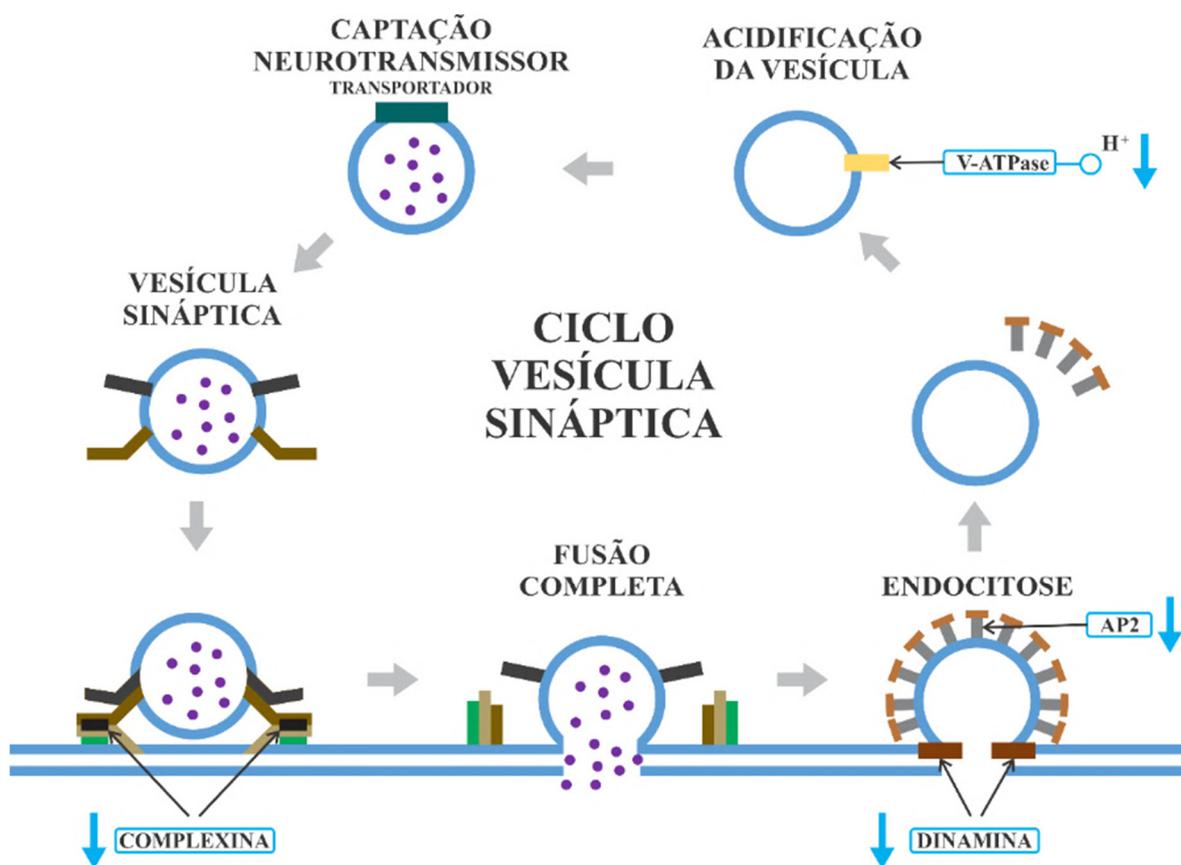


Figura 18 - Esquema do ciclo da vesícula sináptica e proteínas desreguladas pela DT. A Complexina, Dinamina, AP2 e V-ATPase (5 subunidades) são proteínas sub reguladas (setas para baixo) nos tálamos de ratos DTP.

As *complexinas* (CPLX) são pequenas proteínas citoplasmáticas localizadas no terminal pré-sináptico, onde interagem com um receptor conhecido como proteína de ligação do fator sensível à N-etilmaleimida solúvel (SNARE - do inglês *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachments receptors*), modulando a função desse complexo e o processo de fusão de vesículas. Portanto, CPLX tem um papel na liberação de neurotransmissores pela exocitose (Pabst *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Trimbuch e Rosenmund, 2016). No cérebro, há a presença de duas isoformas dessas proteínas, a complexina 1 (CPLX1) e a complexina 2 (CPLX2) (McMahon *et al.*, 1995).

Nossos resultados mostraram que a abundância da proteína CPLX2 (*complexin 2* - gene: Cplx2 – acesso: CPLX2_RAT) no tálamo de animais DTP foi 42% menor em relação aos animais C. Esse dado é similar aos resultados obtidos por Hazell e Wang (2005). Utilizando método imunohistoquímico, eles mostraram uma significativa diminuição (aproximadamente 45 %) no nível da CPLX2 no tálamo medial de animais DTP. Porém, quando utilizam um tratamento com antioxidante *N-Acetylcysteine* (NAC), verificaram que não houve a diminuição da CPLX2 no tálamo dos animais DTP, sugerindo que essa diminuição pode ser consequência do estresse oxidativo causado pela DT (Hazell e Wang, 2005). As CPLX1 e CPLX2 estão envolvidas em sinapses inibitórias e excitatórias, respectivamente (Hazell e Wang, 2005), e a desregulação na CPLX2 pode causar alteração na liberação de neurotransmissores, ativando ou inibindo a liberação de glutamato (Hazell e Butterworth, 2009). Essa diminuição da CPLX2 poderia representar um mecanismo compensatório para minimizar uma reação excitotoxicidade que muitas vezes ocorre nas primeiras fases de um processo neurodegenerativo.

Outras diferentes doenças neurológicas, tais como doença de Huntington (Morton *et al.*, 2001) e esquizofrenia (Harrison e Eastwood, 1998) possuem a expressão da CPLX2 alterada. Camundongos *knockout* (CPLX2 - / -) mostraram déficits na aprendizagem espacial no LAM e este déficit aumentou com a idade (Glynn *et al.*, 2003). Portanto, o presente resultado sobre os efeitos da DT na CPLX2 e na aprendizagem espacial são consistentes com os dados obtidos por esses autores, indicando que a diminuição da CPLX2 pode ter envolvimento com processo neurodegenerativo e déficits no aprendizado.

Após a exocitose, ainda no neurônio pré-sináptico, os componentes da VS são recuperados a partir da membrana plasmática e a VS é reciclada pelo processo de

endocitose (Rizzoli, 2014). Este processo necessita de várias proteínas para controlar a invaginação da membrana citoplasmática e para a formação da nova VS (Popova *et al.*, 2013). Entre estas proteínas, a **dinamina 3** (*dynamamin 3* - gene: Dnm3 - acesso: DYN3) e uma subunidade do **complexo adaptador AP2** (*adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit* - gene: Ap2m1 - acesso: AP2M1_RAT) foram *reguladas* de forma negativa pela DT.

A proteína AP2 é uma proteína adaptadora de clatrina e desempenha um papel na ligação de várias proteínas de vesículas de membranas (Saheki e De Camilli, 2012). A proteína dinamina (DYN) é uma GTPase e é recrutada para o local da endocitose onde atua no brotamento das vesículas (Doherty e McMahon, 2009; Haucke *et al.*, 2011).

Entre as proteínas da família da dinamina, a DYN3, *regulada* negativamente pela DT, é enriquecida no cérebro e tem sido implicada na endocitose nas espinhas dendríticas e no tráfico de receptores de neurotransmissores excitatórios (Gray *et al.*, 2003). Estudos anteriores mostraram que a DYN3 é *regulada* positivamente durante a sinaptogênese, sugerindo que esta isoforma é importante nos períodos de desenvolvimento de formação de sinapses (Gray *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2005). O efeito da DT nos níveis de DYN3 no tálamo é mais uma indicação de um componente sináptico afetado por esta deficiência de vitamina, que pode interferir com o processo de neurotransmissão e funcionamento de circuitos neuroquímicos.

Outras proteínas negativamente *reguladas* no tálamo de animais DTP foram as (**H+**) **V-ATPases**. Essas são bombas de prótons dependente de ATP que consistem de dois domínios que desempenham funções independentes: domínio periférico V₁ responsável pela hidrólise de ATP fazendo parte da VS e o domínio integral V₀ que age na exocitose dependente de SNARE, estando presente na membrana plasmática do neurônio pré-sináptico (Di Giovanni *et al.*, 2010; Vavassori e Mayer, 2014). O domínio V₁ é composto por 8 subunidades (Toei *et al.*, 2010). Entre essas subunidades, verificamos no presente trabalho que 5 foram *reguladas* negativamente pela DT: (a) **ATPase, H⁺ transporting, V1 subunit F** (gene: Atp6v1f – acesso: VATF); (b) **subunit H** (gene: Atp6v1h – acesso: A0A0G2K9J2), (c) **subunit E1** (gene: Atp6v1e1 – acesso: VATE1), (d) **subunit D** (gene: Atp6v1d – acesso: Q6P503) e (e) **subunit B2** (gene: Atp6v1b2 – acesso: VATB2).

As V-ATPases desempenham papéis importantes na acidificação do lúmen da VS e no carregamento do neurotransmissor para dentro da VS, mantendo um pH baixo dentro das vesículas, conferindo um gradiente de voltagem, além de produzir energia a partir da hidrólise de ATP (Forgac, 1992; El Far e Seagar, 2011). Estudos mostram que a perda da atividade da V-ATPase inibe o processo de autofagia, devido ao seu papel na manutenção do pH lisossomal (Chakraborti, 2016). A desregulação do processo de autofagia pode levar a uma atrofia neuronal e morte celular (Cherra e Chu, 2008) e acúmulo anormal de agregados proteicos resultando em doenças neurodegenerativas (Shibata *et al.*, 2006; Navone *et al.*, 2015). A possibilidade da DT afetar o funcionamento das (H⁺) V-ATPase pode causar a redução da acidificação das vesículas sinápticas e, conseqüentemente pode afetar o preenchimento dessas vesículas pelos neurotransmissores e sua liberação pela exocitose.

Uma proteína *regulada* positivamente pela DT é a **proteína LRRK2** (*leucine-rich repeat kinase 2* - gene: *Lrrk2* - acesso: F1LNJ1). Observamos o aparecimento dessa proteína em diferentes categorias do GO. Mutações nesta proteína têm sido encontradas nas formas hereditária e esporádica da patogênese da doença de Parkinson (DP) (Zimprich *et al.*, 2004; Paisán-Ruiz *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm mostrado que o gene *Lrrk2* desempenha um papel na neurotransmissão funcional (Arranz *et al.*, 2015), na neuroplasticidade (Beccano-Kelly *et al.*, 2014), no comportamento compulsivo de consumo de etanol (Da Silva E Silva *et al.*, 2016) e na atividade sináptica (Belluzzi *et al.*, 2016).

A elucidação da função biológica da proteína LRRK2 e seu papel na função sináptica tem sido alvo de estudo no modelo *Drosophila melanogaster* com mutação no gene *Lrrk*. Esses pesquisadores mostraram que a atividade cinase da LRRK2 regula a endocitose mediada por clatrina das vesículas sinápticas e, conseqüentemente, a neurotransmissão (Matta *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram relatados em animais *knockout* LRRK2, mostrando que a função da LRRK2 na transmissão sináptica é conservada em neurônios de mamíferos (Arranz *et al.*, 2015). De acordo com Beccano-Kelly e cols. (2014) a LRRK2 modula a função sináptica glutamatérgica. (Beccano-Kelly *et al.*, 2014; Cirnaru *et al.*, 2014).

Dados de outros estudos sugerem que a interação da LRRK2 com proteínas pré-sinápticas, incluindo Sintaxina 1A, Dinamina 1, Sinapsina 1, VAMP2, Actina e SNAP-25, regulam a fusão de VS na membrana pré-sináptica (Piccoli *et al.*, 2011; Piccoli *et al.*, 2014). Uma interação de LRKK2 com o fator sensível à N-etilmaleimida (NSF) também foi encontrada. Evidências recente mostraram que a fosforilação de NSF melhora a atividade ATPase e também tem um papel na fusão da vesícula sináptica pelas proteínas do complexo SNARE (Belluzzi *et al.*, 2016).

A supressão dessas proteínas importantes para o funcionamento do ciclo da VS são evidências do papel da DT sobre a liberação de neurotransmissores, como já visto em estudos com modelo de DTP, o que pode ser uma das possíveis explicações para o prejuízo cognitivo dos animais DTP. Como esses efeitos são bastante específicos, não poderiam ser explicados simplesmente por uma baixa no metabolismo energético, pela ausência dos cofatores derivados da tiamina. A partir deles, podemos levantar uma hipótese de que a tiamina desempenha um papel importante nessas células, além da função de precursora de coenzimas fosfatadas.

Resende e cols. (2012) verificaram alteração na proteína sinapsina I no hipocampo de ratos DTP e sugerem que a DT interrompe uma relação significativa entre os níveis de sinapsina I (fosforilada e não fosforilada) e aprendizagem espacial existente em ratos controle. Verificando se essa mesma proteína estava alterada no proteoma talâmico dos animais DTP no presente estudo, observamos que uma isoforma dessa proteína, a **SYN3** (*synapsin 3* - gene: *Syn3* - acesso: A0A096MIT7) foi *regulada* positivamente pela DT. Porém, a função dessa isoforma é pouco caracterizada. Estudos mostraram que essa fosfoproteína está expressa no início do desenvolvimento neuronal (Ferreira *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2002) e está relacionada com doenças do neurodesenvolvimento como a esquizofrenia (Chen *et al.*, 2009). Por outro lado, a superexpressão do gene *Syn3* afeta a migração neuronal no córtex (Perlini *et al.*, 2015).

Além do ciclo da vesícula sináptica, proteínas de *outras vias metabólicas* também foram significativamente afetadas pela DT (vias obtidas pela análise a partir do KEGG).

No cérebro e demais tecidos, a tiamina difosfato é importante no metabolismo de carboidratos e lipídios. Além disso, essa forma ativa participa na produção de

neurotransmissores derivados de glicose, tais como a acetilcolina (ACh) e GABA (Butterworth *et al.*, 1986). O baixo nível de tiamina no cérebro humano afeta a atividade de enzimas dependentes de tiamina (transcetolase, complexo piruvato desidrogenase e complexo desidrogenase α -cetogluturato) levando a danos no cérebro, alterações no metabolismo oxidativo, na atividade mitocondrial e na produção de energia (Thomson *et al.*, 2012). Em outros estudos usando ratos deficientes de tiamina, os autores mostraram que as atividades de enzimas dependentes de tiamina podem ser afetadas (Gibson *et al.*, 1984; Butterworth *et al.*, 1986; Sheu *et al.*, 1998). Entretanto, eles não mediram o efeito nas suas concentrações. Sheu *et al.* (1998) mostraram que DT não afetou o nível de proteína do complexo desidrogenase α -cetogluturato, mas a sua atividade foi diminuída no tálamo e no colículo inferior do cérebro de ratos deficientes.

Nós verificamos que enzimas não dependentes de tiamina foram *desreguladas* no tálamo de animais que passaram pelo episódio de DT e, essas enzimas foram agrupadas pelo KEGG nas vias da glicólise / gliconeogênese, biossíntese de aminoácidos e vias metabólicas em geral (**Figura 19**).

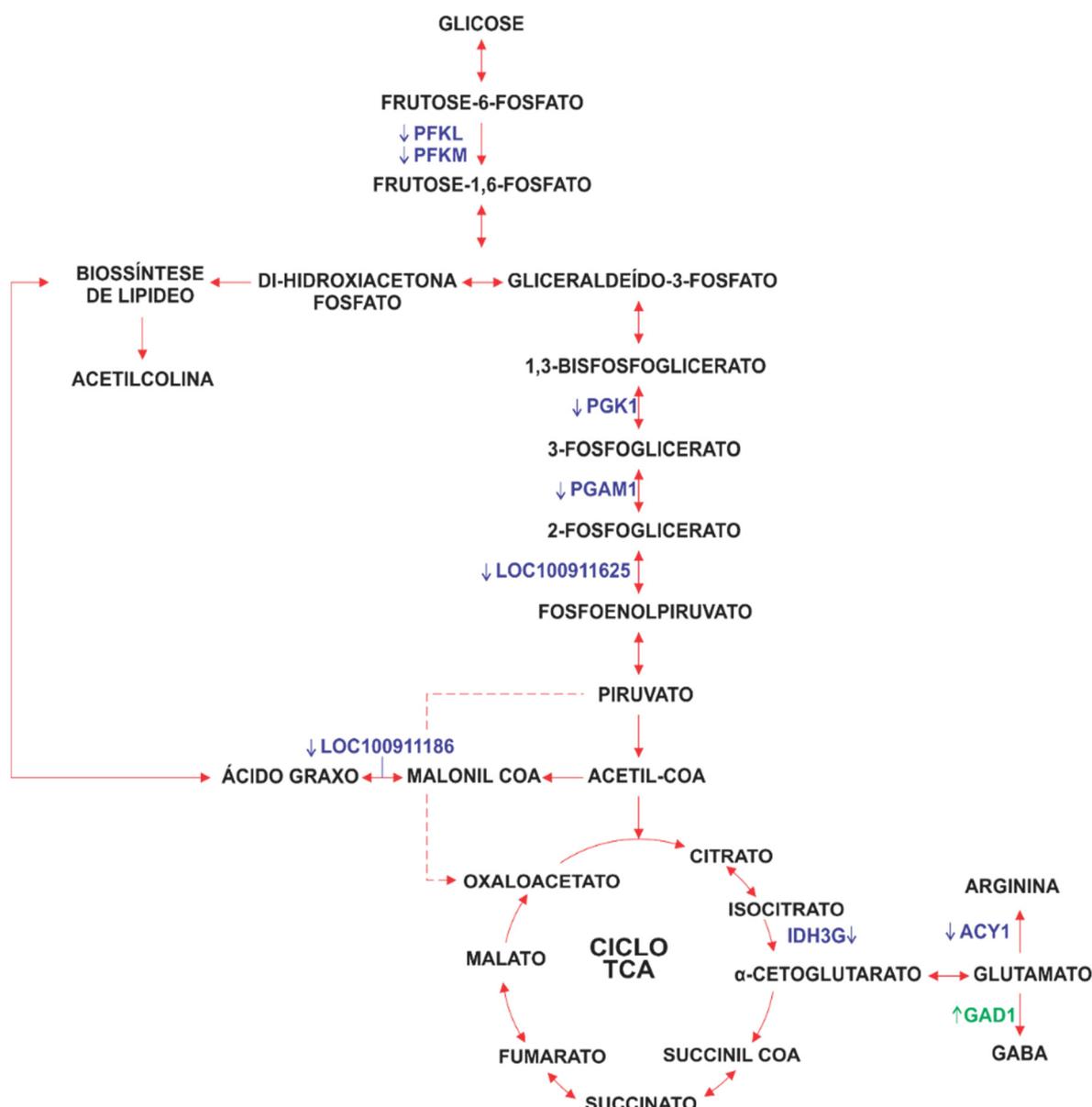


Figura 19 - Regulação de proteínas associadas ao metabolismo energético. Enzimas desreguladas pela DT estão identificadas nas cores azul e verde, representando reguladas de forma negativa e positiva, respectivamente.

Quatro enzimas não tiamina-dependentes do metabolismo da glicose foram reguladas negativamente nos tálamos de animais DTP. A **Fosfofrutoquinase 1** (*phosphofructokinase, liver type / phosphofructokinase, muscle* - gene: Pfk1 / PfkM - acesso: PFKAL / PFKAM) gera a frutose-1,6-difosfato a partir da frutose-6-fosfato. Esta é uma enzima chave na regulação da via glicolítica, porque sob condições fisiológicas, esta reação é irreversível e envolve a hidrólise de ATP (Murray *et al.*, 2014). A supressão dessa enzima poderia afetar a formação da frutose-1,6-difosfato e gliceraldeído-3-fosfato e, conseqüentemente, a biossíntese de lipídios. Uma vez que a biossíntese de lipídios é afetada, a conseqüência é a diminuição da neurotransmissão pelos danos na produção de

neurotransmissor, ex. ACh. Vários estudos mostraram disfunção no sistema colinérgico em diferentes tipos de amostra cerebral, como homogenato (Heinrich *et al.*, 1973; Vorhees *et al.*, 1978; Gibson *et al.*, 1984), hipocampo (Savage *et al.*, 2003; Roland e Savage, 2007; Savage *et al.*, 2007; Roland *et al.*, 2008; Vetreno *et al.*, 2008; Anzalone *et al.*, 2010) e córtex (Arendt *et al.*, 1983; Pires *et al.*, 2005; Anzalone *et al.*, 2010; Savage, 2012) de ratos expostos a um tratamento de DT. Esses dados sugerem que disfunções colinérgicas também estão relacionadas com a deterioração cognitiva e, os níveis de ACh em regiões corticais são dependentes da função do tálamo (Savage, 2012; Savage *et al.*, 2012).

Outra enzima afetada é a **Fosfoglicerato quinase 1** (*phosphoglycerate kinase 1* - gene: *Pgk1* - acesso: PGK1,) que catalisa a conversão de 1,3-bisfosfoglicerato para 3-fosfoglicerato, gerando ATP na via glicolítica (Murray *et al.*, 2014). Junto com outras enzimas também afetadas, como a **Fosfoglicerato mutase 1** (*phosphoglycerate mutase 1* - gene: *Pgam* - acesso: PGAM1) e **Gama-enolase** (*gamma-enolase-like* - gene: *LOC100911625* - acesso: ENOG), a diminuição de PGK1 poderia prejudicar a produção de piruvato. Piruvato é um importante precursor de Acetil-CoA, que por sua vez é essencial para síntese de ACh (Murray *et al.*, 2014). Em estudos utilizando sinaptossomas provenientes de animais que passaram pela DTP, Jankowska e cols. (2010) verificaram alterações na liberação de ACh não quantal e na liberação de ACh quantal nas amostras DTP. Eles sugeriram que essas alterações podem ter ocorrido devido a inibição nas produções de acetil-CoA e de citrato.

A biossíntese do ácido graxo é controlada pela Malonil-CoA que é produzida a partir da carboxilação do Acetil-CoA (Nelson e Cox, 2011). Malonil-CoA é o substrato para uma enzima regulada negativamente pela DT, a **Enoil-CoA hidratase** (*mitochondrial-like enoyl-CoA hydratase* - gene: *LOC100911186* - acesso: ECHM).

Portanto, efeitos da DT sobre os níveis de Acetil-CoA, pela baixa de piruvato, e sobre a Enoil-CoA, podem também afetar outras vias metabólicas como a biossíntese de lipídeos. Danos na produção de ácidos graxos pela DT, através da supressão dessas enzimas ou pela perda de atividade da piruvato desidrogenase - enzima dependente de B1- pode prejudicar a produção de mielina e acarretar uma disfunção na excitabilidade neuronal (Martin *et al.*, 2003).

Como observado na **Figura 19** a **Isocitrato Desidrogenase 3** (*isocitrate dehydrogenase 3 (NAD)*- gene: *Idh3g* - acesso: Q5XIJ3) foi *regulada* negativamente nos tálamos DTP, o que poderia afetar a conversão de citrato para α -cetoglutarato, um precursor do neurotransmissor glutamato. A diminuição dos níveis de glutamato poderia exarcebar as disfunções, descritas acima, em algumas proteínas envolvidas no ciclo da VS.

Além disso, a DT *regula* de forma negativa e positiva, respectivamente, a **Aminocilase 1** (*aminoacylase 1*- gene: *Acyl* - acesso: ACY1A) e a **Glutamato descarboxilase 1** (*glutamate decarboxylase 1* - gene: *Gad1* - acesso: C9E895) que catalisa a produção de GABA a partir do glutamato. Os resultados dessas alterações podem ser interpretados como a ocorrência de uma demanda na produção de GABA de forma a funcionar como um mecanismo compensatório de equilíbrio na rede neuronal talâmica, afetada pela DT.

Importante considerar que a caracterização e validação das proteínas identificadas pela análise proteômica realizada no presente estudo, devem ser realizadas em estudos futuros com foco específico nos alvos apresentados aqui, usando outras técnicas e estratégias de estudos, como por exemplo, uma abordagem imunohistoquímica.

O equilíbrio entre o glutamato e o GABA é importante para manter condições fisiológicas de funções cognitivas, tais como a aprendizagem e a memória (Zhao *et al.*, 2005; Foster e Kemp, 2006). Interessante considerar esse fato em relação aos resultados do estudo comportamental apresentados no presente trabalho, o qual mostrou que no final das sessões de treino os animais DTP foram capazes de aprender a tarefa. No entanto, os ratos DTP mostraram um desempenho pior do que os animais C durante o processo. Isso poderia ser explicado pela ocorrência de um desequilíbrio entre os dois neurotransmissores, glutamato e GABA, induzido pela DT, que seria revertido nas sessões finais do treino, pela repetição da execução da tarefa. Estudos anteriores demonstraram reduções nos níveis de GABA no tálamo de ratos DTP mesmo após um período de recuperação de DT (Héroux e Butterworth, 1988; Langlais *et al.*, 1988). Além disso, o nosso grupo (Sena, 2015) mostrou que os desempenhos de aprendizagem espacial de camundongos são dependentes do aumento de níveis de GABA hipocampal ao longo das cinco sessões, indicando que circuitos GABAérgicos podem ter um papel neste processo.

Para tentar responder as hipóteses acima de que os níveis de glutamato e GABA poderiam estar afetados pela DT, avaliamos as concentrações desses neurotransmissores nos tálamos dos animais dos grupos DTP e C. Verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos, tanto para os níveis de glutamato como para GABA e, portanto, sem alteração da taxa entre Glutamato/GABA. Esse achado estaria de acordo com a hipótese de que o treino repetido poderia reverter os efeitos da DT. Como os níveis dos neurotransmissores foram medidos em amostras do cérebro dos animais mortos depois do período de recuperação e dos testes comportamentais, essa hipótese não pode ser descartada. Para responder essa questão, as medidas deveriam ser realizadas após cada sessão do treino, durante todas as etapas do processo de aprendizado. No entanto, consideramos que os experimentos realizados para avaliar os efeitos da DT sobre os níveis de GABA e glutamato devem ser repetidos para confirmar esses achados. Para a realização dessas dosagens, utilizamos amostras de tálamos que foram retiradas de hemisférios cerebrais já congelados em uma matriz para seccionamento criostático, o meio Tissue Tek (Sakura). Existe a possibilidade do meio *Tissue tek* ter afetado. No entanto, os níveis de GABA e glutamato no tálamo dos animais C do presente estudo, estão de acordo com a literatura, favorecendo o descarte desta última explicação.

A análise de regressão linear mostrou a existência de correlação significativa entre os níveis de GABA e de glutamato e o desempenho dos animais na 2ª sessão do LAM, apenas para os animais do grupo C. A DT parece romper com essa correlação. A correlação observada entre os dados obtidos dos tálamos controles foi negativa, ou seja, quanto melhor o desempenho do animal, maior os níveis desses neurotransmissores. Esse dado poderia sugerir que para resolver uma tarefa em menor tempo, há um aumento nos níveis de GABA e de glutamato no tálamo, mantendo um equilíbrio regulatório neurobiológico necessário nas funções cognitivas. Esse mecanismo pode ter sido afetado pela DT. Esse achado e essa hipótese estão de acordo com os dados obtidos pelo nosso grupo, usando camundongos controles, que mostraram que o processo de aprendizado espacial implica em um aumento nos níveis de GABA (Sena, 2015).

O modelo experimental de DTP utilizado no presente trabalho foi adequado, apresentando a mesma sequência de evolução dos sinais clínicos descrita na literatura.

Mesmo após o período de recuperação dos animais, com reposição de tiamina, os mesmos apresentaram prejuízos cognitivos durante o processo de aprendizagem, indicando que a deficiência causa efeitos crônicos no cérebro.

A repetição de uma mesma tarefa cognitiva espacial foi capaz de reverter déficits no desempenho dos animais, indicando que a aquisição repetitiva da informação pode alterar a função neuronal.

No presente estudo, usando análises de proteômica, demonstramos pela primeira vez que centenas de proteínas talâmicas são afetadas pelo episódio de DT e representam potenciais componentes moleculares associados aos efeitos crônicos da DT. Cada uma dessas proteínas representa um alvo importante a ser considerado em estudos futuros.

Não somente enzimas dependentes de fosfotiamina como cofator são afetadas pela deficiência, indicando efeitos específicos da tiamina e/ou seus ésteres fosforilados sobre outros componentes enzimáticos. Em uma via metabólica, como por exemplo, síntese de ácidos graxos, apenas algumas enzimas são afetadas e outras preservadas.

A *desregulação* de proteínas antioxidantes e pró-inflamatórias no tálamo de animais DT reforça a hipótese de que o estresse oxidativo e a neuroinflamação são mecanismos induzidos pela DT, sendo esse último um provável mecanismo de defesa compensatório.

Os efeitos da DT sobre o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), obtidos pelo nosso grupo em estudo anterior, não foram aqui confirmados, usando as condições de processamento da amostra e análise por LC-MS/MS.

Outra conclusão interessante é que os efeitos da DT sobre a liberação de neurotransmissores, como observado em estudos prévios, pode ser o reflexo do comprometimento de componentes do ciclo de renovação de VS, incluindo exocitose e endocitose. Além disto, alguns dos alvos da DT estão indiretamente envolvidos na síntese

de glutamato e GABA. O equilíbrio entre funções que envolvem esses dois neurotransmissores pode ser uma demanda para a aquisição de informações vista nos estágios finais do treino.

Finalmente, os dados obtidos abrem várias portas de possibilidades, destacando formas moleculares para futuros estudos com foco em alvos e potenciais sistemas bioquímicos envolvidos em déficits cognitivos espaciais e processo neurodegenerativo induzido pela DT. Os resultados também indicam a complexidade destes fenômenos e da importância de uma abordagem interdisciplinar para identificar a relação entre eles.

- ABDOU, E.; HAZELL, A. S. Thiamine deficiency: an update of pathophysiologic mechanisms and future therapeutic considerations. **Neurochem Res**, v. 40, n. 2, p. 353-61, Feb 2015. ISSN 1573-6903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25297573> >.
- ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current opinion in neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 180-187, 2001. ISSN 0959-4388.
- ABERLE, N. S. et al. Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not by vitamins B6 or B12. **Alcohol and Alcoholism**, v. 39, n. 5, p. 450-454, 2004. ISSN 0735-0414.
- ABROUS, D. N.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiological reviews**, v. 85, n. 2, p. 523-569, 2005. ISSN 0031-9333.
- ACKERMANN, B. L. et al. Current applications of liquid chromatography/mass spectrometry in pharmaceutical discovery after a decade of innovation. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 1, p. 357-396, 2008. ISSN 1936-1327.
- AGGLETON, J. P.; BROWN, M. W. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. **Behav Brain Sci**, v. 22, n. 3, p. 425-44; discussion 444-89, Jun 1999. ISSN 0140-525X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301518> >.
- AGGLETON, J. P.; DUMONT, J. R.; WARBURTON, E. C. Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: a review. **Learn Mem**, v. 18, n. 6, p. 384-400, Jun 2011. ISSN 1549-5485. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21597044> >.
- AIKAWA, H. et al. Low energy levels in thiamine-deficient encephalopathy. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 43, n. 3, p. 276-87, May 1984. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6726285> >.
- ALCAIDE, M. L. et al. Wernicke's encephalopathy in AIDS: a preventable cause of fatal neurological deficit. **Int J STD AIDS**, v. 14, n. 10, p. 712-3, Oct 2003. ISSN 0956-4624. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14596777> >.
- AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Progress in brain research**, v. 163, p. 3-790, 2007. ISSN 0079-6123.
- ANDRADE, P. R. **Níveis de GABA e Glutamato Centrais e Aspectos Cognitivos em Modelo Experimental de Deficiência Grave de Tiamina**. 2011. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Neurociências. , Universidade Federal de Minas Gerais
- ANZALONE, S. et al. Cortical cholinergic abnormalities contribute to the amnesic state induced by pyridoxamine-induced thiamine deficiency in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 32, n. 5, p. 847-58, Sep 2010. ISSN 1460-9568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20726882> >.
- ARENDDT, T. et al. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. **Acta Neuropathol**, v. 61, n. 2, p. 101-8, 1983. ISSN 0001-6322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6637393> >.
- ARRANZ, A. M. et al. LRRK2 functions in synaptic vesicle endocytosis through a kinase-dependent mechanism. **J Cell Sci**, v. 128, n. 3, p. 541-52, Feb 2015. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25501810> >.

BADDELEY, A. D.; WARRINGTON, E. K. Amnesia and the distinction between long-and short-term memory. **Journal of verbal learning and verbal behavior**, v. 9, n. 2, p. 176-189, 1970. ISSN 0022-5371.

BAKER, H. et al. Vitamin profile of 563 gravidas during trimesters of pregnancy. **J Am Coll Nutr**, v. 21, n. 1, p. 33-7, Feb 2002. ISSN 0731-5724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11838885> >.

BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 4, p. 1017-1031, 2007. ISSN 1618-2642.

BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 93, n. 1, p. 74, 1979. ISSN 0021-9940.

BAYÉS, A.; GRANT, S. G. Neuroproteomics: understanding the molecular organization and complexity of the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 635-646, 2009. ISSN 1471-003X.

BECCANO-KELLY, D. A. et al. Synaptic function is modulated by LRRK2 and glutamate release is increased in cortical neurons of G2019S LRRK2 knock-in mice. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 301, 2014. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309331> >.

BELLUZZI, E. et al. LRRK2 phosphorylates pre-synaptic N-ethylmaleimide sensitive fusion (NSF) protein enhancing its ATPase activity and SNARE complex disassembling rate. **Mol Neurodegener**, v. 11, p. 1, 2016. ISSN 1750-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26758690> >.

BERG, J. M.; L., T. J.; L., S. **Biochemistry**. New York: 2004.

BETTENDORFF, L. et al. Metabolism of thiamine triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. **J Neurochem**, v. 60, n. 2, p. 423-34, Feb 1993. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380431> >.

BETTENDORFF, L.; WINS, P.; LESOURD, M. Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1222, n. 1, p. 1-6, 1994. ISSN 0167-4889.

BOSCH-BOUJU, C.; HYLAND, B. I.; PARR-BROWNLIE, L. C. Motor thalamus integration of cortical, cerebellar and basal ganglia information: implications for normal and parkinsonian conditions. **Frontiers in Computational Neuroscience**, 2013. ISSN 1662-5188.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BUENO, K. O. et al. Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome are related to changes in thalamic VDAC protein concentrations. **Neuroscience**, v. 294, p. 29-37, May 2015. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25766938> >.

BURRÉ, J. et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. **Science**, v. 329, n. 5999, p. 1663-7, Sep 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798282> >.

BUTTERWORTH, R. F. Effects of thiamine deficiency on brain metabolism: implications for the pathogenesis of the Wernicke-Korsakoff syndrome. **Alcohol Alcohol**, v. 24, n. 4, p. 271-9, 1989. ISSN 0735-0414. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2675860> >.

_____. Thiamin deficiency and brain disorders. **Nutr Res Rev**, v. 16, n. 2, p. 277-84, Dec 2003. ISSN 1475-2700. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19087395> >.

BUTTERWORTH, R. F. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. **Metab Brain Dis**, v. 24, n. 1, p. 189-96, Mar 2009. ISSN 0885-7490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19067139> >.

BUTTERWORTH, R. F.; GIGUÈRE, J. F.; BESNARD, A. M. Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy. 2. alpha-Ketoglutarate dehydrogenase. **Neurochem Res**, v. 11, n. 4, p. 567-77, Apr 1986. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3724963> >.

BUTTERWORTH, R. F. et al. Amino acid changes in thiamine-deficient encephalopathy: some implications for the pathogenesis of Friedreich's ataxia. **Can J Neurol Sci**, v. 6, n. 2, p. 217-22, May 1979. ISSN 0317-1671. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/487314> >.

BUTTERWORTH, R. F.; KRIL, J. J.; HARPER, C. G. Thiamine-Dependent Enzyme Changes in the Brains of Alcoholics: Relationship to the Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 17, n. 5, p. 1084-1088, 1993. ISSN 1530-0277.

CALINGASAN, N. Y. et al. Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. **Am J Pathol**, v. 153, n. 2, p. 599-610, Aug 1998. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9708819> >.

CARVALHO, F. M. et al. Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 4, p. 481-9, Apr 2006. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687165> >.

CATANIA, A. Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição (DG Souza, Trad.). **Porto Alegre: Artmed.(Trabalho original publicado em 1998)**, 1999.

CHAKRABORTI, S. D., NARANJAN S. **Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases**. Springer International Publishing, 2016. 586 ISBN 978-3-319-24780-9.

CHAPMAN, J. D.; GOODLETT, D. R.; MASSELON, C. D. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. **Mass spectrometry reviews**, v. 33, n. 6, p. 452-470, 2014. ISSN 1098-2787.

CHELIUS, D.; BONDARENKO, P. V. Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. **J Proteome Res**, v. 1, n. 4, p. 317-23, 2002 Jul-Aug 2002. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645887> >.

CHEN, Q. et al. Association and expression study of synapsin III and schizophrenia. **Neurosci Lett**, v. 465, n. 3, p. 248-51, Nov 2009. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766700> >.

- CHEN, X. et al. Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. **Neuron**, v. 33, n. 3, p. 397-409, Jan 2002. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832227> >.
- CHERRA, S. J.; CHU, C. T. Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. **Future Neurol**, v. 3, n. 3, p. 309-323, May 2008. ISSN 1479-6708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806889> >.
- CICCIA, R. M.; LANGLAIS, P. J. An examination of the synergistic interaction of ethanol and thiamine deficiency in the development of neurological signs and long-term cognitive and memory impairments. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 24, n. 5, p. 622-34, May 2000. ISSN 0145-6008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832903> >.
- CIRNARU, M. D. et al. LRRK2 kinase activity regulates synaptic vesicle trafficking and neurotransmitter release through modulation of LRRK2 macro-molecular complex. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 49, 2014. ISSN 1662-5099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24904275> >.
- COBB, C. A.; COLE, M. P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. **Neurobiol Dis**, v. 84, p. 4-21, Dec 2015. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024962> >.
- COSTANTINI, A. et al. Long-term treatment with high-dose thiamine in Parkinson disease: an open-label pilot study. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 21, n. 12, p. 740-747, 2015. ISSN 1075-5535.
- CRUIKSHANK, S. J. et al. Thalamic control of layer 1 circuits in prefrontal cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 49, p. 17813-17823, 2012. ISSN 0270-6474.
- CZERNIECKI, J. et al. Neuronal localization of the 25-kDa specific thiamine triphosphatase in rodent brain. **Neuroscience**, v. 125, n. 4, p. 833-840, 2004. ISSN 0306-4522.
- DA SILVA E SILVA, D. A. et al. Inflexible ethanol intake: A putative link with the Lrrk2 pathway. **Behav Brain Res**, v. 313, p. 30-7, Oct 2016. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27411784> >.
- DATTA, A. et al. Quantitative neuroproteomics of an in vivo rodent model of focal cerebral ischemia/reperfusion injury reveals a temporal regulation of novel pathophysiological molecular markers. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 11, p. 5199-5213, 2011. ISSN 1535-3893.
- DE FREITAS SILVA, D. M.; FERRAZ, V. P.; RIBEIRO, A. M. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. **J Neurosci Methods**, v. 177, n. 2, p. 289-93, Mar 2009. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007814> >.
- DE FREITAS-SILVA, D. M. et al. Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring. **Behav Brain Res**, v. 211, n. 1, p. 33-40, Jul 2010. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211656> >.
- DE FÁTIMA OLIVEIRA-SILVA, I. et al. Mild thiamine deficiency and chronic ethanol consumption modulate acetylcholinesterase activity change and spatial memory performance in a water maze task. **J Mol Neurosci**, v. 55, n. 1, p. 217-26, Jan 2015. ISSN 1559-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770900> >.

- DE HOOG, C. L.; MANN, M. Proteomics. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 5, p. 267-93, 2004. ISSN 1527-8204. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485350> >.
- DI GIOVANNI, J. et al. V-ATPase membrane sector associates with synaptobrevin to modulate neurotransmitter release. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 268-79, Jul 2010. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20670834> >.
- DICKERSON, B. C.; EICHENBAUM, H. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 86-104, 2010. ISSN 0893-133X.
- DISTLER, U. et al. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. **Nature protocols**, v. 11, n. 4, p. 795-812, 2016. ISSN 1754-2189.
- DISTLER, U.; KUHAREV, J.; TENZER, S. Biomedical applications of ion mobility-enhanced data-independent acquisition-based label-free quantitative proteomics. **Expert review of proteomics**, v. 11, n. 6, p. 675-684, 2014. ISSN 1478-9450.
- DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p. 857-902, 2009. ISSN 1545-4509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19317650> >.
- DOWSEY, A. W.; DUNN, M. J.; YANG, G. Z. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 3, n. 8, p. 1567-96, Aug 2003. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12923783> >.
- DOYLE, K. M. et al. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 10, p. 2025-39, Oct 2011. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722302> >.
- DROR, V. et al. Rasagiline prevents neurodegeneration in thiamine deficient rats-a longitudinal MRI study. **Brain Res**, v. 1557, p. 43-54, Apr 2014. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24525144> >.
- D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain research reviews**, v. 36, n. 1, p. 60-90, 2001. ISSN 0165-0173.
- EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 109-120, 2004. ISSN 0896-6273.
- EISENKRAEMER, R. E. Nas cercanias das falsas memórias. **Ciências & Cognição**, v. 9, p. 97-110, 2006. ISSN 1806-5821.
- EL FAR, O.; SEAGAR, M. A role for V-ATPase subunits in synaptic vesicle fusion? **J Neurochem**, v. 117, n. 4, p. 603-12, May 2011. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21375531> >.
- ENGELBORGHES, S. et al. Functional anatomy, vascularisation and pathology of the human thalamus. **Acta Neurol Belg**, v. 98, n. 3, p. 252-65, Sep 1998. ISSN 0300-9009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801706> >.
- ESPOSITO, G.; ANA CLARA, F.; VERSTREKEN, P. Synaptic vesicle trafficking and Parkinson's disease. **Dev Neurobiol**, v. 72, n. 1, p. 134-44, Jan 2012. ISSN 1932-846X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21563316> >.

FARAH, M. J. Is visual imagery really visual? Overlooked evidence from neuropsychology. **Psychological review**, v. 95, n. 3, p. 307, 1988. ISSN 1939-1471.

FENG, J. et al. Regulation of neurotransmitter release by synapsin III. **J Neurosci**, v. 22, n. 11, p. 4372-80, Jun 2002. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040043> >.

FERNÁNDEZ-CHACÓN, R. et al. The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. **Neuron**, v. 42, n. 2, p. 237-51, Apr 2004. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15091340> >.

FERREIRA, A. et al. Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation. **J Neurosci**, v. 20, n. 10, p. 3736-44, May 2000. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10804215> >.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. Perinatal thiamine restriction affects central GABA and glutamate concentrations and motor behavior of adult rat offspring. **Neurosci Lett**, v. 617, p. 182-7, Mar 2016. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26836141> >.

FORGAC, M. Structure, function and regulation of the coated vesicle V-ATPase. **J Exp Biol**, v. 172, p. 155-69, Nov 1992. ISSN 0022-0949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1491223> >.

FOSTER, A. C.; KEMP, J. A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 1, p. 7-17, Feb 2006. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377242> >.

FUSTER, J. M. **The prefrontal cortex: Anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe**. New York: 1989.

GAITONDE, M.; FAYEIN, N.; JOHNSON, A. DECREASED METABOLISM IN VIVO OF GLUCOSE INTO AMINO ACIDS OF THE BRAIN OF THIAMINE-DEFICIENT RATS AFTER TREATMENT WITH PYRITHIAMINE. **Journal of neurochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1215-1223, 1975. ISSN 1471-4159.

GANGOLF, M. et al. Thiamine status in humans and content of phosphorylated thiamine derivatives in biopsies and cultured cells. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13616, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049048> >.

GASIC, G. P. et al. A meeting to remember. **EMBO reports**, v. 7, n. 8, p. 768-773, 2006. ISSN 1469-221X.

GIBSON, G. E.; BLASS, J. P. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 10, p. 1605-19, Oct 2007. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17685850> >.

GIBSON, G. E. et al. Vitamin B1 (thiamine) and dementia. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1367, n. 1, p. 21-30, Mar 2016. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26971083> >.

_____. Correlation of enzymatic, metabolic, and behavioral deficits in thiamin deficiency and its reversal. **Neurochem Res**, v. 9, n. 6, p. 803-14, Jun 1984. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6149477> >.

GIBSON, G. E.; ZHANG, H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. **Neurochem Int**, v. 40, n. 6, p. 493-504, May 2002. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850106> >.

GIMENES JÚNIOR, J. A. **Busca alimentar, memória espacial e ansiedade em ratos: possível participação do núcleo mamilar medial**. 2008. Universidade de São Paulo

GLYNN, D.; BORTNICK, R. A.; MORTON, A. J. Complexin II is essential for normal neurological function in mice. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 19, p. 2431-48, Oct 2003. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915444> >.

GRAY, C. J. et al. Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high resolution glycan analysis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1860, n. 8, p. 1688-709, Aug 2016. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26854953> >.

GRAY, N. W. et al. Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. **Curr Biol**, v. 13, n. 6, p. 510-5, Mar 2003. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646135> >.

_____. A dynamin-3 spliced variant modulates the actin/cortactin-dependent morphogenesis of dendritic spines. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 6, p. 1279-90, Mar 2005. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741233> >.

HAAS, R. H. Thiamin and the brain. **Annu Rev Nutr**, v. 8, p. 483-515, 1988. ISSN 0199-9885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3060175> >.

HAFTING, T. et al. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 801-806, 2005. ISSN 0028-0836.

HAKIM, A. M.; PAPPUS, H. M. Sequence of metabolic, clinical, and histological events in experimental thiamine deficiency. **Ann Neurol**, v. 13, n. 4, p. 365-75, Apr 1983. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6838172> >.

HARDING, A. et al. Degeneration of anterior thalamic nuclei differentiates alcoholics with amnesia. **Brain**, v. 123, n. 1, p. 141-154, 2000. ISSN 0006-8950.

HARPER, C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. **Alcohol Alcohol**, v. 44, n. 2, p. 136-40, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 1464-3502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147798> >.

HARRISON, P. J.; EASTWOOD, S. L. Preferential involvement of excitatory neurons in medial temporal lobe in schizophrenia. **Lancet**, v. 352, n. 9141, p. 1669-73, Nov 1998. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9853440> >.

HAUCKE, V.; NEHER, E.; SIGRIST, S. J. Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 127-38, Mar 2011. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304549> >.

HAZELL, A. S.; BUTTERWORTH, R. F. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. **Alcohol Alcohol**, v. 44, n. 2, p. 141-7, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 1464-3502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151161> >.

HAZELL, A. S.; BUTTERWORTH, R. F.; HAKIM, A. M. Cerebral vulnerability is associated with selective increase in extracellular glutamate concentration in experimental thiamine

deficiency. **J Neurochem**, v. 61, n. 3, p. 1155-8, Sep 1993. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8103080> >.

HAZELL, A. S. et al. The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: a multifactorial targeting issue. **Neurochem Int**, v. 62, n. 5, p. 796-802, Apr 2013. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333339> >.

_____. Thiamine deficiency results in downregulation of the GLAST glutamate transporter in cultured astrocytes. **Glia**, v. 43, n. 2, p. 175-84, Aug 2003. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838509> >.

_____. Selective down-regulation of the astrocyte glutamate transporters GLT-1 and GLAST within the medial thalamus in experimental Wernicke's encephalopathy. **J Neurochem**, v. 78, n. 3, p. 560-8, Aug 2001. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483659> >.

HAZELL, A. S.; WANG, C. Downregulation of complexin I and complexin II in the medial thalamus is blocked by N-acetylcysteine in experimental Wernicke's encephalopathy. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 200-7, 2005 Jan 1-15 2005. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573404> >.

HEINRICH, C. P.; STADLER, H.; WEISER, H. The effect of thiamine deficiency on the acetylcoenzyme A and acetylcholine levels in the rat brain. **J Neurochem**, v. 21, n. 5, p. 1273-81, Nov 1973. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4761708> >.

HIRANO, M. et al. New protein extraction/solubilization protocol for gel-based proteomics of rat (female) whole brain and brain regions. **Molecules and cells**, v. 22, n. 1, p. 119, 2006. ISSN 1016-8478.

HONIG, W. K. Studies of working memory in the pigeon. **Cognitive processes in animal behavior**, p. 211-248, 1978.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 1, p. 1-13, Jan 2009. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033363> >.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131956> >.

HUANG, L. et al. Ion mobility-enhanced MS(E)-based label-free analysis reveals effects of low-dose radiation post contextual fear conditioning training on the mouse hippocampal proteome. **J Proteomics**, v. 140, p. 24-36, May 2016. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020882> >.

HUMPHREY, S. J.; AZIMIFAR, S. B.; MANN, M. High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. **Nat Biotechnol**, v. 33, n. 9, p. 990-5, Sep 2015. ISSN 1546-1696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280412> >.

HÉROUX, M.; BUTTERWORTH, R. F. Reversible alterations of cerebral gamma-aminobutyric acid in pyriethamine-treated rats: implications for the pathogenesis of Wernicke's encephalopathy. **J Neurochem**, v. 51, n. 4, p. 1221-6, Oct 1988. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3418348> >.

HÉROUX, M.; BUTTERWORTH, R. F. Regional alterations of thiamine phosphate esters and of thiamine diphosphate-dependent enzymes in relation to function in experimental Wernicke's encephalopathy. **Neurochem Res**, v. 20, n. 1, p. 87-93, Jan 1995. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7739764> >.

IRLE, E.; MARKOWITSCH, H. J. Widespread neuroanatomical damage and learning deficits following chronic alcohol consumption or vitamin-B 1 (thiamine) deficiency in rats. **Behavioural brain research**, v. 9, n. 3, p. 277-294, 1983. ISSN 0166-4328.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória: Tipos e mecanismos—achados recentes. **Revista USP**, n. 98, p. 9-16, 2013. ISSN 2316-9036.

JANKOWSKA-KULAWY, A. et al. Acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminal compartment of thiamine deficient rat brain. **Journal of neurochemistry**, v. 115, n. 2, p. 333-342, 2010. ISSN 1471-4159.

JANOWSKY, J. S.; SHIMAMURA, A. P.; SQUIRE, L. R. Source memory impairment in patients with frontal lobe lesions. **Neuropsychologia**, v. 27, n. 8, p. 1043-1056, 1989. ISSN 0028-3932.

JANSEN, B.; DONATH, W. The Isolation of Anti-Beriberi Vitamin. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsche-Indie**, v. 66, n. 4, p. 573-574., 1926.

JHALA, S. S.; HAZELL, A. S. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. **Neurochem Int**, v. 58, n. 3, p. 248-60, Feb 2011. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130821> >.

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F. J. et al. Cerebrospinal fluid levels of thiamine in patients with Parkinson's disease. **Neuroscience letters**, v. 271, n. 1, p. 33-36, 1999. ISSN 0304-3940.

JONIDES, J. Working memory and thinking. **An invitation to cognitive science**, v. 3, p. 215-265, 1995.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000. ISSN 0305-1048.

KARUPPAGOUNDER, S. S. et al. Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model. **Neurobiology of aging**, v. 30, n. 10, p. 1587-1600, 2009. ISSN 0197-4580.

KATAGIRI, T. et al. Proteomic analysis of proteins expressing in regions of rat brain by a combination of SDS-PAGE with nano-liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. **Proteome Sci**, v. 8, p. 41, Jul 2010. ISSN 1477-5956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20659346> >.

KESSELS, R. P. et al. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Reviews**, v. 35, n. 3, p. 295-303, 2001. ISSN 0165-0173.

KOPELMAN, M. D. et al. The Korsakoff syndrome: clinical aspects, psychology and treatment. **Alcohol Alcohol**, v. 44, n. 2, p. 148-54, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 1464-3502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151162> >.

KUHNER, S.; GAVIN, A.-C. Towards quantitative analysis of proteome dynamics. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 298-299, 2007. ISSN 1087-0156.

- KUMAR, D. et al. Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. **Proteomics**, v. 16, n. 19, p. 2533-2544, 2016. ISSN 1615-9861.
- KUTLÁN, D.; MOLNÁR-PERL, I. New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. Analysis of wine, beer and vinegar. **J Chromatogr A**, v. 987, n. 1-2, p. 311-22, Feb 2003. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12613825> >.
- LANA-PEIXOTO, M. A.; SANTOS, E. C. D.; PITTELLA, J. E. H. Coma and death in unrecognized wernicke's encephalopathy an autopsy study: estudo necroscópico. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 50, n. 3, p. 329-333, 1992. ISSN 0004-282X.
- LANGLAIS, P. J. et al. Long-lasting changes in regional brain amino acids and monoamines in recovered pyridoxamine treated rats. **Neurochem Res**, v. 13, n. 12, p. 1199-206, Dec 1988. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3237312> >.
- LANGLAIS, P. J.; MANDEL, R. J.; MAIR, R. G. Diencephalic lesions, learning impairments, and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. **Behav Brain Res**, v. 48, n. 2, p. 177-85, Jun 1992. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1616608> >.
- LANGLAIS, P. J.; SAVAGE, L. M. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. **Behav Brain Res**, v. 68, n. 1, p. 75-89, Apr 1995. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619308> >.
- LANGLAIS, P. J.; ZHANG, S. X. Extracellular glutamate is increased in thalamus during thiamine deficiency-induced lesions and is blocked by MK-801. **J Neurochem**, v. 61, n. 6, p. 2175-82, Dec 1993. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245970> >.
- LANGLAIS, P. J.; ZHANG, S. X.; SAVAGE, L. M. Neuropathology of thiamine deficiency: an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. **Metab Brain Dis**, v. 11, n. 1, p. 19-37, Mar 1996. ISSN 0885-7490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8815388> >.
- LAVOIE, J.; BUTTERWORTH, R. F. Reduced Activities of Thiamine-Dependent Enzymes in Brains of Alcoholics in the Absence of Wernicke's Encephalopathy. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 19, n. 4, p. 1073-1077, 1995. ISSN 1530-0277.
- LIU, D.; KE, Z.; LUO, J. Thiamine Deficiency and Neurodegeneration: the Interplay Among Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy. **Mol Neurobiol**, Sep 2016. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596507> >.
- LIU, M. et al. Thiamine deficiency induces anorexia by inhibiting hypothalamic AMPK. **Neuroscience**, v. 267, p. 102-13, May 2014. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607345> >.
- LOMBROSOA, P. Aprendizagem e memória Learning and memory. **Rev Brás Psiquiatr**, v. 26, n. 3, p. 207-10, 2004.
- LONSDALE, D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 3, n. 1, p. 49-59, Mar 2006. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550223> >.

LU'ONG, K.; NGUYEN, L. T. Role of thiamine in Alzheimer's disease. **Am J Alzheimers Dis Other Demen**, v. 26, n. 8, p. 588-98, Dec 2011. ISSN 1938-2731. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22218733> >.

LÊ, O.; HÉROUX, M.; BUTTERWORTH, R. F. Pyriethamine-induced thiamine deficiency results in decreased Ca(2+)-dependent release of glutamate from rat hippocampal slices. **Metab Brain Dis**, v. 6, n. 3, p. 125-32, Sep 1991. ISSN 0885-7490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1685763> >.

MAIR, R. G. On the role of thalamic pathology in diencephalic amnesia. **Rev Neurosci**, v. 5, n. 2, p. 105-40, 1994 Apr-Jun 1994. ISSN 0334-1763. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7827707> >.

MAIR, R. G. et al. Thiamine deficiency depletes cortical norepinephrine and impairs learning processes in the rat. **Brain Res**, v. 360, n. 1-2, p. 273-84, Dec 1985. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4075172> >.

_____. Analysis of aversively conditioned learning and memory in rats recovered from pyriethamine-induced thiamine deficiency. **Behavioral neuroscience**, v. 105, n. 3, p. 351, 1991. ISSN 1939-0084.

MANZETTI, S.; ZHANG, J.; VAN DER SPOEL, D. Thiamin function, metabolism, uptake, and transport. **Biochemistry**, v. 53, n. 5, p. 821-35, Feb 2014. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460461> >.

MARSHALL, J. C. Sensation and semantics. **Nature**, v. 334, p. 378, 1988. ISSN 0028-0836.

MARTIN, P. R.; SINGLETON, C. K.; HILLER-STURMHÖFEL, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Res Health**, v. 27, n. 2, p. 134-42, 2003. ISSN 1535-7414. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15303623> >.

MARTINET, L.-E. et al. Spatial learning and action planning in a prefrontal cortical network model. **PLoS Comput Biol**, v. 7, n. 5, p. e1002045, 2011. ISSN 1553-7358.

MATSUSHIMA, K.; MACMANUS, J. P.; HAKIM, A. M. Apoptosis is restricted to the thalamus in thiamine-deficient rats. **Neuroreport**, v. 8, n. 4, p. 867-70, Mar 1997. ISSN 0959-4965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9141054> >.

MATTA, S. et al. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. **Neuron**, v. 75, n. 6, p. 1008-21, Sep 2012. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998870> >.

MAYR, J. A. et al. Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway. **Am J Hum Genet**, v. 89, n. 6, p. 806-12, Dec 2011. ISSN 1537-6605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22152682> >.

MAZZOLA, V. et al. Effects of emotional contexts on cerebello-thalamo-cortical activity during action observation. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75912, 2013. ISSN 1932-6203.

MCDUGALL, W. **Outline of psychology**. New York: 1923.

MCGEE, A. W.; BREDT, D. S. Assembly and plasticity of the glutamatergic postsynaptic specialization. **Current opinion in neurobiology**, v. 13, n. 1, p. 111-118, 2003. ISSN 0959-4388.

- MCMAHON, H. T. et al. Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. **Cell**, v. 83, n. 1, p. 111-9, Oct 1995. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7553862> >.
- MENGERINK, Y. et al. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry study. **J Chromatogr A**, v. 949, n. 1-2, p. 99-124, Mar 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11999763> >.
- MILNER, B.; PETRIDES, M.; SMITH, M. Frontal lobes and the temporal organization of memory. **Human neurobiology**, v. 4, n. 3, p. 137-142, 1984. ISSN 0721-9075.
- MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, n. 3, p. 445-468, 1998. ISSN 0896-6273.
- MITCHELL, A. S.; DALRYMPLE-ALFORD, J. C. Lateral and anterior thalamic lesions impair independent memory systems. **Learning & Memory**, v. 13, n. 3, p. 388-396, 2006. ISSN 1072-0502.
- MIZUNO, Y. et al. An immunohistochemical study on α -ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 35, n. 2, p. 204-210, 1994. ISSN 1531-8249.
- MOREIRA-LOBO, D. C. et al. Thiamine Deficiency Increases Ca²⁺ Current and CaV1.2 L-type Ca²⁺ Channel Levels in Cerebellum Granular Neurons. **Cellular and molecular neurobiology**, p. 1-8, 2016. ISSN 0272-4340.
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, May 1984. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6471907> >.
- MORRIS, R. G. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and motivation**, v. 12, n. 2, p. 239-260, 1981. ISSN 0023-9690.
- MORRIS, R. G.; FREY, U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 352, n. 1360, p. 1489-1503, 1997. ISSN 0962-8436.
- MORRIS, R. G. et al. Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. **Eur J Neurosci**, v. 2, n. 12, p. 1016-1028, 1990. ISSN 1460-9568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106063> >.
- MORTON, A. J.; FAULL, R. L.; EDWARDSON, J. M. Abnormalities in the synaptic vesicle fusion machinery in Huntington's disease. **Brain Res Bull**, v. 56, n. 2, p. 111-7, Sep 2001. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704347> >.
- MOSCOVITCH, M. et al. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. **Journal of anatomy**, v. 207, n. 1, p. 35-66, 2005. ISSN 1469-7580.
- MOTOYAMA, A.; YATES III, J. R. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 19, p. 7187-7193, 2008. ISSN 0003-2700.
- MOUSSEAU, D. D.; RAO, V. L.; BUTTERWORTH, R. F. Alterations in serotonin parameters in brain of thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. **J**

Neurochem, v. 67, n. 3, p. 1113-23, Sep 1996. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752118> >.

MOUSSEAU, D. D.; RAO, V. L.; BUTTERWORTH, R. F. Vesicular dysfunction during experimental thiamine deficiency is indicated by alterations in dopamine metabolism. **Eur J Pharmacol**, v. 317, n. 2-3, p. 263-7, Dec 1996. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8997609> >.

MURRAY, K. K. et al. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 7, p. 1515-1609, 2013. ISSN 1365-3075.

MURRAY, R. K. et al. **Harper's illustrated biochemistry**. 2014.

NACHER, J. et al. NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 2, p. 273-284, 2003. ISSN 0197-4580.

NAKAGAWASAI, O. Behavioral and neurochemical alterations following thiamine deficiency in rodents: relationship to functions of cholinergic neurons. **Yakugaku Zasshi**, v. 125, n. 7, p. 549-54, Jul 2005. ISSN 0031-6903. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15997211> >.

NAKAGAWASAI, O. et al. Immunohistochemical estimation of brain choline acetyltransferase and somatostatin related to the impairment of avoidance learning induced by thiamine deficiency. **Brain Research Bulletin**, v. 52, n. 3, p. 189-196, 2000. ISSN 0361-9230.

NARDONE, R. et al. Thiamine deficiency induced neurochemical, neuroanatomical, and neuropsychological alterations: a reappraisal. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 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. 1985.

NAVARRO, D. et al. Brain lactate synthesis in thiamine deficiency: a re-evaluation using ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 33-41, 2005 Jan 1-15 2005. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573405> >.

NAVONE, F.; GENEVINI, P.; BORGESE, N. Autophagy and Neurodegeneration: Insights from a Cultured Cell Model of ALS. **Cells**, v. 4, n. 3, p. 354-86, 2015. ISSN 2073-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287246> >.

NEILSON, K. A. et al. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 535-53, Feb 2011. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243637> >.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Porto Alegre: Artmed**, v. 6, 2011.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain research**, v. 34, n. 1, p. 171-175, 1971. ISSN 0006-8993.

- O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford University Press, USA, 1978. ISBN 0198572069.
- OKAZAKI, M. et al. Changes in brain lipid composition in thiamine deficient rats. **Jpn J Pharmacol**, v. 54, n. 2, p. 171-8, Oct 1990. ISSN 0021-5198. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2077183> >.
- OLIVEIRA, F. A. et al. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: role of voltage-dependent K⁺ channels. **Brain Res**, v. 1134, n. 1, p. 79-86, Feb 2007. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196946> >.
- OLIVEIRA, L. et al. Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. **Age (Dordr)**, v. 32, n. 2, p. 187-96, Jun 2010. ISSN 1574-4647. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431986> >.
- OLIVEIRA-SILVA, I. F. et al. Mild thiamine deficiency and chronic ethanol consumption modulate acetylcholinesterase activity change and spatial memory performance in a water maze task. **J Mol Neurosci**, v. 55, n. 1, p. 217-26, Jan 2015. ISSN 1559-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770900> >.
- OLTON, D. S.; BECKER, J. T.; HANDELMANN, G. E. Hippocampus, space, and memory. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 2, n. 03, p. 313-322, 1979. ISSN 1469-1825.
- ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nat Chem Biol**, v. 1, n. 5, p. 252-62, Oct 2005. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16408053> >.
- PABST, S. et al. Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. **J Biol Chem**, v. 275, n. 26, p. 19808-18, Jun 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777504> >.
- PAGE, M. G. et al. Brain glutamate and gamma-aminobutyrate (GABA) metabolism in thiamin-deficient rats. **Br J Nutr**, v. 62, n. 2, p. 245-53, Sep 1989. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2819010> >.
- PAISÁN-RUIZ, C. et al. LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. **Neurology**, v. 65, n. 5, p. 696-700, Sep 2005. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157901> >.
- PASCUAL-LEONE, A. et al. Procedural learning in Parkinson's disease and cerebellar degeneration. **Annals of neurology**, v. 34, n. 4, p. 594-602, 1993. ISSN 1531-8249.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 6th. 2006.
- PERLINI, L. E. et al. Synapsin III acts downstream of semaphorin 3A/CDK5 signaling to regulate radial migration and orientation of pyramidal neurons in vivo. **Cell Rep**, v. 11, n. 2, p. 234-48, Apr 2015. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25843720> >.
- PFEFFERBAUM, A. et al. Development and resolution of brain lesions caused by pyriithiamine- and dietary-induced thiamine deficiency and alcohol exposure in the alcohol-preferring rat: a longitudinal magnetic resonance imaging and spectroscopy study. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 5, p. 1159-1177, 2007. ISSN 0893-133X.

PICCOLI, G. et al. LRRK2 controls synaptic vesicle storage and mobilization within the recycling pool. **J Neurosci**, v. 31, n. 6, p. 2225-37, Feb 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307259> >.

_____. Leucine-rich repeat kinase 2 binds to neuronal vesicles through protein interactions mediated by its C-terminal WD40 domain. **Mol Cell Biol**, v. 34, n. 12, p. 2147-61, Jun 2014. ISSN 1098-5549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687852> >.

PIENAAR, I. S.; DANIELS, W. M.; GÖTZ, J. Neuroproteomics as a promising tool in Parkinson's disease research. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 115, n. 10, p. 1413-30, Oct 2008. ISSN 0300-9564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523721> >.

PINEL, J. P.; EDUARDO, S. H.; AMPARO, M. **Biopsicología**. Pearson Educación, 2005. ISBN 842054843X.

PINTO, L. S. et al. Dietary restriction protects against chronic-ethanol-induced changes in exploratory behavior in Wistar rats. **Brain research**, v. 1078, n. 1, p. 171-181, 2006. ISSN 0006-8993.

PIRES, R. G. et al. Correlation between phosphorylation level of a hippocampal 86kDa protein and extinction of a behaviour in a model of Wernicke-Korsakoff syndrome. **Behav Brain Res**, v. 180, n. 1, p. 102-6, Jun 2007. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395279> >.

_____. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Behav Brain Res**, v. 162, n. 1, p. 11-21, Jul 2005. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922063> >.

_____. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 70, n. 2-3, p. 227-35, 2001 Oct-Nov 2001. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701192> >.

PODWOJSKI, K. et al. Peek a peak: a glance at statistics for quantitative label-free proteomics. **Expert review of proteomics**, v. 7, n. 2, p. 249-261, 2010. ISSN 1478-9450.

POPOVA, N. V.; DEYEV, I. E.; PETRENKO, A. G. Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. **Acta Naturae**, v. 5, n. 3, p. 62-73, Jul 2013. ISSN 2075-8251. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24307937> >.

PURVES, D.; LICHTMAN, J. W. **Principles of neural development**. Sunderland, MA: 1985.

RADI, E. et al. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **J Alzheimers Dis**, v. 42 Suppl 3, p. S125-52, 2014. ISSN 1875-8908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25056458> >.

REN, C. et al. A neuroproteomic and systems biology analysis of rat brain post intracerebral hemorrhagic stroke. **Brain research bulletin**, v. 102, p. 46-56, 2014. ISSN 0361-9230.

RESENDE, L. S. et al. Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. **Behav Brain Res**, v. 232, n. 2, p. 421-5, Jul 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507301> >.

RIZZOLI, S. O. Synaptic vesicle recycling: steps and principles. **EMBO J**, v. 33, n. 8, p. 788-822, Apr 2014. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24596248> >.

ROLAND, J. J. et al. Increasing hippocampal acetylcholine levels enhance behavioral performance in an animal model of diencephalic amnesia. **Brain Res**, v. 1234, p. 116-27, Oct 2008. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706897> >.

ROLAND, J. J.; SAVAGE, L. M. Blunted hippocampal, but not striatal, acetylcholine efflux parallels learning impairment in diencephalic-lesioned rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 87, n. 1, p. 123-32, Jan 2007. ISSN 1074-7427. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978888> >.

_____. Blocking GABA-A receptors in the medial septum enhances hippocampal acetylcholine release and behavior in a rat model of diencephalic amnesia. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 92, n. 3, p. 480-7, May 2009. ISSN 1873-5177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463263> >.

RYLE, G. **The concept of mind**. San Francisco, CA 1949.

SAHEKI, Y.; DE CAMILLI, P. Synaptic vesicle endocytosis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 9, p. a005645, Sep 2012. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763746> >.

SAID, H. M. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. **Biochem J**, v. 437, n. 3, p. 357-72, Aug 2011. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749321> >.

SANTINI, E.; SEPULVEDA-ORENGO, M.; PORTER, J. T. Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2047-2056, 2012. ISSN 0893-133X.

SAVAGE, L. M. Sustaining high acetylcholine levels in the frontal cortex, but not retrosplenial cortex, recovers spatial memory performance in a rodent model of diencephalic amnesia. **Behav Neurosci**, v. 126, n. 2, p. 226-36, Apr 2012. ISSN 1939-0084. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22448856> >.

SAVAGE, L. M.; CHANG, Q.; GOLD, P. E. Diencephalic damage decreases hippocampal acetylcholine release during spontaneous alternation testing. **Learn Mem**, v. 10, n. 4, p. 242-6, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 1072-0502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888541> >.

SAVAGE, L. M.; HALL, J. M.; RESENDE, L. S. Translational rodent models of Korsakoff syndrome reveal the critical neuroanatomical substrates of memory dysfunction and recovery. **Neuropsychol Rev**, v. 22, n. 2, p. 195-209, Jun 2012. ISSN 1573-6660. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528861> >.

SAVAGE, L. M.; HALL, J. M.; VETRENO, R. P. Anterior thalamic lesions alter both hippocampal-dependent behavior and hippocampal acetylcholine release in the rat. **Learn Mem**, v. 18, n. 12, p. 751-8, Dec 2011. ISSN 1549-5485. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22086393> >.

SAVAGE, L. M.; ROLAND, J.; KLINTSOVA, A. Selective septohippocampal - but not forebrain amygdalar - cholinergic dysfunction in diencephalic amnesia. **Brain Res**, v. 1139, p. 210-9, Mar 2007. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289001> >.

SCALZO, S. J. et al. Wernicke-Korsakoff syndrome not related to alcohol use: a systematic review. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 86, n. 12, p. 1362-8, Dec 2015. ISSN 1468-330X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589780> >.

SCHACTER, D. L.; MOSCOVITCH, M. *Infant memory*. In: SPRINGER (Ed.). US, 1984. cap. Infants, amnesics, and dissociable memory systems.,

SCHÜNKE, M.; SCHULTE, E.; SCHUMACHER, U. **Prometheus, atlas de anatomia: cabeça e neuroanatomia**. Guanabara Koogan, 2007. ISBN 8527713136.

SCOTT, D. A. et al. A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration. **J Neurosci**, v. 30, n. 24, p. 8083-95, Jun 2010. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554859> >.

SECHI, G.; SERRA, A. Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. **The Lancet Neurology**, v. 6, n. 5, p. 442-455, 2007. ISSN 1474-4422.

SENA, I. C. C. O aprendizado de uma tarefa de navegação espacial altera os níveis de GABA no hipocampo de camundongos SWISS. 2015.

SHAO, W.-H. et al. Combined metabolomics and proteomics analysis of major depression in an animal model: perturbed energy metabolism in the chronic mild stressed rat cerebellum. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 19, n. 7, p. 383-392, 2015. ISSN 1536-2310.

SHARMA, A.; BIST, R.; BUBBER, P. Thiamine deficiency induces oxidative stress in brain mitochondria of *Mus musculus*. **J Physiol Biochem**, v. 69, n. 3, p. 539-46, Sep 2013. ISSN 1877-8755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23417786> >.

SHEU, K. F. et al. Immunochemical characterization of the deficiency of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in thiamine-deficient rat brain. **J Neurochem**, v. 70, n. 3, p. 1143-50, Mar 1998. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9489735> >.

SHEVCHENKO, G. et al. Neuroproteomics tools in clinical practice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 7, p. 705-717, 2015. ISSN 1570-9639.

_____. Comparison of extraction methods for the comprehensive analysis of mouse brain proteome using shotgun-based mass spectrometry. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 4, p. 2441-2451, 2012. ISSN 1535-3893.

_____. Longitudinal characterization of the brain proteomes for the tg2576 amyloid mouse model using shotgun based mass spectrometry. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 12, p. 6159-6174, 2012. ISSN 1535-3893.

SHI, Y. et al. The role of liquid chromatography in proteomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1053, n. 1, p. 27-36, 2004. ISSN 0021-9673.

SHIBATA, M. et al. Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. **J Biol Chem**, v. 281, n. 20, p. 14474-85, May 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522639> >.

SILVA, J. C. et al. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144-56, Jan 2006. ISSN 1535-9476. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219938> >.

SINGLETON, C. K.; MARTIN, P. R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Curr Mol Med**, v. 1, n. 2, p. 197-207, May 2001. ISSN 1566-5240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11899071> >.

SMITH, E. E.; GROSSMAN, M. Multiple systems of category learning. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 2, p. 249-264, 2008. ISSN 0149-7634.

SONG, X. S.; HUANG, Z. J.; SONG, X. J. Thiamine suppresses thermal hyperalgesia, inhibits hyperexcitability, and lessens alterations of sodium currents in injured, dorsal root ganglion neurons in rats. **Anesthesiology**, v. 110, n. 2, p. 387-400, Feb 2009. ISSN 1528-1175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194165> >.

SQUIRE, L. R. Declarative and nondeclarative memory: Multiple brain systems supporting learning and memory. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 195-231, 1992.

SQUIRE, L. R.; KNOWLTON, B. J. Memory, hippocampus, and brain systems. 1995. ISSN 0262071576.

STAUCH, K. L. et al. Proteomic analysis and functional characterization of mouse brain mitochondria during aging reveal alterations in energy metabolism. **Proteomics**, v. 15, n. 9, p. 1574-1586, 2015. ISSN 1615-9861.

STOCKTON, S. D. et al. Morphine regulated synaptic networks revealed by integrated proteomics and network analysis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 10, p. 2564-2576, 2015. ISSN 1535-9476.

SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 509-47, 2004. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217342> >.

SULLIVAN, E. V.; PFEFFERBAUM, A. Neuroimaging of the Wernicke–Korsakoff syndrome. **Alcohol and Alcoholism**, v. 44, n. 2, p. 155-165, 2009. ISSN 0735-0414.

SWARTZWELDER, H. S. et al. Changes in the Adult GluN2B Associated Proteome following Adolescent Intermittent Ethanol Exposure. **PLoS one**, v. 11, n. 5, p. e0155951, 2016. ISSN 1932-6203.

SWEATT, J. D. **Mechanisms of Memory**. Academic Press, 2003. ISBN 0080521967.

TANEV, K. S.; ROETHER, M.; YANG, C. Alcohol dementia and thermal dysregulation: a case report and review of the literature. **Am J Alzheimers Dis Other Dement**, v. 23, n. 6, p. 563-70, 2008 Dec-2009 Jan 2008. ISSN 1533-3175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19222143> >.

TANIDA, I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 11, p. 2201-14, Jun 2011. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712405> >.

THOMAS, K. Man and the natural world: A history of the modern sensibility. 1984.

THOMSON, A. D.; BAKER, H.; LEEVY, C. M. Patterns of 35S-thiamine hydrochloride absorption in the malnourished alcoholic patient. **J Lab Clin Med**, v. 76, n. 1, p. 34-45, Jul 1970. ISSN 0022-2143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4912963> >.

- THOMSON, A. D.; GUERRINI, I.; MARSHALL, E. J. The evolution and treatment of Korsakoff's syndrome: out of sight, out of mind? **Neuropsychol Rev**, v. 22, n. 2, p. 81-92, Jun 2012. ISSN 1573-6660. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569770> >.
- TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F. Early microglial response in experimental thiamine deficiency: an immunohistochemical analysis. **Glia**, v. 25, n. 2, p. 190-8, Jan 1999. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890633> >.
- TOEI, M.; SAUM, R.; FORGAC, M. Regulation and isoform function of the V-ATPases. **Biochemistry**, v. 49, n. 23, p. 4715-23, Jun 2010. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450191> >.
- TOLMAN, E. C. Cognitive maps in rats and men. **Psychological review**, v. 55, n. 4, p. 189, 1948. ISSN 1939-1471.
- TORVIK, A. Topographic distribution and severity of brain lesions in Wernicke's encephalopathy. **Clinical Neuropathology**, v. 6, n. 1, p. 25-29, 1986. ISSN 0722-5091.
- TRIMBUCH, T.; ROSENMUND, C. Should I stop or should I go? The role of complexin in neurotransmitter release. **Nat Rev Neurosci**, v. 17, n. 2, p. 118-25, Feb 2016. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26806630> >.
- TULVING, E. Episodic and semantic memory. In: PRESS, A. (Ed.). **Organisation of memory**. London, 1972.
- VALLAR, G.; SHALLICE, T. **Neuropsychological impairments of short-term memory**. Cambridge University Press, 2007. ISBN 0521042755.
- VAN DER WERF, Y. D. et al. Deficits of memory, executive functioning and attention following infarction in the thalamus; a study of 22 cases with localised lesions. **Neuropsychologia**, v. 41, n. 10, p. 1330-1344, 2003. ISSN 0028-3932.
- VAVASSORI, S.; MAYER, A. A new life for an old pump: V-ATPase and neurotransmitter release. **J Cell Biol**, v. 205, n. 1, p. 7-9, Apr 2014. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24733582> >.
- VEDDER, L. C. et al. Interactions between chronic ethanol consumption and thiamine deficiency on neural plasticity, spatial memory, and cognitive flexibility. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 39, n. 11, p. 2143-53, Nov 2015. ISSN 1530-0277. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26419807> >.
- VETRENO, R. P.; ANZALONE, S. J.; SAVAGE, L. M. Impaired, spared, and enhanced ACh efflux across the hippocampus and striatum in diencephalic amnesia is dependent on task demands. **Neurobiol Learn Mem**, v. 90, n. 1, p. 237-44, Jul 2008. ISSN 1095-9564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472286> >.
- VETRENO, R. P.; KLINTSOVA, A.; SAVAGE, L. M. Stage-dependent alterations of progenitor cell proliferation and neurogenesis in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome. **Brain Res**, v. 1391, p. 132-46, May 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440532> >.
- VETRENO, R. P. et al. Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Brain research**, v. 1436, p. 178-192, 2012. ISSN 0006-8993.

- VICTOR, M.; ADAMS, R. D.; COLLINS, G. H. **The Wernicke-Korsakoff Syndrome: And Related Neurologic Disorders Due to Alcoholism and Malnutrition**. FA Davis Company, 1989. ISBN 0803689217.
- VIGIL, F. A. et al. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. **Behav Brain Res**, v. 210, n. 1, p. 140-2, Jun 2010. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153779> >.
- VORHEES, C. V.; SCHMIDT, D. E.; BARRETT, R. J. Effects of pyriithiamin and oxythiamin on acetylcholine levels and utilization in rat brain. **Brain Res Bull**, v. 3, n. 5, p. 493-6, 1978 Sep-Oct 1978. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/122714> >.
- VORTMEYER, A.; COLMANT, H. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. **Virchows Archiv A**, v. 414, n. 1, p. 61-67, 1988. ISSN 0174-7398.
- WESSELING, H. et al. Hippocampal Proteomic and Metabonomic Abnormalities in Neurotransmission, Oxidative Stress, and Apoptotic Pathways in a Chronic Phencyclidine Rat Model. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 8, p. 3174-3187, 2015. ISSN 1535-3893.
- WETTERHALL, M. et al. Analysis of membrane and hydrophilic proteins simultaneously derived from the mouse brain using cloud-point extraction. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 400, n. 9, p. 2827-2836, 2011. ISSN 1618-2642.
- WHEELER, M. E.; BUCKNER, R. L. Functional dissociation among components of remembering: control, perceived oldness, and content. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 9, p. 3869-3880, 2003. ISSN 0270-6474.
- WILKINS, M. R. **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**. Springer Science & Business Media, 1997. ISBN 3540627537.
- WILLIAMS, R. R.; CLINE, J. Synthesis of vitamin B1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 58, n. 8, p. 1504-1505, 1936. ISSN 0002-7863.
- WINER, B. J.; BROWN, D. R.; MICHELS., K. M. **Statistical principles in experimental design**. New York: 1991.
- WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M. Anterograde and retrograde amnesia after lesions to frontal cortex in rats. **The Journal of neuroscience**, v. 19, n. 21, p. 9611-9617, 1999. ISSN 0270-6474.
- WIŚNIEWSKI, J. R. et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nat Methods**, v. 6, n. 5, p. 359-62, May 2009. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19377485> >.
- WU, C. C.; MACCOSS, M. J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Curr Opin Mol Ther**, v. 4, n. 3, p. 242-250, 2002.
- YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 11, p. 49-79, 2009. ISSN 1523-9829.
- YU, X.; JIN, L.; ZHANG, X. Effects of maternal mild zinc deficiency and zinc supplementation in offspring on spatial memory and hippocampal neuronal ultrastructural changes. **Nutrition**, v. 29, n. 2, p. 457-61, Feb 2013. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23312766> >.

- ZHANG, Q. et al. Thiamine deficiency increases β -secretase activity and accumulation of β -amyloid peptides. **Neurobiology of aging**, v. 32, n. 1, p. 42-53, 2011. ISSN 0197-4580.
- ZHANG, S. et al. Measurement of GABA and glutamate in vivo levels with high sensitivity and frequency. **Brain research protocols**, v. 14, n. 2, p. 61-66, 2005. ISSN 1385-299X.
- ZHANG, S. X. et al. Excitotoxic cytopathology, progression, and reversibility of thiamine deficiency-induced diencephalic lesions. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 54, n. 2, p. 255-67, Mar 1995. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876893> >.
- ZHAO, M. G. et al. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. **Neuron**, v. 47, n. 6, p. 859-72, Sep 2005. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157280> >.
- ZHAO, N. et al. Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. **Neurobiology of disease**, v. 29, n. 2, p. 176-185, 2008. ISSN 0969-9961.
- ZIMPRICH, A. et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. **Neuron**, v. 44, n. 4, p. 601-7, Nov 2004. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541309> >.
- ZUBARAN, C.; FERNANDES, J. G.; RODNIGHT, R. Wernicke-Korsakoff syndrome. **Postgrad Med J**, v. 73, n. 855, p. 27-31, Jan 1997. ISSN 0032-5473. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039406> >.

Anexo 1. Certificado do CEUA

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 188 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Correlação entre a expressão proteica no hipocampo e tálamo e o desempenho cognitivo espacial de ratos submetidos à deficiência de tiamina.", que tem como responsável Angela Maria Ribeiro, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 03/03/2015. Este certificado expira-se em 03/03/2020.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 188 / 2014, related to the Project entitled "Correlation between protein expression in the hippocampus and thalamus and spatial cognitive performance of rats with thiamine deficiency.", under the supervision of Angela Maria Ribeiro, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 03/03/2015. This certificates expires in 03/03/2020.	
FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 03/03/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	

Anexo 2 - Dados referentes aos pesos corporais (g) dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP) (n=12), aferidos ao longo do episódio de DT e no último dia do período de recuperação

Grupo	Animais	Peso Corporal (g)														Último dia de recuperação
		Dias de tratamento													28	
		D0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Controle (n=12)	R1	369	363	345	364	353	350	369	348	371	372	377	382	375	394	450
	R2	368	369	393	364	366	367	368	362	370	380	376	394	400	397	438
	R3	348	341	345	330	339	337	343	434	350	358	361	370	373	377	418
	R4	303	292	296	300	300	294	288	291	297	301	308	314	320	328	350
	R5	377	347	330	320	320	311	342	353	355	358	366	371	377	365	441
	R6	314	308	317	323	325	326	330	335	337	345	350	360	363	369	414
	R7	334	330	332	340	345	337	350	345	358	362	366	370	372	374	411
	R8	350	346	349	353	350	340	342	348	351	357	367	370	376	378	407
	R9	365	364	366	338	346	338	365	369	373	380	389	391	398	402	438
	R10	338	337	340	338	346	338	334	339	342	347	354	353	355	360	400
	R11	380	380	384	381	385	381	380	386	393	404	407	410	422	420	460
	R12	330	325	328	329	331	331	320	326	335	339	347	350	351	357	390
DTP (n=12)	R13	319	307	311	311	319	324	327	328	335	329	331	315	301	290	348
	R14	370	360	361	357	367	358	370	370	370	370	362	350	337	325	378
	R15	420	388	404	420	419	425	427	429	430	427	418	405	390	382	457
	R16	350	330	325	330	334	334	342	338	340	337	329	316	306	294	375
	R17	347	347	351	351	354	359	362	363	367	369	367	356	343	335	396
	R18	331	322	335	339	339	346	355	357	360	354	349	337	322	305	370
	R19	320	306	312	320	319	325	328	335	333	335	328	316	305	292	360
	R20	323	317	302	294	291	322	320	319	335	335	336	333	325	315	333
	R21	352	347	354	358	364	364	370	370	372	370	359	346	332	320	373
	R22	335	333	338	330	334	340	349	349	348	345	336	324	315	300	364
	R23	347	323	313	300	325	332	344	335	346	345	347	330	317	307	374
	R24	352	347	352	355	357	363	366	370	373	374	366	354	345	333	352

D0 = Início do episódio de deficiência de tiamina.

Dia 28 = último dia do período de recuperação (15 dias)

Anexo 3 - Dados referentes ao consumo de ração (g) dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP) (n=12), aferidos ao longo do episódio de DT

Grupo	Animais	Dias de tratamento - Consumo de ração (g)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Controle (n=12)	R1	15,2	27,2	29,5	23,5	20,1	27	15,5	22,75	20	26	21,4	19,6	8,3
	R2	23,3	23,5	26,1	27,1	23,3	25,8	19,2	21,3	24	20,1	27,4	23,5	14,7
	R3	18	32,6	16,8	21,8	23,1	29	24,3	21,3	13,7	19,9	19,2	24,7	19,6
	R4	18,8	21	18	27,8	25,7	13,6	13,6	21,85	14,3	22	25,8	19,1	21,8
	R5	0	1,5	0	33,9	8,5	22,5	26,8	18,5	16,4	22,9	21,8	24,3	24,8
	R6	16,7	25,3	22,9	22,5	22,2	21,8	22,8	16,8	18,4	23,3	22,9	19,7	23,8
	R7	44,2	11,8	37,9	36,7	27,9	24,1	55,4	30,1	12,1	14,3	13,3	19,1	8,3
	R8	21,5	31,1	28,8	21	18,1	16,1	22,8	21,1	17,9	24,6	16,4	19,7	18,4
	R9	25,8	37,7	26,9	22,1	22,8	23,5	19,2	16,6	16,7	23,6	17,7	19	12,4
	R10	23,4	26,7	15,5	23,3	23,3	11,8	18,2	13,3	15,5	20,8	18,2	17,3	18,5
	R11	31,7	49,6	47,79	26,61	20,8	33,3	35,1	25,35	25,1	29	13,4	31,6	19
	R12	18,9	22,1	19,9	23,5	26,7	15,8	28,6	16,9	14,8	20	18,7	15,3	17,2
DTP (n=12)	R13	16,1	31,6	28,4	24	26,3	24,6	20,9	13,6	15,6	13,4	2,7	0	2
	R14	20,3	26,6	42,5	29,3	25,8	20,1	25,6	11,4	4,6	11,5	0,3	0	0
	R15	1,4	39,9	34,4	28,7	36,2	33,1	35,9	15,1	12,1	9	6,9	0	0
	R16	16	27	27,2	26,4	24,2	23,7	21,4	6,3	12,7	9,5	3,9	0	1,6
	R17	23,8	0	24,8	28,3	30,4	32,1	25,2	16,8	12,1	13,6	11	0	2,7
	R18	24,7	9,5	28,1	22,2	28,8	31,3	36,9	16,9	0	2,7	5,3	0	0
	R19	18	32,3	19,9	29,3	23,6	22,4	29,6	16	7,4	4,9	7,6	8,2	12
	R20	30,5	19	17,4	18,4	26,5	21,5	20,8	17,5	21,9	16,8	12,5	7,7	1,5
	R21	25,5	36,3	22,9	27,8	27,4	25,9	26,2	7,9	7,7	9,6	1,8	2,6	1
	R22	23,3	48,3	29,4	30,8	29,3	26,9	33,3	12,8	5,6	6,8	2,1	0	0
	R23	0	3	0,3	32,1	24,8	31,3	17	19	21,2	14,3	0,8	0	0,1
	R24	20,6	40,7	22,1	27,2	28,9	32,8	27,4	12,8	7,2	14,5	6,6	5,9	0

Anexo 4 - Dados referentes ao consumo de água (ml) dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP) (n=12), aferidos ao longo do episódio de DT

Grupo	Animais	Dias de tratamento - Consumo de Água (ml)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Controle (n=12)	R1	14	24	56	24	52	72	28	66	64	68	68	18	48
	R2	18	16	30	36	40	40	40	48	28	28	34	30	24
	R3	10	22	30	60	44	42	36	42	50	42	38	30	28
	R4	2	16	21	21	24	60	36	32	40	34	30	26	26
	R5	0	0	2	4	4	46	28	30	36	38	32	32	28
	R6	6	20	30	34	42	32	40	40	30	34	30	22	22
	R7	20	26	44	42	40	44	50	48	34	40	22	32	40
	R8	10	22	30	32	42	44	46	42	32	34	32	30	28
	R9	22	36	46	46	44	52	50	46	46	44	36	36	36
	R10	20	22	20	24	26	22	38	30	30	34	24	24	22
	R11	14	26	30	42	46	30	38	34	38	30	40	32	20
	R12	10	20	18	24	28	32	34	36	26	26	24	20	24
DTP (n=12)	R13	20	22	28	28	34	34	28	34	26	28	14	2	4
	R14	8	24	24	32	26	24	28	26	26	20	20	14	6
	R15	4	30	36	34	42	36	58	32	28	20	8	2	2
	R16	16	20	34	38	42	36	28	24	20	12	6	6	2
	R17	14	26	22	22	26	26	26	24	34	22	14	14	12
	R18	36	62	50	50	58	60	60	62	58	46	28	24	8
	R19	46	32	32	30	38	36	36	34	40	48	26	20	12
	R20	12	38	28	28	36	38	28	26	22	20	10	10	4
	R21	16	6	10	12	52	38	20	40	34	36	30	22	18
	R22	30	18	34	36	42	40	36	30	20	22	10	10	10
	R23	0	34	22	44	40	52	38	40	32	36	26	20	14
	R24	12	36	28	26	48	40	38	26	26	22	10	12	10

Anexo 5- Dados referentes ao desempenho dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP) (n=11), durante o treino no LAM. Os resultados representam a mediana das latências (s) das quatro tentativas em cada sessão.

Grupo	Animais	Sessões de treino no LAM - Latência (s)				
		1	2	3	4	5
Controle (n=12)	R1	60	9,85	7,9	8,65	13,95
	R2	60	20,75	12,55	19,4	9,5
	R3	60	25,3	33,4	35,75	28,65
	R4	42,6	18,25	5,6	7,1	5,55
	R5	60	48,2	13,3	9,2	7,05
	R6	60	35,35	8,1	14,2	13,05
	R7	39,6	20,2	31,85	15,35	13
	R8	60	33,3	28,8	22,85	16,85
	R9	33	9,8	9	5,95	5,1
	R10	18,75	18,25	9,8	5,75	12,2
	R11	32,35	60	26,95	13,8	7,75
	R12	34,85	20,9	55,35	24,1	19,45
DTP (n=11)	R13	49,35	60	53,1	43,25	60
	R14	60	60	60	25,5	7,4
	R15	60	60	54	15,65	17,7
	R16	60	60	60	37,4	20,65
	R17	20	10	12,1	7,2	7,75
	R18	60	28,3	45,2	46,85	20,2
	R19	60	47,7	27,35	10,6	11,75
	R20	57,3	60	48,4	10,95	10,5
	R22	60	60	51,2	29,8	13,75
	R23	49	22,1	19,25	9,75	18,35
	R24	54,95	27,25	12,8	9,5	9,35

Anexo 6 - Dados referentes ao desempenho dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP)(n=11), durante o treino no LAM. Os resultados representam a mediana da distância (m) percorrida nas quatro tentativas em cada sessão.

Grupo	Animais	Sessões de treino no LAM - Distância (m)				
		1	2	3	4	5
Controle (n=12)	R1	11,70	2,58	2,05	2,27	3,56
	R2	13,88	3,33	1,96	3,40	1,72
	R3	12,49	6,39	7,45	6,30	6,64
	R4	8,20	3,42	1,15	1,55	1,11
	R5	9,11	12,74	3,64	2,47	1,44
	R6	13,69	9,47	2,08	2,64	2,32
	R7	10,96	4,80	7,00	2,69	2,13
	R8	11,43	8,43	5,77	3,29	2,67
	R9	6,72	1,85	1,76	1,17	0,92
	R10	4,75	5,10	2,46	1,30	2,47
	R11	7,38	12,62	5,01	2,27	1,40
	R12	6,14	4,83	12,32	5,47	3,51
DTP (n=11)	R13	9,01	14,05	11,89	9,55	15,34
	R14	14,46	13,28	14,73	6,62	1,66
	R15	9,92	13,25	11,82	2,70	2,69
	R16	11,32	11,56	13,40	9,51	5,42
	R17	4,97	3,00	3,11	1,52	1,59
	R18	12,27	7,34	10,46	12,13	4,67
	R19	11,32	9,64	5,66	2,32	1,97
	R20	11,75	11,32	9,93	1,87	1,82
	R22	12,30	12,28	10,12	7,35	3,20
	R23	11,51	6,21	4,97	2,67	4,52
	R24	10,03	7,17	3,33	2,31	2,20

Anexo 7 - Dados referentes a velocidade de nado dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP)(n=11), durante o treino no LAM. Os resultados representam a mediana da velocidade(m/s) de nado nas quatro tentativas em cada sessão.

Grupo	Animais	Sessões de treino no LAM - Velocidade (m/s)				
		1	2	3	4	5
Controle (n=12)	R1	0,19	0,26	0,26	0,26	0,26
	R2	0,23	0,16	0,16	0,18	0,18
	R3	0,21	0,25	0,22	0,18	0,23
	R4	0,19	0,19	0,20	0,22	0,20
	R5	0,15	0,26	0,27	0,27	0,20
	R6	0,23	0,27	0,26	0,19	0,18
	R7	0,28	0,24	0,22	0,18	0,16
	R8	0,19	0,25	0,20	0,14	0,16
	R9	0,20	0,19	0,20	0,20	0,18
	R10	0,25	0,28	0,25	0,23	0,20
	R11	0,23	0,21	0,19	0,16	0,18
	R12	0,18	0,23	0,22	0,23	0,18
DTP (n=11)	R13	0,18	0,23	0,22	0,22	0,26
	R14	0,24	0,22	0,25	0,26	0,22
	R15	0,17	0,22	0,22	0,17	0,15
	R16	0,19	0,19	0,22	0,25	0,26
	R17	0,25	0,30	0,26	0,21	0,21
	R18	0,20	0,26	0,23	0,26	0,23
	R19	0,19	0,20	0,21	0,22	0,17
	R20	0,21	0,19	0,21	0,17	0,17
	R22	0,20	0,20	0,20	0,25	0,23
	R23	0,23	0,28	0,26	0,27	0,25
	R24	0,18	0,26	0,26	0,24	0,23

Anexo 8 - Dados referentes ao teste comprobatório no LAM. Os resultados representam o tempo (s) de permanência no quadrante alvo no primeiro e segundo minuto dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP)(n=11).

Grupo	Animais	Tempo no quadrante alvo (s)		
		Primeiro minuto (T1)	Segundo Minuto (T2)	Razão (T2/T1)
Controle (n=12)	R1	30,50	13,30	0,44
	R2	14,80	11,70	0,79
	R3	18,50	17,70	0,96
	R4	21,40	12,80	0,60
	R5	11,10	9,60	0,86
	R6	11,90	18,70	1,57
	R7	14,90	17,60	1,18
	R8	17,70	3,10	0,18
	R9	6,20	13,90	2,24
	R10	20,20	15,60	0,77
	R11	15,20	4,60	0,30
	R12	14,90	17,30	1,16
DTP (n=11)	R13	16,10	31,80	1,98
	R14	12,50	16,40	1,31
	R15	15,50	16,50	1,06
	R16	25,80	40,00	1,55
	R17	28,00	14,00	0,50
	R18	26,80	20,90	0,78
	R19	27,40	6,30	0,23
	R20	21,60	21,50	1,00
	R22	12,60	12,70	1,01
	R23	20,50	15,80	0,77
	R24	29,30	19,70	0,67

Anexo 9 - Dados referentes ao teste comprobatório no LAM. Os resultados representam a distância média (m) ao alvo no primeiro e segundo minuto dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP) (n=11).

Grupo	Animais	Distância média ao alvo (m)		
		Primeiro minuto (D1)	Segundo Minuto (D2)	Razão (D2/D1)
Controle (n=12)	R1	1,13	1,15	1,02
	R2	1,10	1,16	1,05
	R3	1,14	1,16	1,02
	R4	1,15	1,16	1,01
	R5	1,13	1,16	1,02
	R6	1,13	1,13	1,01
	R7	1,11	1,13	1,02
	R8	1,11	1,14	1,03
	R9	1,12	1,16	1,04
	R10	1,15	1,11	0,97
	R11	1,10	1,02	0,92
	R12	1,16	1,16	1,00
DTP (n=11)	R13	1,16	1,08	0,93
	R14	1,15	1,15	1,00
	R15	1,12	1,15	1,03
	R16	1,11	1,14	1,03
	R17	1,16	1,16	0,99
	R18	1,10	0,83	0,75
	R19	1,09	1,16	1,06
	R20	1,16	1,16	1,00
	R22	1,15	1,16	1,01
	R23	1,14	1,16	1,01
	R24	1,09	1,16	1,06

Anexo 10 - Dados referentes ao teste comprobatório no LAM. Os resultados representam a velocidade média (m/s) de nado no primeiro e segundo minuto dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP) (n=11).

Grupo	Animais	Velocidade média de nado (m/s)	
		Primeiro minuto (V1)	Segundo Minuto (V2)
Controle (n=12)	R1	0,272	0,293
	R2	0,232	0,211
	R3	0,196	0,248
	R4	0,225	0,25
	R5	0,282	0,257
	R6	0,24	0,258
	R7	0,205	0,247
	R8	0,193	0,232
	R9	0,226	0,248
	R10	0,291	0,272
	R11	0,222	0,213
	R12	0,232	0,251
DTP (n=11)	R13	0,204	0,188
	R14	0,242	0,223
	R15	0,211	0,247
	R16	0,275	0,21
	R17	0,294	0,286
	R18	0,25	0,255
	R19	0,217	0,221
	R20	0,277	0,254
	R22	0,265	0,253
	R23	0,253	0,228
	R24	0,277	0,236

Anexo 11 - Dados referentes ao teste comprobatório no LAM. Os resultados representam a distância total(m) percorrida no primeiro e segundo minuto dos animais dos grupos controle (n=12) e deficiente de tiamina (DTP) (n=11).

Grupo	Animais	Distância total percorrida (m)	
		Primeiro minuto	Segundo Minuto
Controle (n=12)	R1	16,310	17,592
	R2	13,944	12,629
	R3	11,775	14,862
	R4	13,497	15,017
	R5	16,938	15,442
	R6	14,391	15,496
	R7	12,326	14,833
	R8	11,584	13,904
	R9	13,555	14,850
	R10	17,434	16,324
	R11	13,318	12,791
	R12	13,919	15,067
DTP (n=11)	R13	12,225	11,255
	R14	14,513	13,362
	R15	12,654	14,79
	R16	16,494	12,595
	R17	17,638	17,128
	R18	15,021	15,289
	R19	13,032	13,282
	R20	16,643	15,212
	R22	15,879	15,199
	R23	15,187	13,671
	R24	16,595	14,14

Anexo 12 - Acesso e descrição das 1440 proteínas identificadas

Acesso	Descrição
Q6TUD6_RAT	LRRGT00108 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1
D3ZME3_RAT	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=1
CC105_RAT	Coiled-coil domain-containing protein 105 OS=Rattus norvegicus GN=Ccdc105 PE=1 SV=1
D4AEG3_RAT	Protein Ppil4 OS=Rattus norvegicus GN=Ppil4 PE=1 SV=3
F1LPJ7_RAT	Protein Usp33 OS=Rattus norvegicus GN=Usp33 PE=1 SV=3
ATP5J_RAT	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Atp5j PE=1 SV=1
E9PTU4_RAT	Myosin-11 OS=Rattus norvegicus GN=Myh11 PE=1 SV=2
A0A0G2K7A8_RAT	SEC14-like protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Sec14l4 PE=1 SV=1
S4A8_RAT	Electroneutral sodium bicarbonate exchanger 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc4a8 PE=1 SV=1
CPLX2_RAT	Complexin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Cplx2 PE=1 SV=1
OXR1_RAT	Oxidation resistance protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Oxr1 PE=1 SV=3
D3ZIP8_RAT	Protein Endod1 OS=Rattus norvegicus GN=Endod1 PE=4 SV=2
Q4V8H5_RAT	Aspartyl aminopeptidase OS=Rattus norvegicus GN=Dnpep PE=1 SV=1
Q63144_RAT	Outer membrane cytochrome b(5) (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Cyb5b PE=2 SV=1
F1M5N3_RAT	Protein Ank2 OS=Rattus norvegicus GN=Ank2 PE=1 SV=3
SPF30_RAT	Survival of motor neuron-related-splicing factor 30 OS=Rattus norvegicus GN=Smndc1 PE=2 SV=1
Q0GLB5_RAT	DPPY splice variant d OS=Rattus norvegicus GN=Dpp10 PE=2 SV=1
RAB26_RAT	Ras-related protein Rab-26 OS=Rattus norvegicus GN=Rab26 PE=2 SV=2
PIMT_RAT	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Rattus norvegicus GN=Pcmt1 PE=1 SV=2
G3V8Q6_RAT	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 2, alpha, isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Prkar2a PE=1 SV=1
D3ZS39_RAT	Protein Mms22l OS=Rattus norvegicus GN=Mms22l PE=4 SV=2
B2RYE1_RAT	Pelil protein OS=Rattus norvegicus GN=Pelil PE=2 SV=1
A0A0G2JYY8_RAT	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=1
NDKB_RAT	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Rattus norvegicus GN=Nme2 PE=1 SV=1
A0A0G2K7Y2_RAT	Oxidation resistance protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Oxr1 PE=1 SV=1
SYUA_RAT	Alpha-synuclein OS=Rattus norvegicus GN=Snca PE=1 SV=1

NPTN_RAT	Neuroplastin OS=Rattus norvegicus GN=Nptn PE=1 SV=2
M0RA39_RAT	Protein Mxra7 OS=Rattus norvegicus GN=Mxra7 PE=1 SV=1
B0BMV0_RAT	Rap2ip protein (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Rap2ip PE=2 SV=1
M0R3X7_RAT	Hexokinase OS=Rattus norvegicus GN=LOC100364027 PE=3 SV=2
G3V9L3_RAT	MAGUK p55 subfamily member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Dusp3 PE=1 SV=2
A0A096MJE6_RAT	Tenascin R, isoform CRA_b OS=Rattus norvegicus GN=Tnr PE=1 SV=1
GTR3_RAT	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 OS=Rattus norvegicus GN=Slc2a3 PE=1 SV=1
PYGL_RAT	Glycogen phosphorylase, liver form OS=Rattus norvegicus GN=Pygl PE=1 SV=5
Q6TXJ1_RAT	LRRGT00008 OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1
A0A0G2JXZ3_RAT	Transcriptional regulator ATRX OS=Rattus norvegicus GN=Atrx PE=1 SV=1
GNAZ_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Gnaz PE=2 SV=3
A0A0H2UHB7_RAT	Anion exchange protein OS=Rattus norvegicus GN=Slc4a4 PE=1 SV=1
PTPRZ_RAT	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta OS=Rattus norvegicus GN=Ptporz1 PE=1 SV=1
RAB13_RAT	Ras-related protein Rab-13 OS=Rattus norvegicus GN=Rab13 PE=1 SV=2
VATF_RAT	V-type proton ATPase subunit F OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v1f PE=1 SV=1
G3V8V3_RAT	Alpha-1,4 glucan phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pygm PE=1 SV=1
SFXN3_RAT	Sideroflexin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Sfxn3 PE=2 SV=1
VOME_RAT	Vomeromodulin (Fragment) OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1
A0A096MKE2_RAT	Protein Snx12 OS=Rattus norvegicus GN=Snx12 PE=1 SV=1
EAA4_RAT	Excitatory amino acid transporter 4 OS=Rattus norvegicus GN=Slc1a6 PE=1 SV=1
Q6P503_RAT	ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit D, isoform CRA_c OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v1d PE=1 SV=1
MCF2L_RAT	Guanine nucleotide exchange factor DBS OS=Rattus norvegicus GN=Mcf2l PE=1 SV=3
A0A0G2K9J2_RAT	Protein Atp6v1h OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v1h PE=1 SV=1
1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Ywhae PE=1 SV=1
M0RAQ6_RAT	Hexokinase OS=Rattus norvegicus GN=Hk1 PE=1 SV=2
Q45QL8_RAT	Guanine nucleotide binding protein beta 1 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Gnb4 PE=2 SV=1
KINH_RAT	Kinesin-1 heavy chain OS=Rattus norvegicus GN=Kif5b PE=1 SV=1
Q4KSH6_RAT	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4 OS=Rattus norvegicus GN=Map2k4 PE=2 SV=1
PGK1_RAT	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgk1 PE=1 SV=2

LRRC7_RAT	Leucine-rich repeat-containing protein 7 OS=Rattus norvegicus GN=Lrrc7 PE=1 SV=2
D3ZBB8_RAT	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1 OS=Rattus norvegicus GN=Dync2h1 PE=4 SV=3
D4ABK9_RAT	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa OS=Rattus norvegicus GN=Kidins220 PE=1 SV=3
ENOG_RAT	Gamma-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno2 PE=1 SV=2
D4A3V2_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6 OS=Rattus norvegicus GN=Ndufa6 PE=1 SV=1
PFKAL_RAT	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type OS=Rattus norvegicus GN=Pfkl PE=1 SV=3
D3ZCZ9_RAT	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=LOC100912599 PE=1 SV=1
WDR1_RAT	WD repeat-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Wdr1 PE=1 SV=3
KAP3_RAT	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit OS=Rattus norvegicus GN=Prkar2b PE=1 SV=3
MIC25_RAT	MICOS complex subunit Mic25 OS=Rattus norvegicus GN=Chchd6 PE=1 SV=1
F1LX07_RAT	Protein Slc25a12 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a12 PE=1 SV=3
VATE1_RAT	V-type proton ATPase subunit E 1 OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v1e1 PE=1 SV=1
G3V7L8_RAT	ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit E isoform 1, isoform CRA_a OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v1e1 PE=1 SV=1
Q5XIJ3_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Idh3g PE=1 SV=1
M0R7G4_RAT	MICOS complex subunit OS=Rattus norvegicus GN=Apoo PE=1 SV=2
GABT_RAT	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Abat PE=1 SV=3
SAHH2_RAT	Adenosylhomocysteinase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Ahcyl1 PE=1 SV=2
ACY1A_RAT	Aminoacylase-1A OS=Rattus norvegicus GN=Acy1a PE=1 SV=1
D4A6C5_RAT	Protein Arhgap1 OS=Rattus norvegicus GN=Arhgap1 PE=1 SV=1
VATB2_RAT	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v1b2 PE=1 SV=1
AP2M1_RAT	AP-2 complex subunit mu OS=Rattus norvegicus GN=Ap2m1 PE=1 SV=1
OLA1_RAT	Obg-like ATPase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ola1 PE=2 SV=1
PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgam1 PE=1 SV=4
A0A0G2KBC7_RAT	ATP-dependent 6-phosphofructokinase OS=Rattus norvegicus GN=Pfkm PE=1 SV=1
PFKAM_RAT	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type OS=Rattus norvegicus GN=Pfkm PE=1 SV=3
TCTP_RAT	Translationally-controlled tumor protein OS=Rattus norvegicus GN=Tpt1 PE=1 SV=1
G3V6I9_RAT	60S ribosomal protein L26 OS=Rattus norvegicus GN=Rpl26 PE=1 SV=1
PPAC_RAT	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Rattus norvegicus GN=Acp1 PE=1 SV=3
CD81_RAT	CD81 antigen OS=Rattus norvegicus GN=Cd81 PE=1 SV=1

RB11A_RAT	Ras-related protein Rab-11A OS=Rattus norvegicus GN=Rab11a PE=1 SV=3
A0A0G2K6I0_RAT	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=1
EF1A1_RAT	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Rattus norvegicus GN=Eef1a1 PE=2 SV=1
RAB1A_RAT	Ras-related protein Rab-1A OS=Rattus norvegicus GN=Rab1A PE=1 SV=3
Q5XFX3_RAT	Phospholipid-transporting ATPase (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Atp9b PE=2 SV=1
A0A0G2K235_RAT	Protein Rab1a OS=Rattus norvegicus GN=Rab1a PE=1 SV=1
A0A0G2K0M1_RAT	Kinesin-like protein OS=Rattus norvegicus GN=Kif15 PE=3 SV=1
AK1A1_RAT	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] OS=Rattus norvegicus GN=Akr1a1 PE=1 SV=2
Q6P9Y4_RAT	ADP/ATP translocase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a4 PE=1 SV=1
B2RZ72_RAT	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Rattus norvegicus GN=Arpc4 PE=1 SV=1
PROF1_RAT	Profilin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Pfn1 PE=1 SV=2
CD59_RAT	CD59 glycoprotein OS=Rattus norvegicus GN=Cd59 PE=1 SV=2
A0A0G2JZE6_RAT	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus GN=Rack1 PE=1 SV=1
FMR1_RAT	Fragile X mental retardation protein 1 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Fmr1 PE=1 SV=2
F1M6U0_RAT	Protein Wwc1 OS=Rattus norvegicus GN=Wwc1 PE=1 SV=3
F1M455_RAT	Protein Spen OS=Rattus norvegicus GN=Spen PE=1 SV=3
RS3_RAT	40S ribosomal protein S3 OS=Rattus norvegicus GN=Rps3 PE=1 SV=1
ECHM_RAT	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Echs1 PE=1 SV=1
CDC42_RAT	Cell division control protein 42 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Cdc42 PE=1 SV=2
RLA2_RAT	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp2 PE=1 SV=2
B2RYP0_RAT	Protein Rhoc OS=Rattus norvegicus GN=Rhoc PE=1 SV=1
PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3 PE=1 SV=2
GSTM2_RAT	Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm2 PE=1 SV=2
B2RZD1_RAT	Protein Sec61b OS=Rattus norvegicus GN=Sec61b PE=1 SV=1
F1LZW6_RAT	Protein Slc25a13 OS=Rattus norvegicus GN=Slc25a13 PE=1 SV=2
GNAQ_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Gnaq PE=2 SV=2
D4ADS4_RAT	Protein Mgst3 OS=Rattus norvegicus GN=Mgst3 PE=1 SV=1
D3ZV82_RAT	Protein LOC685067 OS=Rattus norvegicus GN=LOC685067 PE=1 SV=3
MYH3_RAT	Myosin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Myh3 PE=3 SV=1

A0A0A1FZN8_RAT	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 OS=Rattus norvegicus GN=ND5 PE=3 SV=1
VPS29_RAT	Vacuolar protein sorting-associated protein 29 OS=Rattus norvegicus GN=Vps29 PE=1 SV=2
Q6RKB3_RAT	Fasciclin II transmembrane protein isoform OS=Rattus norvegicus GN=Ncam2 PE=2 SV=1
A0A0G2K7R3_RAT	Protein Ncam2 OS=Rattus norvegicus GN=Ncam2 PE=4 SV=1
A0A0G2K3Z9_RAT	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus PE=4 SV=1
ALDH2_RAT	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Aldh2 PE=1 SV=1
RS14_RAT	40S ribosomal protein S14 OS=Rattus norvegicus GN=Rps14 PE=2 SV=3
CPT1B_RAT	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform OS=Rattus norvegicus GN=Cpt1b PE=1 SV=1
PAK1_RAT	Serine/threonine-protein kinase PAK 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pak1 PE=1 SV=3
ARPC2_RAT	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Arpc2 PE=1 SV=1
A0A0G2K930_RAT	Ras-related protein Rab-7a OS=Rattus norvegicus GN=Rab7a PE=1 SV=1
CAC1G_RAT	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G OS=Rattus norvegicus GN=Cacna1g PE=1 SV=2
TBA8_RAT	Tubulin alpha-8 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba8 PE=2 SV=1
G3V8C4_RAT	Chloride intracellular channel protein OS=Rattus norvegicus GN=Clic4 PE=1 SV=1
B0BMY8_RAT	Histone H3 OS=Rattus norvegicus GN=H3f3b PE=2 SV=1
RS7_RAT	40S ribosomal protein S7 OS=Rattus norvegicus GN=Rps7 PE=1 SV=1
F1M6Z1_RAT	Apolipoprotein B-100 OS=Rattus norvegicus GN=Apob PE=1 SV=1
H2A1E_RAT	Histone H2A type 1-E OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2
GPX1_RAT	Glutathione peroxidase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gpx1 PE=1 SV=4
E9PSN4_RAT	Protein Zc3h13 OS=Rattus norvegicus GN=Zc3h13 PE=1 SV=2
H10_RAT	Histone H1.0 OS=Rattus norvegicus GN=H1f0 PE=2 SV=2
G3V8K5_RAT	Growth differentiation factor 15 OS=Rattus norvegicus GN=Gdf15 PE=3 SV=1
H4_RAT	Histone H4 OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h4b PE=1 SV=2
A2VD16_RAT	Aldo-keto reductase family 1, member C12-like 1 OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c12l1 PE=2 SV=1
A0A0G2KAN7_RAT	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Gls PE=1 SV=1
AMPL_RAT	Cytosol aminopeptidase OS=Rattus norvegicus GN=Lap3 PE=1 SV=1
H14_RAT	Histone H1.4 OS=Rattus norvegicus GN=Hist1h1e PE=1 SV=3
H2B1_RAT	Histone H2B type 1 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2
DYN3_RAT	Dynamamin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Dnm3 PE=1 SV=2

CATD_RAT	Cathepsin D OS=Rattus norvegicus GN=Ctsd PE=1 SV=1
PTGDS_RAT	Prostaglandin-H2 D-isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Ptgds PE=1 SV=2
GELS_RAT	Gelsolin OS=Rattus norvegicus GN=Gsn PE=1 SV=1
PNPH_RAT	Purine nucleoside phosphorylase OS=Rattus norvegicus GN=Pnp PE=1 SV=1
M0R9C6_RAT	Protein Ddx43 OS=Rattus norvegicus GN=Ddx43 PE=3 SV=1
F7EPE0_RAT	Prosaposin OS=Rattus norvegicus GN=Psap PE=1 SV=2
D3ZWD0_RAT	Protein Vstm2a OS=Rattus norvegicus GN=Vstm2a PE=4 SV=3
RASM_RAT	Ras-related protein M-Ras OS=Rattus norvegicus GN=Mras PE=1 SV=2
CATZ_RAT	Cathepsin Z OS=Rattus norvegicus GN=Ctsz PE=1 SV=2
A0A0G2JSH5_RAT	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=1
ALBU_RAT	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2
GFRA1_RAT	GDNF family receptor alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Gfra1 PE=1 SV=1
PLMN_RAT	Plasminogen OS=Rattus norvegicus GN=Plg PE=2 SV=2
VIME_RAT	Vimentin OS=Rattus norvegicus GN=Vim PE=1 SV=2
A0A096MIT7_RAT	Synapsin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Syn3 PE=1 SV=2
Q63363_RAT	Rat noerythroid alpha-spectrin (Fragment) OS=Rattus norvegicus PE=2 SV=1
A0A0G2KB92_RAT	Serine/threonine-protein kinase DCLK1 OS=Rattus norvegicus GN=Dclk1 PE=1 SV=1
D3ZZS8_RAT	Protein Atp6v1b1 OS=Rattus norvegicus GN=Atp6v1b1 PE=3 SV=2
RAN_RAT	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Rattus norvegicus GN=Ran PE=1 SV=3
C9E895_RAT	Glutamate decarboxylase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gad1 PE=2 SV=1
CYTC_RAT	Cystatin-C OS=Rattus norvegicus GN=Cst3 PE=1 SV=2
FABP7_RAT	Fatty acid-binding protein, brain OS=Rattus norvegicus GN=Fabp7 PE=1 SV=2
ANXA3_RAT	Annexin A3 OS=Rattus norvegicus GN=Anxa3 PE=1 SV=4
E9PSP1_RAT	Protein Pltp OS=Rattus norvegicus GN=Pltp PE=1 SV=1
TAGL2_RAT	Transgelin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Tagln2 PE=1 SV=1
TBA3_RAT	Tubulin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba3a PE=2 SV=1
MYH10_RAT	Myosin-10 OS=Rattus norvegicus GN=Myh10 PE=1 SV=1
GFAP_RAT	Glial fibrillary acidic protein OS=Rattus norvegicus GN=Gfap PE=1 SV=2
D4ADD7_RAT	Glutaredoxin 5 homolog (S. cerevisiae) (Predicted), isoform CRA_b OS=Rattus norvegicus GN=Glr5 PE=1 SV=1

Q5XI38_RAT	Lymphocyte cytosolic protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Lcp1 PE=1 SV=1
M0R597_RAT	Ferritin OS=Rattus norvegicus GN=LOC100362384 PE=3 SV=1
APOE_RAT	Apolipoprotein E OS=Rattus norvegicus GN=Apoe PE=1 SV=2
CLUS_RAT	Clusterin OS=Rattus norvegicus GN=Clu PE=1 SV=2
YBOX1_RAT	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ybx1 PE=2 SV=3
IL4_RAT	Interleukin-4 OS=Rattus norvegicus GN=Il4 PE=2 SV=2
C1QB_RAT	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Rattus norvegicus GN=C1qb PE=1 SV=2
TMX2_RAT	Thioredoxin-related transmembrane protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Tmx2 PE=2 SV=1
NAB1_RAT	NGFI-A-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Nab1 PE=2 SV=2
F1LNJ1_RAT	Protein Lrrk2 OS=Rattus norvegicus GN=Lrrk2 PE=1 SV=3
E9PTK9_RAT	Protein Ankhd1 OS=Rattus norvegicus GN=Ankhd1 PE=1 SV=2
D3ZWV2_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus PE=3 SV=3

Anexo 13– Proteínas reguladas positivamente e negativamente presentes na categoria GO: Processos Biológicos.

Termos GO	Proteínas reguladas	
	Positivamente	Negativamente
1- Transdução de sinais mediada por pequenas GTPases	RAN, member RAS oncogene family(Ran) leucine-rich repeat kinase 2 (Lrrk2)	RAB11a, member RAS oncogene family(Rab11a) RAB13, member RAS oncogene family(Rab13) RAB1A, member RAS oncogene family(Rab1a) RAB26, member RAS oncogene family(Rab26) Rho GTPase activating protein 1(Arhgap1) cell division cycle 42(Cdc42) muscle RAS oncogene homolog(Mras) p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1(Pak1) ras homolog family member C(Rhoc)
2-Envelhecimento	GDNF family receptor alpha 1(Gfra1) apolipoprotein E(Apoe) clusterin(Clu) complement component 1, q subcomponent, B chain(C1qb) vimentin(Vim)	4-aminobutyrate aminotransferase(Abat) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) gelsolin(Gsn) glutathione S-transferase mu 2(Gstm2) glutathione peroxidase 1(Gpx1) protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1(Pcmt1) synuclein alpha(Snca)
3-Processos glicolíticos		gamma-enolase-like(LOC100911625) phosphofructokinase, liver type(Pfkl) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphoglycerate kinase 1(Pgk1) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1)
4-Regulação de morte neuronal	apolipoprotein E(Apoe) clusterin(Clu) leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2)	synuclein alpha(Snca)
5-Resposta ao estresse oxidativo	apolipoprotein E(Apoe) cystatin C(Cst3) leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2)	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6(Ndufa6) glutathione peroxidase 1(Gpx1) oxidation resistance 1(Oxr1) ribosomal protein S3(Rps3)
6-Hidrólise de ATP acoplado ao transporte de prótons		ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1) ATPase H+ transporting V1 subunit H(Atp6v1h) ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f)
7-Processo catabólico de glicogênio		phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphorylase, glycogen, liver(Pygl) phosphorylase, glycogen, muscle(Pygm)
8-Endocitose	leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2)	ATPase H+ transporting V1 subunit H(Atp6v1h) RAB1A, member RAS oncogene family(Rab1a) adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit(Ap2m1) cell division cycle 42(Cdc42) dynamin 3(Dnm3)
9-Resposta a lesão	clusterin(Clu) glial fibrillary acidic protein(Gfap)	Cd81 molecule(Cd81) glutathione peroxidase 1(Gpx1) mitogen activated protein kinase kinase 4(Map2k4)
10-Processos metabólicos depende de ATP		ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F6(Atp5j) ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) Obg-like ATPase 1(Ola1) myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic(Myh3)

Anexo 14 - Proteínas reguladas positivamente e negativamente presentes na categoria GO: Componentes Celular

Termos GO	Proteínas reguladas	
	Positivamente	Negativamente
1-Exosomo extracelular	GDNF family receptor alpha 1(Gfra1)	4-aminobutyrate aminotransferase(Abat)
	RAN, member RAS oncogene family(Ran)	ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2)
	annexin A3(Anxa3)	ATPase H+ transporting V1 subunit D(Atp6v1d)
	apolipoprotein E(Apoe)	ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1)
	clusterin(Clu)	ATPase H+ transporting V1 subunit H(Atp6v1h)
	complement component 1, q subcomponent, B chain(C1qb)	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f)
	cystatin C(Cst3)	CD59 molecule(Cd59)
	leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2)	Cd81 molecule(Cd81)
	lymphocyte cytosolic protein 1(Lcp1)	GF20391-like(LOC100360950)
	myosin, heavy chain 10, non-muscle(Myh10)	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2(Nme2)
	plasminogen(Plg)	Obg-like ATPase 1(Ola1)
	transgelin 2(Tagln2)	RAB11a, member RAS oncogene family(Rab11a)
	vimentin(Vim)	RAB13, member RAS oncogene family(Rab13)
		RAB1A, member RAS oncogene family(Rab1a)
		Rho GTPase activating protein 1(Arhgap1)
		VPS29 retromer complex component(Vps29)
		WD repeat domain 1(Wdr1)
		acid phosphatase 1, soluble(Acp1)
		actin related protein 2/3 complex, subunit 2(Arpc2)
		actin related protein 2/3 complex, subunit 4(Arpc4)
		adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit(Ap2m1)
		adenosylhomocysteinase-like 1(Ahcy1l)
		albumin(Alb)
		aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)(Aldh2)
		aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)(Akr1a1)
		aminoacylase 1(Acy1)
		apolipoprotein B(Apob)
		cathepsin D(Ctsd)
		cathepsin Z(Ctsz)
		cell division cycle 42(Cdc42)
	coiled-coil domain containing 105(Ccdc105)	
	dual specificity phosphatase 3(Dusp3)	
	dynamamin 3(Dnm3)	
	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1)	
	gelsolin(Gsn)	
	glutathione S-transferase mu 2(Gstm2)	
	glutathione peroxidase 1(Gpx1)	
	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide(Gnaz)	
	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq)	
	histone H3.3B-like(LOC100361558)	
	histone cluster 1, H1d(Hist1h1d)	
	leucine aminopeptidase 3(Lap3)	
	microsomal glutathione S-transferase 3(Mgst3)	
	muscle RAS oncogene homolog(Mras)	

	clusterin(Clu)	ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2)
	leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2)	ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1)
	lymphocyte cytosolic protein 1(Lcp1)	RAB1A, member RAS oncogene family(Rab1a)
	vimentin(Vim)	WW and C2 domain containing 1(Wwc1) adenosylhomocysteinase-like 1(Ahcy1l) aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)(Akr1a1) calcium voltage-gated channel subunit alpha1 G(Cacna1g) cell division cycle 42(Cdc42) complexin 2(Cplx2) dual specificity phosphatase 3(Dusp3) dynamin 3(Dnm3) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) gelsolin(Gsn) glutathione S-transferase mu 2(Gstm2) glutathione peroxidase 1(Gpx1) guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide(Gnaz) guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq) mitogen activated protein kinase kinase 4(Map2k4) neuroplastin(Nptn) p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1(Pak1) phosphofructokinase, liver type(Pfk1) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphoglycerate kinase 1(Pgk1) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1) protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1(Pcmt1) ras homolog family member C(Rhoc) ribosomal protein S3(Rps3) synuclein alpha(Snca)
4-Citosol		
	RAN, member RAS oncogene family(Ran)	ATPase H+ transporting V1 subunit D(Atp6v1d)
	annexin A3(Anxa3)	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f)
	apolipoprotein E(Apoe)	Cd81 molecule(Cd81)
	glial fibrillary acidic protein(Gfap)	GF20391-like(LOC100360950)
	leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2)	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like(Mcf2l) Obg-like ATPase 1(Ola1) RAB11a, member RAS oncogene family(Rab11a) RAB13, member RAS oncogene family(Rab13) Sec61 translocon beta subunit(Sec61b) calcium voltage-gated channel subunit alpha1 G(Cacna1g) cell division cycle 42(Cdc42) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) fragile X mental retardation 1(Fmr1) guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq) kinesin family member 5B(Kif5b) microsomal glutathione S-transferase 3(Mgst3) muscle RAS oncogene homolog(Mras) neural cell adhesion molecule 2(Ncam2) p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1(Pak1) phosphofructokinase, liver type(Pfk1) phosphoglycerate kinase 1(Pgk1) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1) profilin 1(Pfn1)
5-Membrana		

		protein tyrosine phosphatase, receptor type Z1(Ptprz1) ras homolog family member C(Rhoc) ribosomal protein L26(Rpl26) ribosomal protein S14(Rps14) ribosomal protein S3(Rps3) ribosomal protein S7-like(LOC100362830) solute carrier family 1 member 6(Slc1a6) solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 8(Slc4a8) synuclein alpha(Snca) tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, epsilon(Ywhae)
6- Projeção neuronal	clusterin(Clu)	4-aminobutyrate aminotransferase(Abat)
	leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2)	RAB13, member RAS oncogene family(Rab13)
	myosin, heavy chain 10, non-muscle(Myh10)	acid phosphatase 1, soluble(Acp1)
	vimentin(Vim)	actin related protein 2/3 complex, subunit 2(Arpc2) cell division cycle 42(Cdc42) fragile X mental retardation 1(Fmr1) kinesin family member 5B(Kif5b) leucine rich repeat containing 7(Lrrc7) profilin 1(Pfn1) protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1(Pcmt1) solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 8(Slc4a8)
	RAN, member RAS oncogene family(Ran)	ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2)
	ankyrin repeat and KH domain containing 1(Ankhd1)	ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1)
	annexin A3(Anxa3)	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like(Mcf2l)
	apolipoprotein E(Apoe)	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2(Nme2)
	clusterin(Clu)	Obg-like ATPase 1(Ola1)
	cystatin C(Cst3)	RAB11a, member RAS oncogene family(Rab11a)
7-Citoplasma	fatty acid binding protein 7(Fabp7)	RAB13, member RAS oncogene family(Rab13)
	glial fibrillary acidic protein(Gfap)	VPS29 retromer complex component(Vps29)
	glutamate decarboxylase 1(Gad1)	WD repeat domain 1(Wdr1)
	leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2)	WW and C2 domain containing 1(Wwc1)
	lymphocyte cytosolic protein 1(Lcp1)	acid phosphatase 1, soluble(Acp1)
	myosin, heavy chain 10, non-muscle(Myh10)	actin related protein 2/3 complex, subunit 2(Arpc2)
	tubulin, alpha 3A(Tuba3a)	actin related protein 2/3 complex, subunit 4(Arpc4)
	vimentin(Vim)	adenosylhomocysteinase-like 1(Ahcy1) albumin(Alb) aminoacylase 1(Acy1) apolipoprotein B(Apob) aspartyl aminopeptidase(Dnpep) cell division cycle 42(Cdc42) dual specificity phosphatase 3(Dusp3) dynamin 3(Dnm3) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) fragile X mental retardation 1(Fmr1) gelsolin(Gsn) glutathione S-transferase mu 2(Gstm2) glutathione peroxidase 1(Gpx1) kinesin family member 5B(Kif5b) leucine aminopeptidase 3(Lap3) leucine rich repeat containing 7(Lrrc7)

		<p>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1(Pak1) peptidylprolyl isomerase like 4(Ppi4) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1) phosphorylase, glycogen, liver(Pygl) phosphorylase, glycogen, muscle(Pygm) profilin 1(Pfn1) protein disulfide isomerase family A, member 3(Pdia3) protein kinase cAMP-dependent type 2 regulatory subunit beta(Prkar2b) protein tyrosine phosphatase, receptor type Z1(Ptprz1) protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1(Pcmt1) purine nucleoside phosphorylase(Pnp) ribosomal protein S14(Rps14) ribosomal protein S3(Rps3) solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3-like(LOC100909595) survival motor neuron domain containing 1(Smndc1) synuclein alpha(Snca) tubulin, alpha 8(Tuba8) tumor protein, translationally-controlled 1(Tpt1)</p>
8- Corpo celular neuronal	<p>GDNF family receptor alpha 1(Gfra1) annexin A3(Anxa3) apolipoprotein E(Apoe) cystatin C(Cst3) fatty acid binding protein 7(Fabp7) glutaredoxin 5(Glrx5) leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2) myosin, heavy chain 10, non-muscle(Myh10)</p>	<p>RAB1A, member RAS oncogene family(Rab1a) apolipoprotein B(Apob) calcium voltage-gated channel subunit alpha1 G(Cacna1g) cell division cycle 42(Cdc42) complexin 2(Cplx2) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) protein kinase cAMP-dependent type 2 regulatory subunit beta(Prkar2b) protein tyrosine phosphatase, receptor type Z1(Ptprz1)</p>
9-Corpo celular	<p>fatty acid binding protein 7(Fabp7) glial fibrillary acidic protein(Gfap) vimentin(Vim)</p>	<p>calcium voltage-gated channel subunit alpha1 G(Cacna1g) fragile X mental retardation 1(Fmr1) guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide(Gnaz) guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq) ubiquitin specific peptidase 33(Usp33)</p>
10 - Bainha de mielina	<p>glial fibrillary acidic protein(Gfap)</p>	<p>ATPase H⁺ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2(Nme2) WD repeat domain 1(Wdr1) albumin(Alb) cell division cycle 42(Cdc42) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) gelsolin(Gsn) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1) protein disulfide isomerase family A, member 3(Pdia3)</p>

Anexo 15 - Proteínas reguladas positivamente e negativamente presentes na categoria GO: Função Molecular

Termos GO	Proteínas reguladas	
	Positivamente	Negativamente
1- Atividade GTPase	RAN, member RAS oncogene family(Ran) leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2) tubulin, alpha 3A(Tuba3a)	RAB11a, member RAS oncogene family(Rab11a) RAB13, member RAS oncogene family(Rab13) RAB1A, member RAS oncogene family(Rab1a) RAB26, member RAS oncogene family(Rab26) cell division cycle 42(Cdc42) dynamin 3(Dnm3) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide(Gnaz) guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq) tubulin, alpha 8(Tuba8)
2- Ligantes à GTP	RAN, member RAS oncogene family(Ran) leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2) tubulin, alpha 3A(Tuba3a)	Obg-like ATPase 1(Ola1) RAB11a, member RAS oncogene family(Rab11a) RAB13, member RAS oncogene family(Rab13) RAB1A, member RAS oncogene family(Rab1a) RAB26, member RAS oncogene family(Rab26) cell division cycle 42(Cdc42) dynamin 3(Dnm3) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide(Gnaz) guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq) muscle RAS oncogene homolog(Mras) ras homolog family member C(Rhoc) tubulin, alpha 8(Tuba8)
3- Ligantes de proteínas	GDNF family receptor alpha 1(Gfra1) RAN, member RAS oncogene family(Ran) clusterin(Clu) myosin, heavy chain 10, non-muscle(Myh10) vimentin(Vim)	Cd81 molecule(Cd81) RAB13, member RAS oncogene family(Rab13) actin related protein 2/3 complex, subunit 2(Arpe2) adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit(Ap2m1) aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)(Aldh2) apolipoprotein B(Apob) carnitine palmitoyltransferase 1B(Cpt1b) cell division cycle 42(Cdc42) dynamin 3(Dnm3) guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq) kinesin family member 5B(Kif5b) leucine rich repeat containing 7(Lrrc7) mitogen activated protein kinase kinase 4(Map2k4) muscle RAS oncogene homolog(Mras) p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1(Pak1) profilin 1(Pfn1) protein disulfide isomerase family A, member 3(Pdia3) protein kinase cAMP-dependent type 2 regulatory subunit beta(Prkar2b) protein tyrosine phosphatase, receptor type Z1(Ptprz1)

		protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1(Pcmt1) synuclein alpha(Snca) tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon(Ywhae)
4- Ligantes de ácido graxo	fatty acid binding protein 7(Fabp7)	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2(Nme2) albumin(Alb) prostaglandin D2 synthase(Ptgds) synuclein alpha(Snca)
5- Componente estrutural do citoesqueleto	glial fibrillary acidic protein(Gfap) tubulin, alpha 3A(Tuba3a) vimentin(Vim)	actin related protein 2/3 complex, subunit 2(Arpc2) actin related protein 2/3 complex, subunit 4(Arpc4) tubulin, alpha 8(Tuba8)
6- Ligantes de quinases	glial fibrillary acidic protein(Gfap) vimentin(Vim)	WW and C2 domain containing 1(Wwc1) phosphofructokinase, liver type(Pfkl) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) ribosomal protein S3(Rps3)
7- Ligantes de actina	leucine-rich repeat kinase 2(Lrrk2) lymphocyte cytosolic protein 1(Lcp1)	WD repeat domain 1(Wdr1) actin related protein 2/3 complex, subunit 2(Arpc2) actin related protein 2/3 complex, subunit 4(Arpc4) gelsolin(Gsn) myosin, heavy chain 11, smooth muscle(Myh11) myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic(Myh3) profilin 1(Pfn1)
8- Ligantes de piridoxal fosfato	glutamate decarboxylase 1(Gad1)	4-aminobutyrate aminotransferase(Abat) albumin(Alb) phosphorylase, glycogen, liver(Pygl) phosphorylase, glycogen, muscle(Pygm)
9- Ligantes de drogas		NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2(Nme2) albumin(Alb) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) phosphorylase, glycogen, liver(Pygl) phosphorylase, glycogen, muscle(Pygm) purine nucleoside phosphorylase(Pnp)
10- Ligantes da cauda Poly (A) RNA	RAN, member RAS oncogene family(Ran) ankyrin repeat and KH domain containing 1(Ankhd1)	GF20391-like(LOC100360950) H1 histone family, member 0(H1f0) Sec61 translocon beta subunit(Sec61b) eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1(Eef1a1) fragile X mental retardation 1(Fmr1) histone cluster 1, H1d(Hist1h1d) peptidylprolyl isomerase like 4(Ppil4) profilin 1(Pfn1) protein disulfide isomerase family A, member 3(Pdia3) ribosomal protein L26(Rpl26) ribosomal protein S14(Rps14) ribosomal protein S3(Rps3) ribosomal protein S7-like(LOC100362830) survival motor neuron domain containing 1(Smndc1) tumor protein, translationally-controlled 1(Tpt1) tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon(Ywhae) zinc finger CCCH type containing 13(Zc3h13)

Anexo 16 - Proteínas reguladas positivamente e negativamente presentes em vias de sinalização e metabólicas enriquecidas pela análise KEGG

Termos GO	Proteínas reguladas	
	Positivamente	Negativamente
Ciclo da vesícula sináptica		ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) ATPase H+ transporting V1 subunit D(Atp6v1d) ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1) ATPase H+ transporting V1 subunit H(Atp6v1h) ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f) adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit(Ap2m1) complexin 2(Cplx2) dynamin 3(Dnm3)
Glicólise / Gliconeogênese		aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)(Aldh2) aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)(Akr1a1) gamma-enolase-like(LOC100911625) phosphofructokinase, liver type(Pfkl) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphoglycerate kinase 1(Pgk1) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1)
Biossíntese de antibióticos		NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2(Nme2) aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)(Aldh2) aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)(Akr1a1) aminoacylase 1(Acy1) enoyl-CoA hydratase, mitochondrial-like(LOC100911186) gamma-enolase-like(LOC100911625) isocitrate dehydrogenase 3 (NAD), gamma(Idh3g) phosphofructokinase, liver type(Pfkl) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphoglycerate kinase 1(Pgk1) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1)
Biossíntese de aminoácidos		aminoacylase 1(Acy1) gamma-enolase-like(LOC100911625) isocitrate dehydrogenase 3 (NAD), gamma(Idh3g) phosphofructokinase, liver type(Pfkl) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphoglycerate kinase 1(Pgk1) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1)
Fosforilação oxidativa		ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F6(Atp5j) ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) ATPase H+ transporting V1 subunit D(Atp6v1d) ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1) ATPase H+ transporting V1 subunit H(Atp6v1h) ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f) NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6(Ndufa6) NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial-like(LOC100912599)
	glutamate decarboxylase 1(Gad1)	4-aminobutyrate aminotransferase(Abat)
Vias metabólicas		ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F6(Atp5j) ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) ATPase H+ transporting V1 subunit D(Atp6v1d) ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1) ATPase H+ transporting V1 subunit H(Atp6v1h) ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f) NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6(Ndufa6) NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial-like(LOC100912599)

		NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2(Nme2) adenosylhomocysteinase-like 1(Ahcy1l) aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)(Aldh2) aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)(Akr1a1) aminoacylase 1(Acy1) enoyl-CoA hydratase, mitochondrial-like(LOC100911186) gamma-enolase-like(LOC100911625) isocitrate dehydrogenase 3 (NAD), gamma(Idh3g) leucine aminopeptidase 3(Lap3) phosphofructokinase, liver type(Pfkl) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphoglycerate kinase 1(Pgk1) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1) phosphorylase, glycogen, liver(Pygl) phosphorylase, glycogen, muscle(Pygm) prostaglandin D2 synthase(Ptgds) purine nucleoside phosphorylase(Pnp)
Metabolismo de carbono		enoyl-CoA hydratase, mitochondrial-like(Echs1) gamma-enolase-like(LOC100911625) isocitrate dehydrogenase 3 (NAD), gamma(Idh3g) phosphofructokinase, liver type(Pfkl) phosphofructokinase, muscle(Pfkm) phosphoglycerate kinase 1(Pgk1) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1)
Secreção ácida do ducto coletor		ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) ATPase H+ transporting V1 subunit D(Atp6v1d) ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1) ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f)
Metabolismo de beta-Alanine	glutamate decarboxylase 1(Gad1)	4-aminobutyrate aminotransferase(Abat) aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)(Aldh2) enoyl-CoA hydratase, mitochondrial-like(LOC100911186)
Fagossomo	tubulin, alpha 3A(Tuba3a)	ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) ATPase H+ transporting V1 subunit D(Atp6v1d) ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1) ATPase H+ transporting V1 subunit H(Atp6v1h) ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f) Sec61 translocon beta subunit(Sec61b) tubulin, alpha 8(Tuba8)
Junção apertada ou oclusiva (tight junctions)	myosin, heavy chain 10, non-muscle(Myh10)	RAB13, member RAS oncogene family(Rab13) cell division cycle 42(Cdc42) muscle RAS oncogene homolog(Mras) myosin, heavy chain 11, smooth muscle(Myh11) myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic(Myh3)
Fagocitose mediada por receptor Fc gamma		actin related protein 2/3 complex, subunit 2(Arpc2) actin related protein 2/3 complex, subunit 4(Arpc4) cell division cycle 42(Cdc42) gelsolin(Gsn) p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1(Pak1)
Endócrino e reabsorção de cálcio regulada por outros fatores		RAB11a, member RAS oncogene family(Rab11a) adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit(Ap2m1) dynamin 3(Dnm3) guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq)
Artrite reumatóide		ATPase H+ transporting V1 subunit B2(Atp6v1b2) ATPase H+ transporting V1 subunit D(Atp6v1d) ATPase H+ transporting V1 subunit E1(Atp6v1e1) ATPase H+ transporting V1 subunit H(Atp6v1h) ATPase, H+ transporting, lysosomal V1, subunit F(Atp6v1f)

<p>Via de sinalização de glucagom</p>	<p>carnitine palmitoyltransferase 1B(Cpt1b) guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide(Gnaq) phosphoglycerate mutase 1(Pgam1) phosphorylase, glycogen, liver(Pygl) phosphorylase, glycogen, muscle(Pygm)</p>
<p>Metabolismo de glutatona</p>	<p>glutathione S-transferase mu 2(Gstm2) glutathione peroxidase 1(Gpx1) leucine aminopeptidase 3(Lap3) microsomal glutathione S-transferase 3(Mgst3)</p>
<p>Regulação de actina de citoesqueleto</p>	<p>actin related protein 2/3 complex, subunit 2(Arpc2) actin related protein 2/3 complex, subunit 4(Arpc4) cell division cycle 42(Cdc42) gelsolin(Gsn) muscle RAS oncogene homolog(Mras) p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1(Pak1) profilin 1(Pfn1)</p>
<p>Metabolismo de butanoato</p>	<p>glutamate decarboxylase 1(Gad1) 4-aminobutyrate aminotransferase(Abat) enoyl-CoA hydratase, mitochondrial-like(LOC100911186)</p>

Anexo 17 – Concentrações de Glutamato e GABA no Tálamo dos animais dos grupos controle (n=6) e grupo deficiente de tiamina (n=6). As concentrações estão representadas como média dos resultados de triplicatas em µg/g de tálamo.

Grupo	Animais	Glutamato	GABA	Glutamato / GABA
Controle (n=6)	R1	3640,41	474,10	7,68
	R2	1757,01	151,83	11,57
	R4	2751,46	224,28	12,27
	R9	2708,09	489,35	5,53
	R10	2103,21	337,76	6,23
	R12	1944,96	234,82	8,28
DTP (n=6)	R15	3065,62	198,12	15,47
	R17	2836,25	274,43	10,33
	R20	3158,62	321,95	9,81
	R22	1557,73	202,64	7,69
	R23	2419,32	553,61	4,37
	R24	2529,91	221,93	11,40

Anexo 18 - Análise de regressão linear entre os parâmetros bioquímicos (GABA, glutamato e taxa) e a latência dos animais (Grupos Controle e DTP) nas sessões no LAM

Parâmetros Analisados			Análise de Regressão				
Grupos	Parâmetros bioquímicos	Sessões de treino no LAM	R quadrado	Valor de F	DFn, DFd	Valor de P	Equação
Controle (n=6)	[Glutamato]	Sessão 1	0,11	0,48	1,000, 4,000	0,5249	$Y = 0,007668 * X + 22,48$
		Sessão 2	0,69	8,80	1,000, 4,000	0,0413	$Y = -0,006129 * X + 31,53$
		Sessão 3	0,21	1,03	1,000, 4,000	0,3672	$Y = -0,01241 * X + 47,52$
		Sessão 4	0,35	2,13	1,000, 4,000	0,2184	$Y = -0,006660 * X + 28,40$
		Sessão 5	0,01	0,05	1,000, 4,000	0,8423	$Y = -0,0007016 * X + 13,88$
DTP (n=6)	[Glutamato]	Sessão 1	0,04	0,17	1,000, 4,000	0,7052	$Y = -0,005230 * X + 63,78$
		Sessão 2	0,00	0,01	1,000, 4,000	0,925	$Y = -0,001946 * X + 44,94$
		Sessão 3	0,00	0,00	1,000, 4,000	0,9587	$Y = -0,0009526 * X + 35,43$
		Sessão 4	0,54	4,77	1,000, 4,000	0,0942	$Y = -0,01050 * X + 41,04$
		Sessão 5	0,02	0,09	1,000, 4,000	0,7767	$Y = -0,001138 * X + 15,85$
Controle (n=6)	[GABA]	Sessão 1	0,02	0,09	1,000, 4,000	0,7843	$Y = -0,01686 * X + 46,91$
		Sessão 2	0,89	32,08	1,000, 4,000	0,0048	$Y = -0,03476 * X + 27,38$
		Sessão 3	0,11	0,47	1,000, 4,000	0,5308	$Y = -0,04428 * X + 30,81$
		Sessão 4	0,40	2,62	1,000, 4,000	0,1807	$Y = -0,03547 * X + 23,16$
		Sessão 5	0,05	0,22	1,000, 4,000	0,6614	$Y = 0,007618 * X + 9,714$
DTP (n=6)	[GABA]	Sessão 1	0,02	0,08	1,000, 4,000	0,7852	$Y = -0,01689 * X + 55,35$
		Sessão 2	0,22	1,13	1,000, 4,000	0,3477	$Y = -0,08141 * X + 64,66$
		Sessão 3	0,21	1,04	1,000, 4,000	0,3662	$Y = -0,06998 * X + 54,25$
		Sessão 4	0,22	1,13	1,000, 4,000	0,3478	$Y = -0,02979 * X + 22,87$
		Sessão 5	0,11	0,51	1,000, 4,000	0,5132	$Y = 0,01142 * X + 9,427$
Controle (n=6)	[Glutamato] / [GABA]	Sessão 1	0,31	1,76	1,000, 4,000	0,2557	$Y = 3,244 * X + 13,66$
		Sessão 2	0,32	1,87	1,000, 4,000	0,2435	$Y = 1,050 * X + 7,281$
		Sessão 3	0,00	0,02	1,000, 4,000	0,9022	$Y = -0,4499 * X + 20,57$
		Sessão 4	0,11	0,50	1,000, 4,000	0,5198	$Y = 0,9452 * X + 3,736$
		Sessão 5	0,32	1,90	1,000, 4,000	0,2402	$Y = -0,9494 * X + 20,30$
DTP (n=6)	[Glutamato] / [GABA]	Sessão 1	0,01	0,03	1,000, 4,000	0,8789	$Y = 0,3414 * X + 46,97$
		Sessão 2	0,15	0,70	1,000, 4,000	0,4491	$Y = 2,415 * X + 16,99$
		Sessão 3	0,18	0,88	1,000, 4,000	0,4017	$Y = 2,358 * X + 10,60$
		Sessão 4	0,00	0,00	1,000, 4,000	0,9766	$Y = -0,03572 * X + 14,15$
		Sessão 5	0,00	0,01	1,000, 4,000	0,9095	$Y = -0,07367 * X + 13,60$

Anexo 19 - Análise de regressão linear entre as abundâncias das proteínas e a latência dos animais (Grupos Controle e DTP) nas sessões no LAM

Parâmetros Analisados			Análise de Regressão				
Grupos	Proteínas	Sessões de treino no LAM	R quadrado	Valor de F	DFn, DFd	Valor de P	Equação
Controle (n=6)	Glutationa peroxidase	Sessão 1	0,84	20,69	1,000, 4,000	0,0104	$Y = 0,01108 * X - 38,65$
		Sessão 2	0,01	0,04	1,000, 4,000	0,8543	$Y = -0,0003735 * X + 19,00$
		Sessão 3	0,20	1,02	1,000, 4,000	0,3695	$Y = -0,006404 * X + 63,06$
		Sessão 4	0,00	0,00	1,000, 4,000	0,9802	$Y = 7,743e-005 * X + 11,30$
		Sessão 5	0,31	1,76	1,000, 4,000	0,2551	$Y = -0,001906 * X + 25,94$
DTP (n=6)	Glutationa peroxidase	Sessão 1	0,18	0,90	1,000, 4,000	0,3972	$Y = 0,002670 * X + 20,77$
		Sessão 2	0,19	0,95	1,000, 4,000	0,3842	$Y = 0,004052 * X - 4,788$
		Sessão 3	0,10	0,46	1,000, 4,000	0,536	$Y = 0,002631 * X + 3,945$
		Sessão 4	0,59	5,75	1,000, 4,000	0,0745	$Y = 0,002596 * X - 14,82$
		Sessão 5	0,07	0,28	1,000, 4,000	0,6231	$Y = -0,0004631 * X + 18,01$
Controle (n=6)	Ferritina	Sessão 1	0,28	1,58	1,000, 4,000	0,2769	$Y = 0,009209 * X + 31,59$
		Sessão 2	0,02	0,10	1,000, 4,000	0,7689	$Y = -0,0008508 * X + 17,22$
		Sessão 3	0,09	0,41	1,000, 4,000	0,5584	$Y = -0,006168 * X + 23,36$
		Sessão 4	0,04	0,18	1,000, 4,000	0,6895	$Y = -0,001760 * X + 13,76$
		Sessão 5	0,26	1,37	1,000, 4,000	0,3067	$Y = -0,002490 * X + 14,83$
DTP (n=6)	Ferritina	Sessão 1	0,09	0,39	1,000, 4,000	0,5668	$Y = 0,001031 * X + 45,26$
		Sessão 2	0,01	0,05	1,000, 4,000	0,8347	$Y = 0,0005679 * X + 37,17$
		Sessão 3	0,00	0,00	1,000, 4,000	0,992	$Y = 2,432e-005 * X + 32,84$
		Sessão 4	0,47	3,54	1,000, 4,000	0,1331	$Y = 0,001287 * X + 7,640$
		Sessão 5	0,01	0,04	1,000, 4,000	0,8497	$Y = -0,0001006 * X + 13,38$
Controle (n=6)	Complexina 2	Sessão 1	0,37	2,30	1,000, 4,000	0,2036	$Y = -0,003490 * X + 68,03$
		Sessão 2	0,09	0,39	1,000, 4,000	0,5658	$Y = -0,0005455 * X + 20,44$
		Sessão 3	0,14	0,64	1,000, 4,000	0,4685	$Y = -0,002517 * X + 35,81$
		Sessão 4	0,31	1,78	1,000, 4,000	0,2535	$Y = -0,001550 * X + 23,63$
		Sessão 5	0,08	0,34	1,000, 4,000	0,5891	$Y = -0,0004628 * X + 15,66$
DTP (n=6)	Complexina 2	Sessão 1	0,01	0,03	1,000, 4,000	0,8715	$Y = -0,0008211 * X + 52,86$
		Sessão 2	0,05	0,21	1,000, 4,000	0,6735	$Y = -0,003132 * X + 50,02$
		Sessão 3	0,03	0,11	1,000, 4,000	0,7593	$Y = -0,002038 * X + 39,55$
		Sessão 4	0,01	0,04	1,000, 4,000	0,8439	$Y = -0,0005412 * X + 15,56$
		Sessão 5	0,12	0,56	1,000, 4,000	0,4958	$Y = 0,0009681 * X + 9,768$

Controle (n=6)	Dinamina 3	Sessão 1	0,87	27,47	1,000, 4,000	0,0063	$Y = 0,004549 * X - 46,36$
		Sessão 2	0,02	0,06	1,000, 4,000	0,814	$Y = -0,0001922 * X + 20,01$
		Sessão 3	0,00	0,02	1,000, 4,000	0,9054	$Y = 0,0003610 * X + 9,725$
		Sessão 4	0,17	0,80	1,000, 4,000	0,422	$Y = 0,0009619 * X - 6,728$
		Sessão 5	0,02	0,06	1,000, 4,000	0,8164	$Y = 0,0001707 * X + 8,844$
DTP (n=6)	Dinamina 3	Sessão 1	0,10	0,46	1,000, 4,000	0,5338	$Y = -0,0004032 * X + 63,03$
		Sessão 2	0,02	0,07	1,000, 4,000	0,8065	$Y = 0,0002405 * X + 32,24$
		Sessão 3	0,11	0,49	1,000, 4,000	0,523	$Y = 0,0005443 * X + 15,65$
		Sessão 4	0,00	0,01	1,000, 4,000	0,9352	$Y = 2,936e-005 * X + 12,87$
		Sessão 5	0,02	0,10	1,000, 4,000	0,7695	$Y = 5,606e-005 * X + 11,12$
Controle (n=6)	Complexo adaptador AP2	Sessão 1	0,39	2,57	1,000, 4,000	0,1843	$Y = -0,0009235 * X + 149,0$
		Sessão 2	0,35	2,19	1,000, 4,000	0,2134	$Y = 0,0002781 * X - 16,04$
		Sessão 3	0,06	0,24	1,000, 4,000	0,647	$Y = 0,0004159 * X - 31,68$
		Sessão 4	0,00	0,02	1,000, 4,000	0,8972	$Y = 4,909e-005 * X + 6,148$
		Sessão 5	0,03	0,13	1,000, 4,000	0,7356	$Y = 7,496e-005 * X + 3,422$
DTP (n=6)	Complexo adaptador AP2	Sessão 1	0,05	0,23	1,000, 4,000	0,655	$Y = -0,0003382 * X + 83,99$
		Sessão 2	0,01	0,02	1,000, 4,000	0,8869	$Y = -0,0001615 * X + 56,02$
		Sessão 3	0,01	0,03	1,000, 4,000	0,8611	$Y = 0,0001766 * X + 15,32$
		Sessão 4	0,11	0,51	1,000, 4,000	0,5151	$Y = -0,0002628 * X + 40,05$
		Sessão 5	0,20	1,02	1,000, 4,000	0,3703	$Y = 0,0001878 * X - 5,853$
Controle (n=6)	LRRK2	Sessão 1	0,52	4,38	1,000, 4,000	0,1046	$Y = 0,04416 * X + 27,87$
		Sessão 2	0,04	0,15	1,000, 4,000	0,7163	$Y = 0,003706 * X + 15,15$
		Sessão 3	0,19	0,92	1,000, 4,000	0,3922	$Y = -0,03099 * X + 26,29$
		Sessão 4	0,03	0,12	1,000, 4,000	0,7493	$Y = 0,004992 * X + 10,31$
		Sessão 5	0,35	2,16	1,000, 4,000	0,2154	$Y = -0,01031 * X + 15,33$
DTP (n=6)	LRRK2	Sessão 1	0,03	0,13	1,000, 4,000	0,736	$Y = 0,0001309 * X + 48,38$
		Sessão 2	0,16	0,77	1,000, 4,000	0,4295	$Y = 0,0004379 * X + 33,76$
		Sessão 3	0,27	1,47	1,000, 4,000	0,2925	$Y = 0,0005019 * X + 25,94$
		Sessão 4	0,05	0,21	1,000, 4,000	0,6685	$Y = 8,962e-005 * X + 12,55$
		Sessão 5	0,21	1,09	1,000, 4,000	0,3562	$Y = 9,822e-005 * X + 11,53$

Controle (n=6)	Sinapsina 3	Sessão 1	0,02	0,08	1,000, 4,000	0,7928	$Y = -0,0002337 * X + 49,17$
		Sessão 2	0,11	0,48	1,000, 4,000	0,5262	$Y = -0,0001744 * X + 22,00$
		Sessão 3	0,21	1,09	1,000, 4,000	0,3557	$Y = -0,0009126 * X + 46,52$
		Sessão 4	0,50	3,95	1,000, 4,000	0,1177	$Y = -0,0005739 * X + 30,61$
		Sessão 5	0,09	0,40	1,000, 4,000	0,5619	$Y = -0,0001442 * X + 16,85$
DTP (n=6)	Sinapsina 3	Sessão 1	0,16	0,75	1,000, 4,000	0,4346	$Y = 0,0002131 * X + 34,82$
		Sessão 2	0,40	2,62	1,000, 4,000	0,1806	$Y = 0,0004988 * X + 3,854$
		Sessão 3	0,40	2,72	1,000, 4,000	0,1745	$Y = 0,0004485 * X + 0,5596$
		Sessão 4	0,11	0,50	1,000, 4,000	0,5187	$Y = 9,664e-005 * X + 6,827$
		Sessão 5	0,02	0,07	1,000, 4,000	0,7982	$Y = 2,094e-005 * X + 11,39$
Controle (n=6)	Isocitrato desidrogenase 3	Sessão 1	0,18	0,89	1,000, 4,000	0,3981	$Y = 0,002020 * X - 57,78$
		Sessão 2	0,23	1,21	1,000, 4,000	0,3323	$Y = -0,0007227 * X + 51,84$
		Sessão 3	0,15	0,69	1,000, 4,000	0,4522	$Y = -0,002132 * X + 121,5$
		Sessão 4	0,11	0,51	1,000, 4,000	0,5142	$Y = -0,0007706 * X + 49,75$
		Sessão 5	0,00	0,01	1,000, 4,000	0,9457	$Y = 4,880e-005 * X + 9,742$
DTP (n=6)	Isocitrato desidrogenase 3	Sessão 1	0,15	0,68	1,000, 4,000	0,4546	$Y = -0,002433 * X + 150,4$
		Sessão 2	0,00	0,00	1,000, 4,000	0,9664	$Y = 0,0002113 * X + 31,19$
		Sessão 3	0,01	0,05	1,000, 4,000	0,8356	$Y = 0,0009225 * X - 5,041$
		Sessão 4	0,04	0,18	1,000, 4,000	0,696	$Y = -0,0007090 * X + 43,02$
		Sessão 5	0,13	0,62	1,000, 4,000	0,4752	$Y = -0,0006736 * X + 40,65$
Controle (n=6)	Glutamato descarboxilase 1	Sessão 1	0,01	0,06	1,000, 4,000	0,8257	$Y = 0,001315 * X + 36,56$
		Sessão 2	0,01	0,06	1,000, 4,000	0,8211	$Y = 0,0004275 * X + 14,68$
		Sessão 3	0,05	0,21	1,000, 4,000	0,6673	$Y = -0,002983 * X + 27,98$
		Sessão 4	0,08	0,36	1,000, 4,000	0,5806	$Y = -0,001568 * X + 17,79$
		Sessão 5	0,26	1,39	1,000, 4,000	0,304	$Y = -0,001629 * X + 18,30$
DTP (n=6)	Glutamato descarboxilase 1	Sessão 1	0,07	0,29	1,000, 4,000	0,6212	$Y = 0,001215 * X + 38,20$
		Sessão 2	0,03	0,14	1,000, 4,000	0,7272	$Y = 0,001281 * X + 27,23$
		Sessão 3	0,00	0,02	1,000, 4,000	0,9067	$Y = 0,0003859 * X + 29,15$
		Sessão 4	0,27	1,48	1,000, 4,000	0,291	$Y = 0,001324 * X + 0,7290$
		Sessão 5	0,10	0,43	1,000, 4,000	0,5493	$Y = -0,0004219 * X + 17,07$

Anexo 20 - Análise de regressão linear entre as abundâncias das proteínas e os níveis de GABA, glutamato e razão glutamato/GABA nos grupos Controle e DTP.

Parâmetros Analisados			Análise de Regressão				
Grupos	Proteínas	Sessões de treino no LAM	R quadrado	Valor de F	DFn, DFd	Valor de P	Equação
Controle (n=6)	Glutationa peroxidase	GABA	0,04	0,19	1,000, 4,000	0,69	$Y = -0,02195 * X + 477,6$
		Glutamato	0,14	0,67	1,000, 4,000	0,46	$Y = 0,1961 * X + 1064$
		Glutamato/GABA	0,51	4,15	1,000, 4,000	0,11	$Y = 0,001470 * X - 2,051$
DTP (n=6)	Glutationa peroxidase	GABA	0,45	3,27	1,000, 4,000	0,14	$Y = -0,03806 * X + 738,3$
		Glutamato	0,17	0,84	1,000, 4,000	0,41	$Y = -0,1177 * X + 3782$
		Glutamato/GABA	0,22	1,14	1,000, 4,000	0,35	$Y = 0,0005287 * X + 2,765$
Controle (n=6)	Ferritina	GABA	0,01	0,02	1,000, 4,000	0,89	$Y = -0,01142 * X + 331,0$
		Glutamato	0,37	2,31	1,000, 4,000	0,20	$Y = 0,4483 * X + 2000$
		Glutamato/GABA	0,39	2,58	1,000, 4,000	0,18	$Y = 0,001844 * X + 6,603$
DTP (n=6)	Ferritina	GABA	0,17	0,80	1,000, 4,000	0,42	$Y = -0,01284 * X + 380,2$
		Glutamato	0,10	0,46	1,000, 4,000	0,53	$Y = -0,05050 * X + 2726$
		Glutamato/GABA	0,04	0,18	1,000, 4,000	0,69	$Y = 0,0001298 * X + 7,971$
Controle (n=6)	Complexina 2	GABA	0,13	0,58	1,000, 4,000	0,49	$Y = 0,01759 * X + 185,1$
		Glutamato	0,02	0,07	1,000, 4,000	0,81	$Y = -0,03182 * X + 2726$
		Glutamato/GABA	0,21	1,04	1,000, 4,000	0,37	$Y = -0,0004466 * X + 11,98$
DTP (n=6)	Complexina 2	GABA	0,77	13,52	1,000, 4,000	0,02	$Y = 0,07169 * X + 72,27$
		Glutamato	0,04	0,17	1,000, 4,000	0,70	$Y = -0,07319 * X + 2831$
		Glutamato/GABA	0,67	7,97	1,000, 4,000	0,05	$Y = -0,001848 * X + 15,46$
Controle (n=6)	Dinamina 3	GABA	0,01	0,02	1,000, 4,000	0,89	$Y = -0,003039 * X + 377,4$
		Glutamato	0,13	0,62	1,000, 4,000	0,47	$Y = 0,07650 * X + 1006$
		Glutamato/GABA	0,16	0,75	1,000, 4,000	0,44	$Y = 0,0003292 * X + 2,233$

DTP (n=6)	Dinamina 3	GABA	0,22	1,11	1,000, 4,000	0,35	$Y = 0,005313 * X + 149,7$
		Glutamato	0,12	0,55	1,000, 4,000	0,50	$Y = 0,01968 * X + 1858$
		Glutamato/GABA	0,26	1,44	1,000, 4,000	0,30	$Y = -0,0001161 * X + 12,29$
Controle (n=6)	Complexo adaptador AP2	GABA	0,11	0,49	1,000, 4,000	0,52	$Y = -0,004204 * X + 807,7$
		Glutamato	0,26	1,41	1,000, 4,000	0,30	$Y = -0,03228 * X + 6239$
		Glutamato/GABA	0,02	0,07	1,000, 4,000	0,80	$Y = -3,322e-005 * X + 12,46$
DTP (n=6)	Complexo adaptador AP2	GABA	0,64	7,08	1,000, 4,000	0,06	$Y = 0,01049 * X - 729,1$
		Glutamato	0,47	3,57	1,000, 4,000	0,13	$Y = 0,04495 * X - 2005$
		Glutamato/GABA	0,32	1,87	1,000, 4,000	0,24	$Y = -0,0001468 * X + 23,26$
Controle (n=6)	LRRK2	GABA	0,20	1,03	1,000, 4,000	0,37	$Y = -0,2374 * X + 392,1$
		Glutamato	0,03	0,12	1,000, 4,000	0,75	$Y = -0,4377 * X + 2620$
		Glutamato/GABA	0,44	3,20	1,000, 4,000	0,15	$Y = 0,006935 * X + 6,448$
DTP (n=6)	LRRK2	GABA	0,26	1,41	1,000, 4,000	0,30	$Y = -0,003202 * X + 349,0$
		Glutamato	0,08	0,33	1,000, 4,000	0,59	$Y = 0,007767 * X + 2486$
		Glutamato/GABA	0,67	8,00	1,000, 4,000	0,05	$Y = 0,0001423 * X + 7,491$
Controle (n=6)	Sinapsina 3	GABA	0,13	0,60	1,000, 4,000	0,48	$Y = 0,005201 * X + 148,8$
		Glutamato	0,45	3,25	1,000, 4,000	0,15	$Y = 0,04824 * X + 908,1$
		Glutamato/GABA	0,00	0,01	1,000, 4,000	0,92	$Y = -1,598e-005 * X + 9,116$
DTP (n=6)	Sinapsina 3	GABA	0,00	0,01	1,000, 4,000	0,94	$Y = 0,0001849 * X + 305,3$
		Glutamato	0,27	1,45	1,000, 4,000	0,30	$Y = 0,01251 * X + 1580$
		Glutamato/GABA	0,05	0,23	1,000, 4,000	0,66	$Y = 2,234e-005 * X + 6,980$
Controle (n=6)	Isocitrato desidrogenase 3	GABA	0,21	1,05	1,000, 4,000	0,36	$Y = 0,01852 * X - 592,2$
		Glutamato	0,52	4,30	1,000, 4,000	0,11	$Y = 0,1458 * X - 4684$
		Glutamato/GABA	0,02	0,07	1,000, 4,000	0,80	$Y = -0,0001086 * X + 13,93$

DTP (n=6)	Isocitrato desidrogenase 3	GABA	0,13	0,57	1,000, 4,000	0,49	$Y = -0,02050 * X + 1163$
		Glutamato	0,54	4,75	1,000, 4,000	0,09	$Y = -0,2127 * X + 11247$
		Glutamato/GABA	0,00	0,01	1,000, 4,000	0,92	$Y = -6,411e-005 * X + 11,23$
Controle (n=6)	Glutamato descarboxilase 1	GABA	0,05	0,21	1,000, 4,000	0,67	$Y = -0,02149 * X + 399,9$
		Glutamato	0,15	0,72	1,000, 4,000	0,44	$Y = 0,1888 * X + 1770$
		Glutamato/GABA	0,33	1,96	1,000, 4,000	0,23	$Y = 0,001099 * X + 4,439$
DTP (n=6)	Glutamato descarboxilase 1	GABA	0,17	0,80	1,000, 4,000	0,42	$Y = -0,01750 * X + 491,7$
		Glutamato	0,00	0,01	1,000, 4,000	0,93	$Y = 0,01012 * X + 2384$
		Glutamato/GABA	0,19	0,95	1,000, 4,000	0,39	$Y = 0,0003713 * X + 4,925$