

**FERNANDO AUGUSTO DE OLIVEIRA**

**EFEITOS NEURODEGENERATIVOS CAUSADOS PELA DEFICIÊNCIA DE  
VITAMINA B<sub>1</sub>.**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2006**

**FERNANDO AUGUSTO DE OLIVEIRA**

**EFEITOS NEURODEGENERATIVOS CAUSADOS PELA DEFICIÊNCIA DE  
VITAMINA B<sub>1</sub>.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área  
de concentração Fisiologia e Biofísica: Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade  
Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

**BELO HORIZONTE – MG**

**2006**

**Fernando Augusto de Oliveira**

**EFEITOS NEURODEGENERATIVOS CAUSADOS PELA DEFICIÊNCIA DE**

**VITAMINA B<sub>1</sub>.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas do  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e  
Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dr. Wamberto Antônio Varanda  
FMRP - USP

---

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Christopher kushmerick  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dr. Maria Elena de Lima Perez Garcia  
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho a Caroline Marcantônio Ferreira, minha esposa, pela compreensão e incentivo durante esta caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, e de maneira especial:

A professora Ligia Naves Kushmerick, pelos ensinamentos em eletrofisiologia e por ser uma pessoa com quem sempre pude contar e confiar nas horas decisivas.

Aos professores Christopher Kuhmerick e Miguel José Lopes pelos seus ensinamentos.

Agradeço ao eterno orientador e amigo Jader Cruz, por sempre ser um ombro amigo e por compartilhar de minha caminhada profissional e pessoal.

A eterna amiga Roseli Martins Resende, por sua dedicação e apoio em momentos difíceis, e pelas palavras carinhosas de nossos dias.

Aos companheiros de trabalho Diogo Galan e Phillipe Pessoa. Agradeço também aos membros do LAMEX (laboratório de membrana excitáveis) pela agradável receptividade e pelos conhecimentos compartilhados, especialmente ao Prof. Paulo Sergio Lacerda Beirão.

Aos membros do laboratório de Eletrofisiologia celular.

À minha família, pelo apoio e por ser a base de minhas conquistas.

## RESUMO

Estresse oxidativo, perda neuronal seletiva, e a atividade diminuída de enzimas dependentes de tiamina parecem provocar a maioria das doenças neurodegenerativas. Os modelos da deficiência de tiamina (DT) são usados para produzir neurodegeneração seletiva por causa do comprometimento do metabolismo oxidativo. No estudo atual, nós relatamos que a DT revelou uma diminuição significativa na condutância, tempo-dependente, de membrana para as correntes de  $K^+$  nos neurônios granulares do cerebelo. Nós examinamos os efeitos da DT sobre os canais para  $K^+$  sensíveis a voltagem do tipo retificador-retardado e do tipo-A, os quais estão envolvidos na regulação e disparo de potenciais de ação nos neurônios granulares. Os registros foram feitos em neurônios cerebelares usando a técnica da whole-cell voltage e current-clamp. A DT diminuiu as correntes de  $K^+$ , inibindo primariamente a  $I_A$ , e aumentou a frequência de despolarizações. Os conjuntos destas mudanças poderiam levar a morte neuronal.

Palavras Chaves: Neurodegeneração, Tiamina, Canais para potássio, Potencial de Ação, Patch-Clamp.

## **ABSTRACT**

Oxidative stress, selective neuronal loss, and diminished activity of thiamine-dependent enzymes is assumed to characterize most of the neurodegenerative diseases. Thiamine deficiency (TD) models have been used to produce selective neurodegeneration basically because of the mild impairment of oxidative metabolism. In the present study, we report that TD elicited a significant decrease in voltage-dependent  $K^+$  membrane conductance in cerebellar granule neurons. We examined the TD effects on delayed rectifier and A-type  $K^+$  channels, two well known voltage-activated  $K^+$  channels involved in the regulation of action potential firing in cerebellar granule neurons. Current recordings were performed in cultured rat cerebellar granule neurons using the whole-cell voltage-clamp technique. TD markedly depressed the transient A-type  $K^+$  currents. The present results suggest that, by inhibiting  $I_A$ , there is increase in action potential firing. Both situations could cause neuronal cell death.

Key words: Neurodegeneration, Thiamine, Potassium Channel, Action Potential, Patch-Clamp.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Citoarquitetura cerebelar.

FIGURA 2 – Núcleos profundos do cerebelo.

FIGURA 3 - Camadas do córtex cerebelar.

FIGURA 4 - Circuito do córtex cerebelar.

FIGURA 5 – Zonas cerebelares.

FIGURA 6 – Esquema das zonas cerebelares e suas funções motoras.

FIGURA 7 – Vias Metabólicas que utilizam a tiamina como cofator enzimático.

FIGURA 8 – Correntes de potássio nos neurônios granulares do cerebelo.

FIGURA 9 – Patch-Clamp no modo Whole-Cell voltage-clamp.

FIGURA 10 – Protocolo de voltagem utilizado para o registro de correntes de potássio durante os experimentos eletrofisiológicos na modalidade de whole-cell voltage-clamp.

FIGURAS 11 – Correntes foram registradas a partir de um potencial de repouso de -80 e -40mV conforme indicado no protocolo acima. As correntes geradas por cada protocolo foram subtraídas para determinação da  $I_A$ .

FIGURA 12 – Protocolo de injeção de corrente utilizado para obtenção dos potenciais de ação durante o experimento eletrofisiológico na modalidade whole-cell current-clamp.

FIGURA 13 – Deficiência de tiamina causa diminuição do peso corpóreo e diminui o consumo de ração.



FIGURA 14 – A deficiência de tiamina na dieta leva a redução dos níveis sanguíneos de vitamina B1. FIGURA 15 – Deficiência de tiamina causa distúrbios na marcha.

FIGURA 16 – Motricidade e aprendizado dos animais deficientes em tiamina.

FIGURA 17 – Morfometria da camada granular do cerebelo.

FIGURA 18 – Deficiência de tiamina durante a gestação causa baixo peso corporal e encefálico em ratos nascidos de mães deficientes.

FIGURA 19 - Deficiência de tiamina, durante a gestação, conduz a morte de neurônios granulares do cerebelo mantidos em cultura.

FIGURA 20 – Deficiência de tiamina provoca diminuição na viabilidade celular.

FIGURA 21 – Deficiência de tiamina durante a gestação induz mudanças nas correntes de potássio de neurônios granulares do cerebelo.

FIGURA 22 – Deficiência de tiamina durante a gestação altera a inativação das correntes de potássio de neurônios granulares do cerebelo.

FIGURA 23 – Densidade de corrente de potássio do tipo A em neurônios granulares do cerebelo é diminuída pela deficiência de tiamina durante a gestação.

FIGURA 24 – Densidade de corrente de potássio, do tipo retificadora retardada, diminui nos neurônios granulares submetidos a deficiência de vitamina B1 durante a gestação.

FIGURA 25 – Deficiência de tiamina *in vivo* aumenta a capacitância dos neurônios granulares de cerebelo.

FIGURA 26 - Micrografias de culturas primárias de células granulares do cerebelo submetidas a deficiência de tiamina *in vitro*.

FIGURA 27 - Deficiência de tiamina *in vitro* altera as correntes de potássio em neurônios granulares do cerebelo.

FIGURA 28 – Deficiência de tiamina *in vitro* altera a inativação das correntes de potássio dos neurônios granulares.

FIGURA 29 – Deficiência de tiamina *in vitro* diminui a densidade de corrente de potássio do tipo A em neurônios granulares do cerebelo.

FIGURA 30 – Deficiência de tiamina *in vitro* não altera a densidade de corrente de potássio do tipo retificadora retardada em neurônios granulares do cerebelo.

Vias Metabólicas que utilizam a tiamina como co-fator enzimático.

FIGURA 31 – Deficiência de tiamina *in vitro* não aumenta a capacitância dos neurônios granulares de cerebelo.

FIGURA 32 – Registros de correntes de potássio para subtração do componente retificador retardado.

FIGURA 33 – Densidade de corrente em função da voltagem para as correntes do tipo A.

FIGURA 34 – Caracterização cinética do mecanismo de ativação da  $I_A$  em neurônios granulares do cerebelo.

FIGURA 35 – Dependência de voltagem para o estado-estacionário a ativação.

FIGURA 36 – Caracterização da constante de tempo de inativação.

FIGURA 37 – Dependência de voltagem para a constante de tempo de inativação da corrente tipo-A.

FIGURA 38 – Densidade de corrente do tipo retificadora-retardada.

FIGURA 39 – Fases do potencial de ação nos neurônios granulares do cerebelo.

FIGURA 40 – Deficiência de tiamina causa aumento da excitabilidade celular.

FIGURA 41 – Dependência de voltagem para a constante de tempo de inativação da corrente tipo-A em potenciais abaixo de -30 mV.

FIGURA 42 - Dependência de voltagem para a corrente residual.

FIGURA 43 – Simulação das correntes de potássio tipo-A.

FIGURA 44 – Simulação de potenciais de ação da célula granular do cerebelo.

## LISTA DE TABELAS

TABELA I – Condutâncias para o potássio na célula granular do cerebelo.

TABELA II – Parâmetros cinéticos das condutâncias dependentes de voltagem.

TABELA III – Parâmetros obtidos segundo a equação 10 para o ajuste da relação densidade de corrente versus voltagem (Corrente transiente).

TABELA IV – Parâmetros para o melhor ajuste segundo a equação (10) (Corrente sustentada).

TABELA V – Parâmetros obtidos para o melhor ajuste da relação densidade de corrente versus voltagem segundo a equação 10 (Corrente transiente).

TABELA VI – Parâmetros obtidos para o melhor ajuste da relação densidade de corrente versus voltagem segundo a equação 10 (Corrente sustentada).

TABELA VII – Parâmetros obtidos para o melhor ajuste da relação densidade de corrente versus voltagem segundo a equação 10 (tipo-A).

# SUMÁRIO

## I. REVISÃO DA LITERATURA

1. História e cerebello.....	02
2. Neuroanatomia do cerebello.....	06
3. Cerebello e a motricidade.....	15
4. Complexo vitamínico B.....	18
5. Deficiência de tiamina.....	22
6. Deficiência de tiamina e neurodegeneração.....	25
7. Neurodegeneração e canais para potássio.....	27
8. Canais para potássio no neurônio granular do cerebello.....	28

## II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1. Justificativa.....	33
2. Objetivo geral.....	35
3. Objetivo específico.....	35

## III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais.....	38
2. Cultura de células granulares do cerebello.....	38
3. Estudo bioquímico.....	40
4. Estudo comportamental.....	44
5. Estudo morfológico.....	46

6. Estudo eletrofisiológico.....	49
7. Reconstrução matemática neuronal.....	59
8. Análise estatística.....	61

#### **IV. RESULTADOS**

1. Caracterização do modelo.....	64
2. Animais nascidos de ratas deficientes em tiamina.....	71
3. Neurônios granulares submetidos a deficiência de tiamina <i>in vivo</i> .....	74
4. Neurônios granulares submetidos a deficiência de tiamina <i>in vitro</i> .....	85

#### **V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

1. Discussão.....	113
2. Conclusão.....	121

<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>122</b>
--	------------

## **REVISÃO DA LITERATURA**

## HISTÓRIA E CEREBELO

O cerebelo foi diferenciado do cérebro por Aristóteles, no século 4 (quatro) A.C. Um século mais tarde Erasistratus disse que animais velocistas, como a lebre, o veado, entre outros, tinham um cerebelo mais complexamente “dobrado” do que animais que fossem menos ativos. Esta pode ter sido a primeira tentativa de aliar o órgão cerebelar à função motora, mas sua teoria enfrentou imensa crítica, pois, animais como, o bicho preguiça e o boi tinham cerebelo tão complexo quanto o de um veado apesar de apresentarem diferenças significativas quanto ao seu comportamento (Finger, 1994).

No século treze, Guglielmo da Saliceto (1210-1280) um cirurgião da escola de Bolonha, foi talvez o primeiro a sugerir que movimentos voluntários se originavam no “cérebro”, entretanto movimentos “naturais e necessários” originavam-se no “cerebelo” (Giannitrapani, 1967). Em 1664, Thomas Willis propôs que o órgão de pensamento era o cérebro e que o cerebelo era o órgão responsável por funções motoras involuntárias. O livro de Thomas Willis, *Cerebri anatome*, foi considerado o mais completo e acurado livro do sistema nervoso, no tempo em que foi publicado. Este livro estimulou as pesquisas, e as idéias entre o cerebelo e as funções vitais corporais involuntárias foram assunto de verificações experimentais (Finger, 1994).. Experimentos foram realizados durante o século XVII e na primeira década do século XIX, postulando diferentes teorias sobre a função cerebelar. O cerebelo aparentemente estaria ligado a movimentos voluntários (Jacob Ackermann: 1765-1815 e Adam Eschenmayer: 1768-1852), intelecto (Michele Malacarne: 1744-1816), centro de sensação



comum – *sensorum commune* (Achille Louis Foville: 1799-1878 e Philippe Pinel: 1745-1826), vontade (Alexander Walker: 1721-1786 e Johann Grohmann: 1769-1847), sítio do instinto animal (Phillip Franz Von Walther: 1782-1849) e teria um importante papel na excitação sexual (Franz Joseph Gall: 1758-1828), contudo estes fatos foram baseados em observações precoces e imaturas (Finger, 1994).

Em 1809, Luigi Rolando que trabalhou com diferentes partes do encéfalo de animais descreveu em um de seus experimentos a presença de convulsões severas e distúrbios do controle motor. Ele também observou que quando a lesão era feita em um lado do cerebelo, o comprometimento era ipsilateral ao dano. As lesões ocasionadas por Rolando e as observações comportamentais eram visivelmente toscas, contudo os resultados de “fraqueza”, paralisia e instabilidade depois da lesão cerebelar ligaram a função do movimento muscular a esta estrutura, e distinguiu o estado de estupor que seguia as lesões corticais de grande amplitude. Mais tarde com experimentos mais precisos, Marie-jean-Pierre Flourens (1824) confirmou os experimentos feitos por Rolando, ou seja, ele não observou mudanças nas funções vitais e intelectuais após lesões cerebelares mas sim mudanças motoras. Flourens realçou que o cerebelo possuía grande capacidade de regeneração após pequenas lesões (Finger, 1994).

Estes achados derrubaram as teorias, as quais diziam que o cerebelo era um órgão de sensibilidade e estava relacionado com funções intelectuais, que era o centro de memória e que era responsável pelas funções vitais.

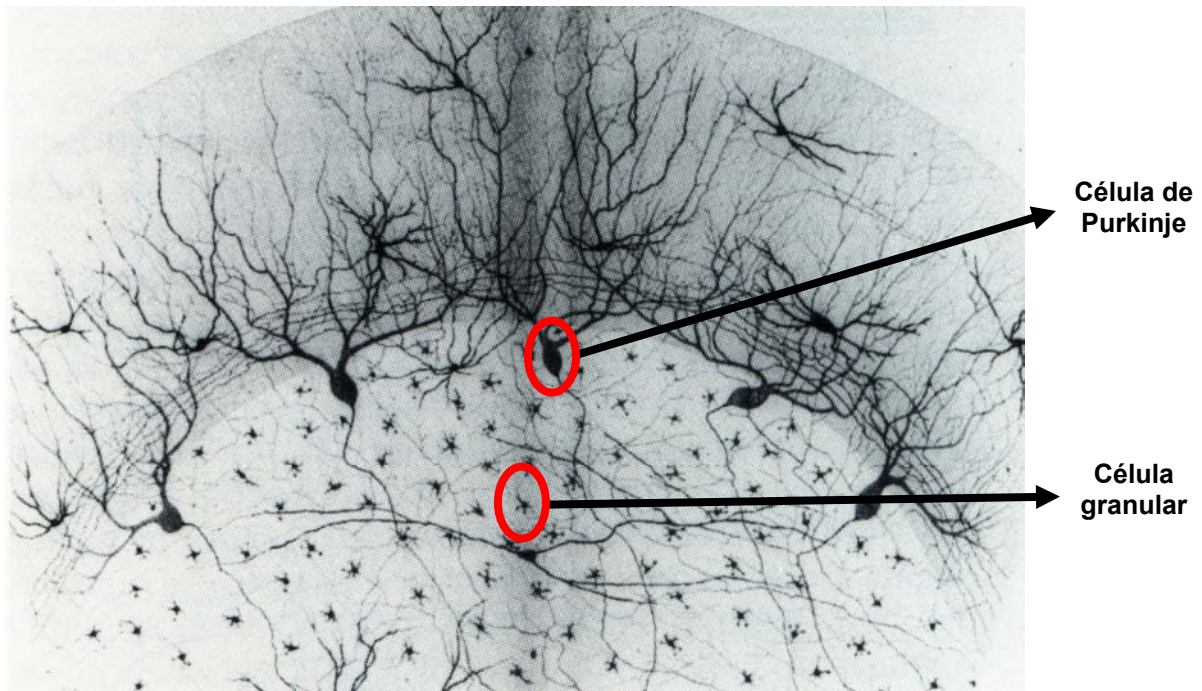
No ano de 1824, outro pesquisador também postulava sobre seus achados. François Magendie observou movimentos rotacionais após lesões unilaterais cerebelares, e concluiu que o cerebelo era responsável pelo equilíbrio. Magendie relatou tal fato a Jean-Baptiste Bouillaud, que tinha observado, em 1827, que pacientes com comprometimentos cerebelares tinham dificuldades de postura, posicionamento e locomoção. As idéias propostas por Rolando, Flourens e Magendie tinham diferenças, mas todas se associavam ao controle motor (Finger, 1994).

Até a metade do século XIX as idéias de que o cerebelo estaria relacionado com o controle motor, e que estavam melhor fundamentadas, tinham sido postuladas por Flourens, assim John Call Dalton (1825-1889) repetiu alguns experimentos de Flourens em pombos. Dalton encontrou irregularidades no modo de andar, na postura, nos movimentos de pescoço e asa; além disso, se houvesse remoção total do cerebelo o animal não podia ficar de pé, nem andar, nem voar; Dalton também observou que quanto maior era a lesão neuronal, maior era o comprometimento. Ele certificou-se que os sinais e sintomas que o pombo apresentou não decorriam de paralisia, pois o animal apresentava, frequentemente, contrações vigorosas. Concluiu-se então que isto ocorria por perda ou diminuição da coordenação. Dalton também observou a recuperação que o sistema possuía, quando lesões de pequena extensão eram realizadas, entretanto sempre permanecia alguma perda (Finger, 1994).

Em paralelo, aos experimentos funcionais de Dalton, os trabalhos de Rolando, Flourens e Magendie também estimularam os estudos morfológicos e

incitaram o entendimento das estruturas cerebelares, assim em 1837, Jan Purkyně (1787-1869) descreveu as células de Purkinje. Mais tarde, no final deste mesmo século, Camilo Golgi (1843-1926) e Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), através da técnica de “fixação de Golgi”, contribuíram para o conhecimento da estrutura celular complexa do cerebelo (Finger, 1994) [Figura 1].

No início do século XX já estava bem estabelecido que o cerebelo era essencial para a suavidade e efetividade dos movimentos, assim, os pesquisadores tentaram explicar melhor a função cerebelar. Charles Sherrington via esta estrutura como um gânglio encefálico do sistema proprioceptivo, que recebia impulsos das articulações, tendões, músculos e labirinto. No âmbito clínico, foi descrita a natureza e faixa de déficits clínicos seguindo a lesão cerebelar como, por exemplo, Joseph Babinski (1857-1932) dissertou sobre o papel do cerebelo no equilíbrio. Ele definiu isto como a habilidade de manter a postura ereta sem inclinar-se ou oscilar para o lado. Babinski criou o termo *adiadococinese* para descrever a perda de habilidade para direcionar movimentos voluntários rápidos e sucessivos depois do dano cerebelar (Finger, 1994).



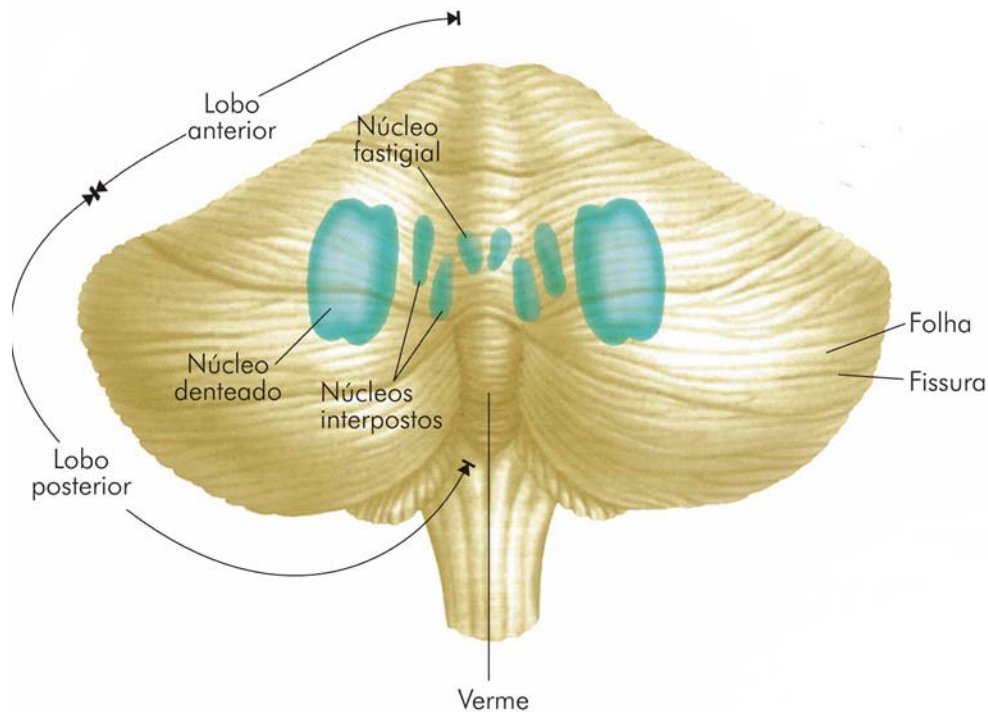
**Figura 1 - Citoarquitetura cerebelar.** Figura original de Camilo Golgi (1886), mostrando as células no cerebelo impregnadas por prata (Finger, 1994).

Os estudos desta estrutura conduziram a um melhor conhecimento de sua função e arquitetura, hoje se sabe muito sobre a neuroanatomia, morfologia e fisiologia do cerebelo, contudo muito dos mecanismos de funcionamento e plasticidade deste sistema permanecem sem resposta ou ainda desconhecidos (Apps and Garwicz, 2005; Ohshima *et al.*, 2003)

## **NEUROANATOMIA DO CEREBELO**

O cerebelo apresenta uma superfície externa que é denominada de córtex cerebelar (esta é a superfície cinza do cerebelo) e é formada, basicamente, por corpos neuroniais. Ele possui uma substância mais interna que é chamada de substância branca ou corpo medular, são as fibras de aferências

e eferências cerebelares; e também possui três pares de núcleos profundos: núcleo fastigial, núcleo interpósito (que é dividido em globoso e emboliforme) e núcleo dentado (Machado, 1988; Shumway-cook and Woollacott, 1995) [Figura 2].

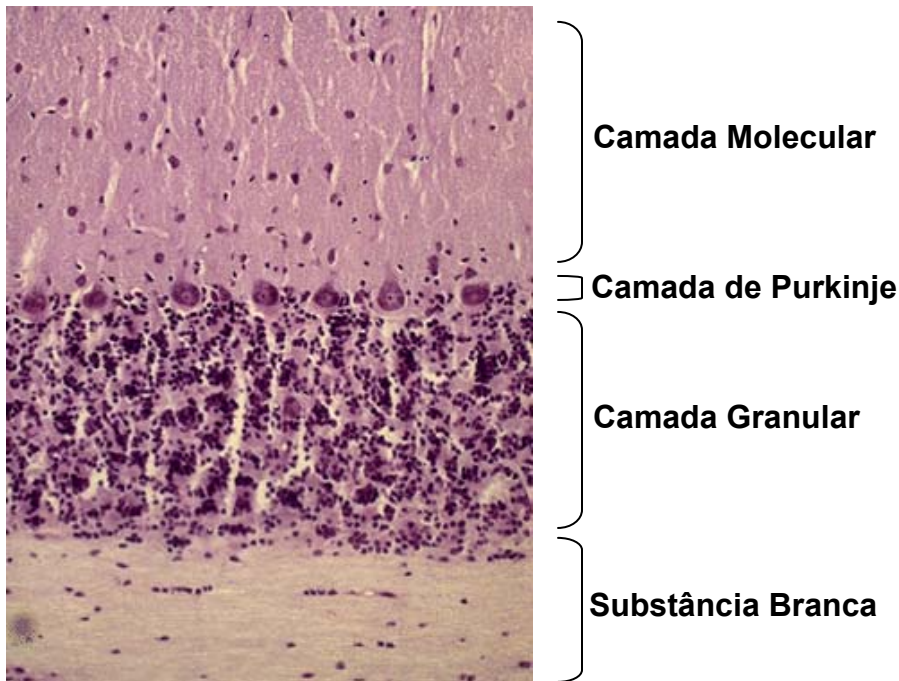


**Figura 2 - Núcleos profundos do cerebelo.** Internamente, no cerebelo, existem grupamentos de neurônios aos quais chamamos núcleos. Os núcleos cerebelares são em número de 4 pares; dois mediais – núcleo fastigiais, dois intermediários – núcleos interpósito (globoso e emboliforme) e dois laterais – núcleos dentados (Lent, 2001).

No córtex cerebelar existem camadas, que geralmente levam o nome de suas células predominantes, e são divididas em: camada molecular, camada de células de Purkinje e camada granular [Figura 3]. As células de Purkinje são piriformes e grandes, sendo que seus dendritos se ramificam na camada

molecular e seus axônios correm em sentido oposto terminando nos núcleos profundos do cerebelo (Machado, 1988) [Figura 4]. A camada molecular é formada basicamente por fibras, tendo poucos neurônios, sendo os principais os neurônios em cesto. Seus axônios cursam paralelamente à superfície cerebelar e emitem uma grande quantidade de colaterais, em ângulo reto, que englobam as células de Purkinje, como se fossem “cestos” (Machado, 1988). Assim as células em cesto unem várias células de Purkinje, em um plano perpendicular à superfície cerebelar, em um circuito em série.

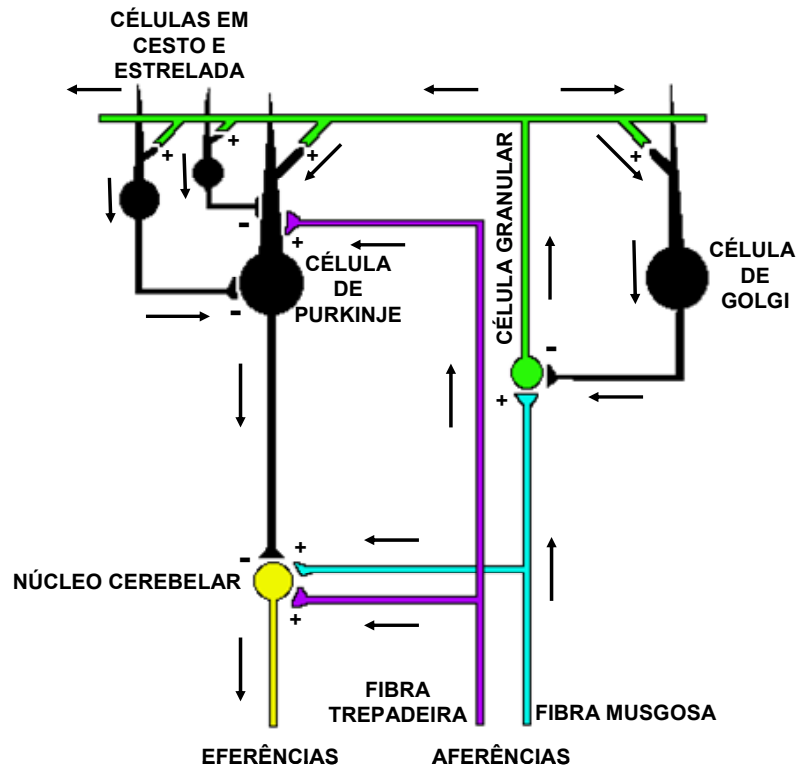
A camada granular é constituída de células granulares, que são muito pequenas (5 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e extremamente numerosas no cerebelo humano ( $10^{10}$ - $10^{11}$ ) (Ito, 2006; Mulholland, 2006). Estas células possuem axônios que atravessam a camada de Purkinje e ao atingirem a camada molecular bifurcam-se em T, as chamadas fibras paralelas, que estabelecem sinapses com os dendritos das células de Purkinje, células em cesto, células estreladas e de golgi (Machado, 1988; Lent, 2001; Shumway-cook and Woollacott, 1995) [Figura 4]. A camada granular contém outro tipo de células, as células de Golgi, que possuem ramificações amplas, contudo são pouco numerosas (Machado, 1988).



**Figura 3 – Camadas do córtex cerebelar.** O córtex cerebelar é dividido em três camadas, as quais levam o nome de suas células predominantes.

As aferências cerebelares ocorrem através de dois tipos de fibras, as musgosas e as trepadeiras. As fibras trepadeiras têm seus corpos celulares na oliva inferior e exercem ação excitatória sobre as células de Purkinje, enquanto as musgosas representam as demais aferências cerebelares, fazendo sinapses com as células granulares. As fibras musgosas se ramificam ao seu término, para tentar fazer a maior quantidade de sinapses, assim os impulsos das fibras musgosas chegam às células de Purkinje, as células em cesto e estreladas por intermédio das células granulares. As células em cesto exercem uma ação inibitória sob a célula de Purkinje, enquanto a granular ação excitatória. Portanto na superfície do cerebelo existem grupos de células de Purkinje que são ativadas pelas fibras paralelas (célula granular) e outros grupos que são inibidos

pelas células em cesto. As células de Purkinje se dirigem aos núcleos profundos e depois vêm a formar a via eferente do cerebelo [Figura 4].



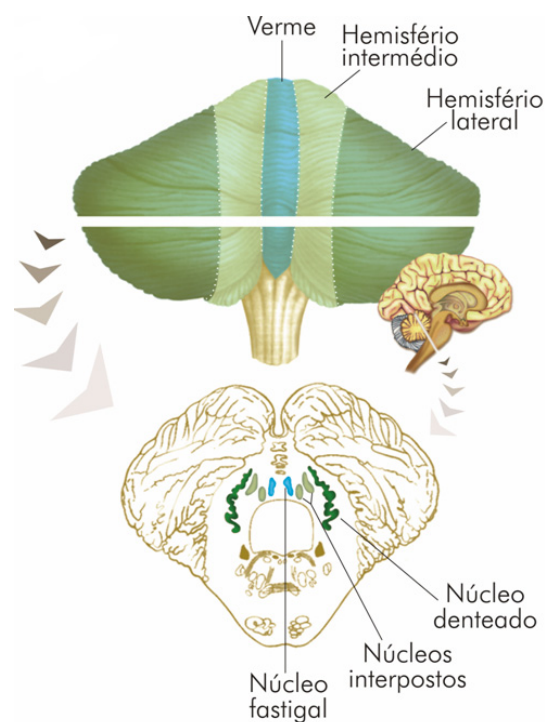
**Figura 4 – Circuito do córtex cerebelar.** O esquema mostra o circuito cortical cerebelar de forma esquemática. As informações chegam ao cerebelo através de duas aferências: as fibras musgosas e trepadeiras. As fibras musgosas fazem sinapse com um grande número de células granulares as quais retransmitem as informações a outras células adjacentes. As células granulares são as únicas células excitatórias do cerebelo, tendo como neurotransmissor principal o glutamato.

Todas as aferências cerebelares se dirigem primeiramente para um dos três núcleos profundos e para o córtex cerebelar. E todas suas eferências se dirigem para um núcleo profundo para então se redirecionarem ao córtex cerebral ou tronco encefálico (Shumway-cook and Woollacott, 1995).



No cerebelo existem três zonas distintas de acordo com sua classificação funcional [Figura 5]:

1. lobo flóculo-nodular (arquicerebelo): correlaciona-se com o sistema vestibular, zona mais antiga;
2. Vermis e Hemisfério intermediário (paleocerebelo);
3. Hemisfério lateral (neocerebelo).



**Figura 5 – Zonas cerebelares.** O cerebelo é classificado em três zonas distintas de acordo com sua funcionalidade: uma mais antiga chamada arquicerebelo (lobo flóculo-nodular – não demonstrada), uma de idade intermediária chamada paleocerebelo (vermis e hemisfério intermediário) e uma mais recente chamada neocerebelo (hemisfério lateral). Quanto mais complexos os movimentos de um determinado animal maior será seu cerebelo, principalmente, seu hemisfério lateral (Lent, 2001).

### 1. Lobo flóculo-nodular [Figura 6 – painel esquerdo]

Esta estrutura recebe aferências do sistema visual e vestibular, e suas aferências se dirigem ao núcleo vestibular, após passar pelo núcleo fastigial. O lobo flóculo-nodular também pode ser chamado vestibulo-cerebelo.

O lobo floculo-nodular funciona no controle dos músculos axiais e no controle do equilíbrio. Se houver lesão nesta área o animal ou indivíduo apresenta distúrbios do equilíbrio e da postura contra a gravidade.

### 2. Vermis e Hemisfério intermediário [Figura 6 – painel intermediário]

Estas estruturas apresentam aferências proprioceptivas e cutâneas da medula espinhal (trato espino-cerebelar), além de informações visuais, vestibulares e auditivas. Este lobo é também chamado de espino-cerebelo .

Esta parte do cerebelo tem suas aferências passando pelo núcleo fastigial (vermis) e núcleo interpósito (hemisfério intermediário). As informações que saem deste lobo se direcionam para o núcleo rubro (mesencéfalo) e formação reticular (tronco encefálico).

Existem quatro (4) tratos espino-cerebelares, os quais retransmitem informações (propriocepção inconsciente) da medula espinhal para o cerebelo. Dois tratos informam sobre os membros superiores e pescoço e os outros dois sobre o tronco e membros inferiores, estes tratos formam as fibras musgosas. Há também, aferências que passam pelo trato espino-olivo-cerebelar, através do núcleo olivar inferior (fibras trepadeiras), eles estão presentes e são descritos de extrema importância para o aprendizado.

As eferências desta região do cerebelo se dirigem para os núcleos do sistema descendente medial (núcleo vestibular, formação reticular e colículo superior) e lateral (núcleo rubro).

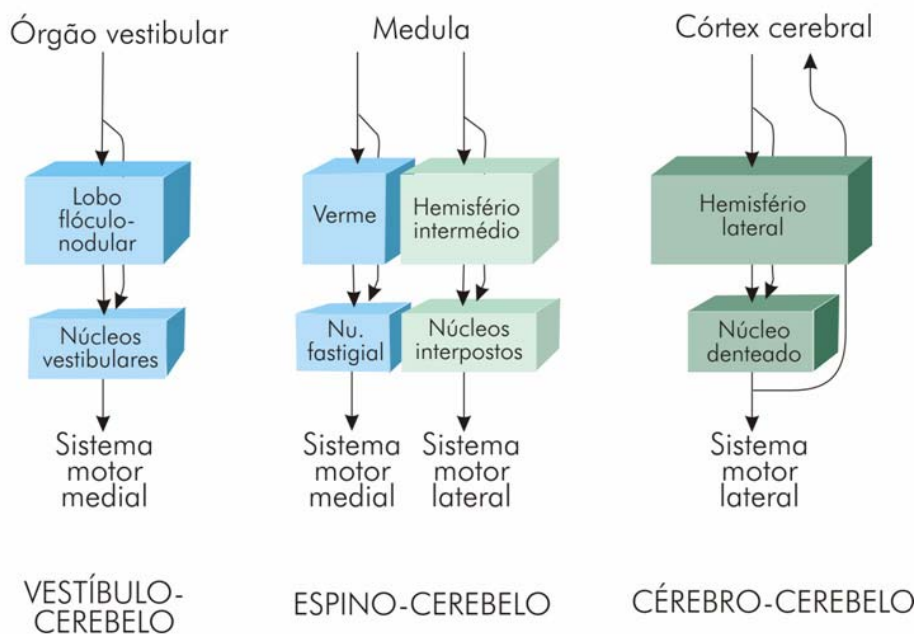
As principais funções do vermis e hemisfério intermediário são: funcionar como controladores da execução imediata do movimento, eles parecem corrigir desvios do movimento pretendido através da comparação da retroalimentação da medula espinhal e o comando motor pretendido. Portanto ajustam a execução do movimento via informação de retroalimentação. Estas áreas também modulam o tônus muscular, através da atividade excitatória contínua do núcleo interpósito e fastigial. Lesões nesta área levam o indivíduo a apresentarem erros de execução motora.

Os núcleos interpósito e fastigial, também, modulam a atividade dos motoneurônios  $\gamma$  para o fuso muscular. Quando estes núcleos são lesados há uma perda considerável de tônus muscular (hipotonia).

### 3. Hemisfério lateral [Figura 6 – painel direito]

É a área mais lateral do hemisfério cerebelar, também chamada de neocerebelo ou cérebro-cerebelo. Ela recebe aferências do córtex frontal (regiões motoras e cognitivas), córtex parietal (regiões somestésicas e associativas) e córtex occipital (área V5 – responsável pela percepção visual dos movimentos). Suas eferências são para o tálamo (núcleo ventral-lateral), córtices motor e pré-motor.

Esta parte do cerebelo funciona na preparação do movimento, isto é, parece que esta estrutura participa no planeamento do córtex motor para a execução do movimento. Este hemisfério parece funcionar na coordenação do movimento em andamento, integrando informações sensoriais com os comandos de origem cognitiva. Lesões nesta área provocam distúrbios de planeamento motor, alterando os movimentos voluntários e movimentos automáticos aprendidos; além de causar distúrbios de natureza mental.



**Figura 6 – Esquema das zonas cerebelares e suas funções motoras.** O cerebelo atua no controle do movimento através de um sistema organizado internamente quanto a suas eferências, núcleos cerebelares e aferências (Lent, 2001).

## O CEREBELO E A MOTRICIDADE

O cerebelo é uma das mais importantes regiões para o controle do movimento, juntamente com o córtex motor e gânglios da base. O cerebelo recebe aferências de quase todo sistema sensorial, para então desempenhar o papel de regulador das eferências dos circuitos neuronais motores. Este ajuste, provavelmente, dá-se através de um circuito neuronal que juntamente com as demais conexões intracerebelares parecem comparar e compensar intenção com performance (Nair *et al.*, 2003; Shumway-cook and Woollacott, 1995; Bear *et al.*, 1996). O cerebelo também está envolvido no aprendizado procedural, memória obtida através da repetição do movimento e portanto relacionado com a execução de comportamentos e tarefas (Bear *et al.*, 1996; Ito, 2002; Ohyama *et al.*, 2003; Schweighofer, 1998).

O cerebelo possui duas vias aferentes: as fibras trepadeiras e as fibras musgosas, e somente uma eferência, as fibras de Purkinje. As fibras trepadeiras se conectam diretamente com as fibras de Purkinje, sinalizando erros de movimento, portanto sua participação na correção do movimento é bastante importante. Em contrapartida, as aferências das fibras musgosas sinalizam informações cinestésicas sobre o movimento que está sendo executado, assim, são importantes no controle do mesmo. Estas fibras nervosas fazem sinapse com as células granulares ao entrarem no cerebelo (Machado, 1988; Shumway-cook and Woollacott, 1995).

Quase todas eferências cerebelares são excitatórias, exceto algumas que se projetam para o núcleo olivar inferior. As eferências cerebelares dirigem

informações aos núcleos motores e partem de um núcleo cerebelar profundo. Os núcleos profundos do cerebelo possuem em sua organização uma somatotopia ipsilateral do corpo (Lent, 2001).

Os núcleos vestibulares fazem parte do sistema medial do comando motor, participando dos ajustes posturais propiciados pelas informações que provêm do labirinto. Sendo assim, os disparos das células de Purkinje normalmente inibem a ação motora dos tratos vestibulo-espinhal. Por esta razão lesões do vestibulo-cerebelo causam marcha e postura atáxicas. Outro substrato neural que forma o sistema medial do comando motor é a formação reticular que recebe aferências dos núcleos fastigiais, assim uma lesão nestes núcleos causa a perda da inibição cerebelar, causando movimentos axiais atáxicos. O sistema medial também é formado pelo colículo superior e suas eferências. O colículo recebe fibras do núcleo fastigial, portanto lesões no espino-cerebelo causam movimentos oculares anormais (nistagmo patológico). Pode-se então concluir que o espino-cerebelo controla o sistema descendente medial do comando motor, seja promovendo a manutenção do equilíbrio ou nos ajustes do tônus muscular provocados pela posição da cabeça e do soma (Lent, 2001).

Os núcleos interpósitos também fazem parte do espino-cerebelo, contudo suas eferências se dirigem para o núcleo rubro, que faz parte do sistema descendente lateral do controle motor. Assim indivíduos com lesões nos núcleos interpósitos (espino-cerebelo) apresentam movimentos atáxicos nos membros, conferindo incoordenação aos movimentos apendiculares. Acredita-se que esta função de natureza corretiva seja realizada através da estabilização dos reflexos

de estiramento, por meio das vias descendentes que terminam nos motoneurônios da medula espinhal (Lent, 2001; Shumway-cook and Woollacott, 1995).

Enfim, os núcleos denteados enviam aferências para o córtex motor através do núcleo talâmico ventro-lateral, estabelecendo um circuito de retroalimentação capaz de modular os comandos que o córtex motor emite para a realização dos movimentos voluntários. Movimentos estes que se fazem através das partes distais dos membros se equivalendo a movimentos precisos e finos, e que envolvem muitas articulações. Indivíduos que têm lesões do cérebro-cerebelo (onde se localiza o núcleo denteado) ocasionam distúrbios de motricidade evidenciando incapacidade da combinação de movimentos das diversas partes do corpo em um mesmo movimento complexo (assinergia) e erros de execução espacial dos movimentos (dismetria) (Lent, 2001; Shumway-cook and Woollacott, 1995).

Recentemente mostrou-se que o cerebelo está envolvido em funções cognitivas, como linguagem, aprendizados de movimentos complexos, execução de movimentos com conteúdo emocional entre outras (Lent, 2001). O aprendizado e memória envolvem estruturas cerebelares. O cerebelo pode adquirir memória e/ou aprendizado motor através da depressão a longo-prazo (LTD) ou potenciação a longo prazo (LTP), em ambas os neurônios granulares estão envolvidos. Comprometimentos nestes neurônios podem afetar a intenção e a coordenação dos movimentos (Boyden and Raymond, 2003; Boyden *et al.*,

2004; Ito, 2002; Ito, 2006; Nieus *et al.*, 2006; Ohyama *et al.*, 2003; Schweighofer, 1998)

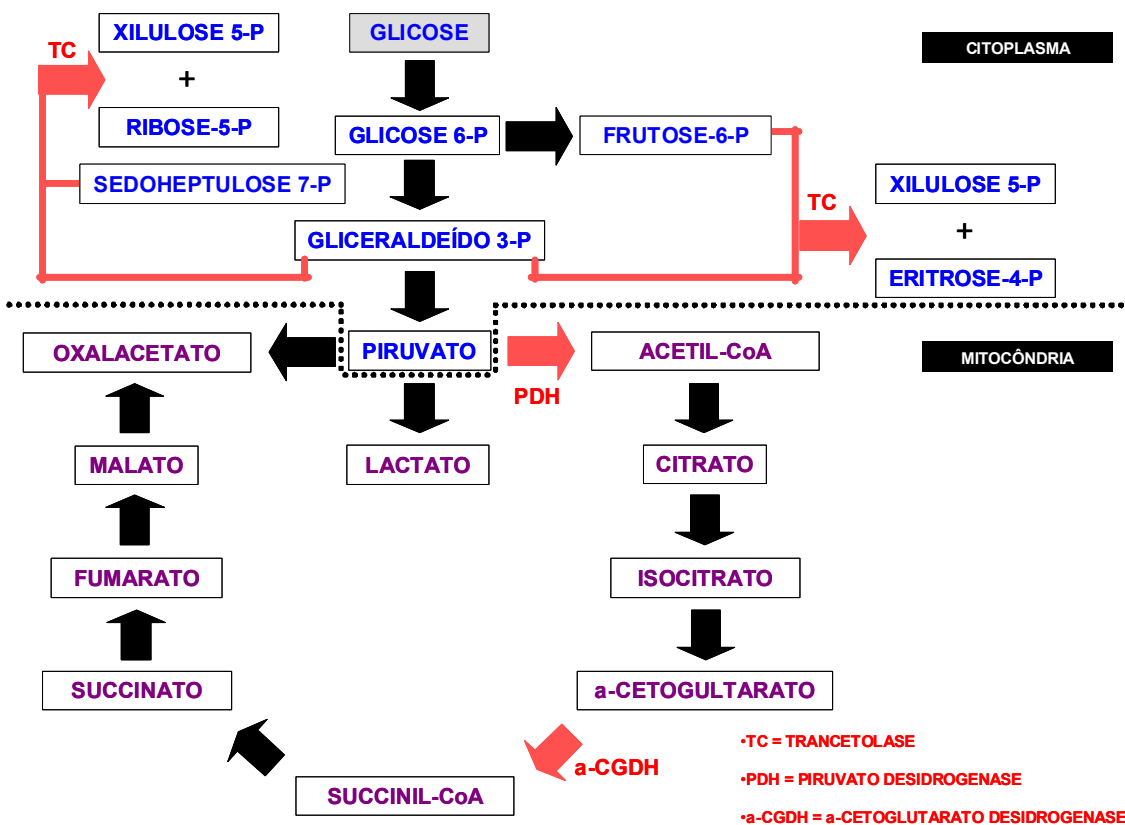
## **COMPLEXO VITAMÍNICO B**

O complexo vitamínico B, citado por WALTER *et al.* (1996) inclui tiamina (B<sub>1</sub>; única sensível ao calor), riboflavina, niacina e piridoxina (B<sub>6</sub>); já ELLIOT *et al.* (1995) inclui mais algumas além das anteriores, são elas: nicotinamida, ácido pantotênico, ácido p-aminobenzóico, inositol, colina, biotina e ácido fólico, mas não cita a niacina. Elas estão distribuídas em vários gêneros alimentícios, sendo a fonte mais rica os cereais, especialmente o arroz (Walter and Talbolt, 1996).

A vitamina B<sub>1</sub> é essencial para o homem, tem um aspecto incolor e é solúvel em água. Geralmente é degradada pela pressão de cozimento e autoclavagem (Cook, 1996; Elliot *et al.*, 1995). O organismo humano não pode produzir tiamina, assim sua ingestão faz-se necessária (Martin *et al.*, 2003). Ela é armazenada no cérebro, fígado, rins e músculos, principalmente no músculo cardíaco normal; e é excretada na urina (pois o rim concentra-a do plasma) ou leite, mas não nas fezes (Cook, 1996; Singleton and Martin, 2001).

A vitamina B<sub>1</sub> (tiamina difosfato) age como co-fator para várias enzimas do metabolismo de carboidratos, são elas: a transcetolase, a piruvato desidrogenase e a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (Stryer *et al.*, 2004) [Figura 7].

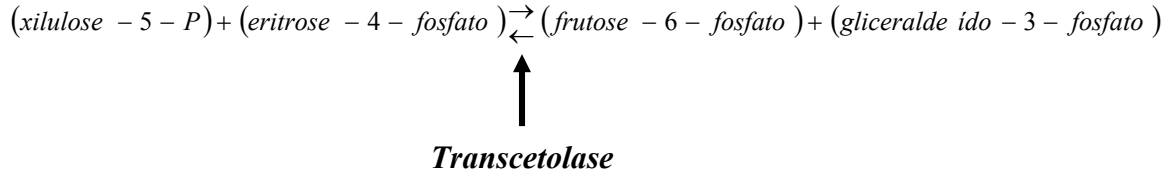




**Figura 7 – Vias Metabólicas que utilizam a tiamina como co-fator enzimático.** A tiamina atua como co-fator para três enzimas importantes do metabolismo de carboidratos, são elas a transcetolase, α-cetogultarato desidrogenase e piruvato desidrogenase. Sendo que a reação envolvendo a transcetolase ocorre no citoplasma celular e as reações envolvendo as outras duas enzimas ocorrem dentro da mitocôndria. As setas vermelhas indicam as reações que envolvem as enzimas dependentes de tiamina.

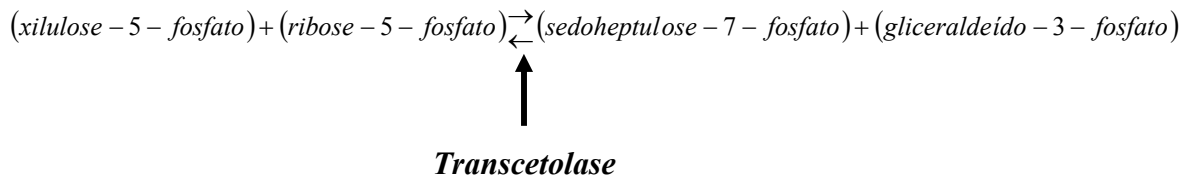
A transcetolase é uma importante enzima na via das pentoses. Nesta via uma molécula de frutose-6-fosfato, a qual deriva da glicose-6-fosfato, é modificada pela ação da transcetolase formando dois produtos xilulose-5-fosfato e eritrose-4-fosfato [Figura 7; equação 1].

Equação (1)



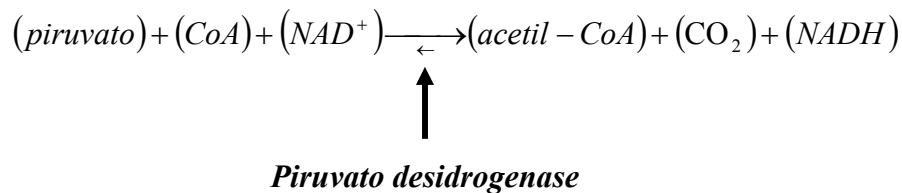
A transcetolase também atua na reação da ribose-5-fosfato juntamente com a xilulose-5-fosfato formando sedoheptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato [Figura 7; equação 2].

Equação (2)

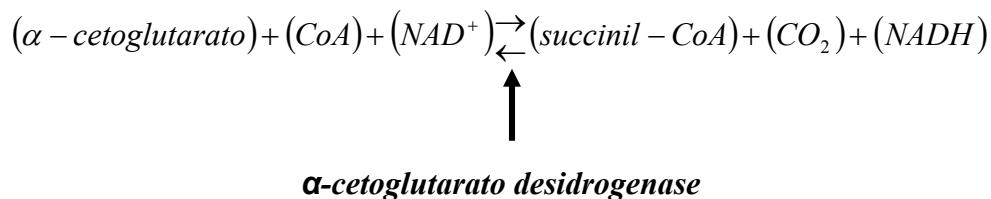


As outras duas enzimas que requerem tiamina são a piruvato desidrogenase e a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, que participam na transformação do piruvato em acetil-CoA e no ciclo do ácido cítrico, respectivamente [Figura 7; equações 3 e 4].

Equação (3)



Equação (4)



A falta da tiamina leva ao comprometimento da atividade da transcetolase, prejudicando a síntese de ácidos nucleicos pela falta da molécula de ribose-5-fosfato. Já a falta de NADPH leva ao comprometimento das reações químicas que utilizam átomos de hidrogênio para a produção de esteróides, ácidos graxos, aminoácidos, certos neurotransmissores, bem como glutatona (importante contra o estresse oxidativo) (Andersen, 2004; Butterworth, 1982; Martin *et al.*, 2003; Stryer *et al.*, 2004). Aparentemente a transcetolase parece ser a enzima mais sensível a deficiência de tiamina (Martin *et al.*, 2003).

O desequilíbrio causado pelo comprometimento da piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase pode levar ao aumento nos níveis de piruvato e lactato. Outra consequência deste comprometimento é a queda da taxa de ATP, pois, na mitocôndria, através do ciclo do ácido cítrico, são produzidos equivalentes redutores (NADH), os quais são oxidados na cadeia respiratória e servirão para estimular o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso, criando um gradiente eletroquímico. Este gradiente estimula a enzima ATP-sintase a sintetizar ATP no fim da via, fornecendo energia para numerosas reações celulares. Portanto a falta da piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase pode levar a diminuição da produção de NADH, conseqüentemente a redução da síntese de ATP, o que contribui para desencadear o processo de morte celular. Estas enzimas também são essenciais para a produção de aminoácidos e neurotransmissores, como por exemplo, glutamato e GABA (Butterworth, 1982; Martin *et al.*, 2003). A tiamina é absorvida pelo trato gastrointestinal, depois de

ingerida, e é levada aos tecidos através da corrente sanguínea para então ser transportada para dentro das células. Para chegar até o tecido cerebral há a necessidade da passagem pela barreira hemato-encefálica. Após estar no citoplasma a tiamina requer transporte até a mitocôndria (sítio de ação da piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase) e núcleo; onde, respectivamente, realiza a produção de energia e regulação da expressão gênica (Martin *et al.*, 2003). A tiamina é transportada para dentro das células de um tecido por transportadores específicos (Martin *et al.*, 2003).

Já dentro da célula ela sofre a adição de um ou mais grupos fosfato chegando em sua forma ativa, a tiamina difosfato (Martin *et al.*, 2003). Ela parece pode estar associada, como tiamina trifosfato, à propagação do potencial de ação neuronal e parece ser liberada de terminações nervosas intactas, contudo este mecanismo é incerto (Butterworth, 1982).

A vitamina B<sub>1</sub> está no tecido na forma fosforilada (difosfotiamina), logo se o tecido cerebral usa glicose como principal fonte de energia é neste tecido que o metabolismo de carboidratos fica demasiadamente retardado pela deficiência de tiamina.

## **DEFICIÊNCIA DE TIAMINA**

Em humanos a deficiência de tiamina causa beribéri, embora existam evidências que fatores genéticos possam estar envolvidos, a carência de vitamina B<sub>1</sub> é comprovadamente seu maior fator causal (Martin *et al.*, 2003; Mulholland, 2006; Singleton and Martin, 2001). Os primeiros sintomas são:

imprecisão motora, perda de peso, fraqueza, edema e parestesias (Martin *et al.*, 2003; Mulholland, 2006). Se houver persistência da deficiência de tiamina há conseqüências sobre o sistema nervoso e cardiovascular (Walter and Talbolt, 1996). O período que se desenvolve o beribéri no homem submetido a uma dieta deficiente em vitamina B<sub>1</sub> é de aproximadamente 80 a 90 dias (Cook, 1996), contudo a deficiência de tiamina, no rato, já é evidente a partir do 17<sup>o</sup> dia (Warnock, 1970) mostrando sinais neurológicos a partir de 35 a 45 dias de deficiência (Butterworth, 1982).

Quando o sistema cardiovascular está envolvido a doença é chamada de *wet beribéri*, sendo caracterizada por insuficiência cardíaca. Na forma crônica o acúmulo de ácido láctico e outros agentes químicos vasodilatadores causam vasodilatação periférica que conduz a uma rápida falência cardíaca (Cook, 1996; Walter and Talbolt, 1996).

Um problema sério e que precisa ser chamado a atenção é o beribéri infantil, que ocorre em crianças que nascem e se amamentam de mães que se apresentam deficientes em tiamina (especialmente se as mães ingerem dieta rica em carboidratos), ou ainda em crianças que possuam uma dieta pobre em vitamina B<sub>1</sub> (Hahn *et al.*, 1998; San Sebastian and Jativa, 1998). É provável que o beribéri infantil possa ocorrer, ou ser agravado, não só pela falta de vitamina B<sub>1</sub> na mãe, mas também pelos produtos tóxicos produzidos (principalmente methyl-glyoxal) (Phillips and Thornalley, 1993; Shangari *et al.*, 2005), e que estão sendo ingeridos pela criança através da amamentação.

Quando o beribéri atinge o sistema nervoso a característica marcante desta forma é a neuropatia periférica, sendo esta condição chamada de *dry beribéri*. Dormência e anestesia são os resultados deste dano nervoso, embora fraqueza e perda muscular sejam os efeitos do envolvimento do nervo motor. O paciente geralmente fica prostrado (Walter and Talbolt, 1996).

Outro efeito da falta da tiamina é a encefalopatia de Wernicke. A encefalopatia de Wernicke foi primeiro descrito por Wernicke em 1881 como: “polioencefalite hemorrágica aguda superior” citado por ELLIOT et al.; (1995). Ela pode ocorrer juntamente com o beribéri, é invariavelmente encontrada em alcoólatras (Martin *et al.*, 2003), contudo também pode ser diagnosticada em crianças (Vasconcelos *et al.*, 1999). Esta patologia manifesta-se por distúrbios de consciência, ataxia, nistagmo, e em casos fatais são encontradas lesões no terceiro e quarto ventrículo e no aqueduto cerebral. Os corpos mamilares estão freqüentemente envolvidos, e quase sempre demonstram notável hemorragia. Na histologia há dilatação e proliferação de capilares e também alguns astrócitos e proliferação microglial, podendo haver mudanças degenerativas nos neurônios (Walter and Talbolt, 1996).

O tratamento de beribéri e encefalopatia de Wernicke é a administração de tiamina, que tem resposta rápida. A forma de beribéri tipo *wet* necessita de tratamento imediato, pois conduz a morte repentina. Por outro lado, na encefalopatia de Wernicke, a demora no tratamento pode conduzir a lesões cerebrais irreparáveis (Butterworth, 1982; Hahn *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 1999; Walter and Talbolt, 1996).

Alterações no sistema nervoso periférico e central de animais podem ser produzidas por uma dieta deficiente em tiamina. Os experimentos que levaram a esta conclusão foram realizados por EIJKMAN e VEDDER (1906 e 1912, respectivamente) que alimentaram pombos com arroz polido, resultando em opistótono, ataxia e paralisia. Estes sinais e sintomas foram associados à degeneração do sistema nervoso periférico e a síndrome – doença como beribéri – “polineurite galinácea” (Elliot *et al.*, 1995).

### **DEFICIÊNCIA DE TIAMINA E NEURODEGENERAÇÃO**

A deficiência em tiamina, tanto em humanos quanto animais, resulta em sintomas neurológicos que, em parte, são revertidos pela administração da vitamina B<sub>1</sub>. Aparentemente, há conjuntos neuroniais que são mais afetados durante a deficiência de tiamina do que outros. A causa para este tropismo ainda não é bem definida, contudo sabe-se que nestas áreas encefálicas há uma taxa de renovação da tiamina muito elevada em comparação as demais. Estas áreas compreendem, principalmente, o cerebelo, a medula e a ponte (Butterworth, 1982).

A deficiência de tiamina causa, de uma maneira geral, perda difusa das células neuroniais, sendo um dos seus alvos principais o cerebelo. O cerebelo apresenta, aparentemente, dois mecanismos de lesão: um irreversível e outro reversível, após a administração de tiamina (Butterworth, 1993). A tiamina atua como co-fator importante para enzimas relacionadas ao metabolismo intermediário, são elas: a transcetolase, o complexo da piruvato desidrogenase e

a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase. A falta deste co-fator causa o mal funcionamento destas enzimas, que pode levar a alterações significativas do metabolismo energético nos diferentes órgãos. A alteração da produção de energia, a disfunção da produção de neurotransmissores, acidose láctica e espécies reativas de oxigênio (ROS) são sugeridas serem as principais causas das deteriorações neurológicas que caracterizam a deficiência de tiamina, contudo estes fatos não foram confirmados (Butterworth, 1982; Hazell *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2003; Pannunzio *et al.*, 2000). Outro fator que poderia afetar a viabilidade neuronal seria a morte de células da glia, principalmente se estes neurônios têm como neurotransmissores o GABA ou o Glutamato, assim as células da glia que desempenham fundamental ação na captação destes neurotransmissores (Butterworth, 1982), deixá-los-ia acumular no espaço extracelular conduzindo a morte neuronal (Antkiewicz-Michaluk *et al.*, 2006).

As mudanças do metabolismo de carboidratos, principalmente as mudanças na enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, podem conduzir a danos mitocondriais que culminam com a morte celular. O mecanismo que conduz a morte celular pelo dano mitocondrial é possivelmente a necrose (Singleton and Martin, 2001), contudo alguns tipos celulares exibem morte celular através de um fenômeno chamado apoptose (Desjardins and Ledoux, 1998).

O estresse oxidativo é sugerido como uma das principais causas e/ou conseqüências das patologias neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer, Parkinson, esclerose amiotrófica lateral (Andersen, 2004) e lesões isquêmicas encefálicas (Sheline and Wei, 2006). A deficiência de tiamina leva a



mudanças no estresse oxidativo em células neuroniais, podendo conduzir a morte por diminuição da atividade de enzimas mitocondriais. A diminuição da atividade enzimática dependente de tiamina leva a uma diminuição do potencial transmembrana mitocondrial e do nível de ATP (adenosina trifosfato) antes da morte neuronal (Sheline and Wei, 2006). Assim intervenções nos mecanismos de degeneração neuronal poderiam melhorar a recuperação das lesões isquêmicas, bem como retardar ou regredir mecanismos degenerativos crônicos em neurônios.

A deficiência de tiamina age diretamente inibindo a ação das desidrogenases mitocondriais, o que poderia levar a produção de radicais livres, consequentemente neurotoxicidade (Mulholland, 2006; Sheline and Wei, 2006). O mecanismo da neurodegeneração neuronal ainda é incerto, contudo ele reflete a combinação de fatores químicos, metabólicos e genéticos (Mulholland, 2006).

## **NEURODEGENERAÇÃO E CANAIS PARA POTÁSSIO**

A tiamina também pode afetar canais iônicos seja por ação direta ou indireta (Houzen and Kanno, 1998; Tallaksen and Tauboll, 2000; Tohse *et al.*, 1998), assim a carência de tiamina pode conduzir a alterações celulares que levam a neurodegeneração através da modulação desta classe de proteínas de membrana (Hazell *et al.*, 1998).

Sabe-se que o envolvimento dos canais para potássio nos processos de neurodegeneração é bastante significativo, podendo até iniciarem este

quadro (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005; Johnston *et al.*, 1998). Os canais para potássio podem tornar uma célula mais susceptível a degeneração ou não, dependendo da sua expressão na membrana (Deutch and Winder, 2006). A expressão destas proteínas também pode fornecer a célula um sensor metabólico que está acoplado a mitocôndria, e poderia estar envolvido nas mudanças intracelulares e início da morte celular (Deutch and Winder, 2006).

Os canais para potássio estão ligados a vários mecanismos celulares incluindo apoptose e o controle da excitabilidade celular (Andersen, 2004; Hille, 2001; Hu *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2000). Mudanças em suas propriedades podem esclarecer, pelo menos em parte, vias intracelulares para possíveis intervenções farmacológicas, bem como elucidar mecanismos de sinais patológicos observados em indivíduos com síndromes neurodegenerativas (Matsukawa *et al.*, 2003; Angulo *et al.*, 2004).

## **CANAIS PARA POTÁSSIO NO NEURÔNIO GRANULAR DO CEREBELO**

Os canais para potássio desempenham um papel crucial no potencial de repouso e excitabilidade neuronal. A modulação destes canais pode determinar a frequência, forma e duração dos potenciais de ação, bem como o fortalecimento sináptico entre neurônios (Hille, 2001). Eles são divididos em três famílias principais: (1) com seis domínios transmembrana - os sensíveis a voltagem e/ou cálcio; (2) com dois domínios transmembrana – retificadores de entrada; e com (3) quatro domínios transmembrana – os canais de vazamento (Mathie *et al.*, 2003).

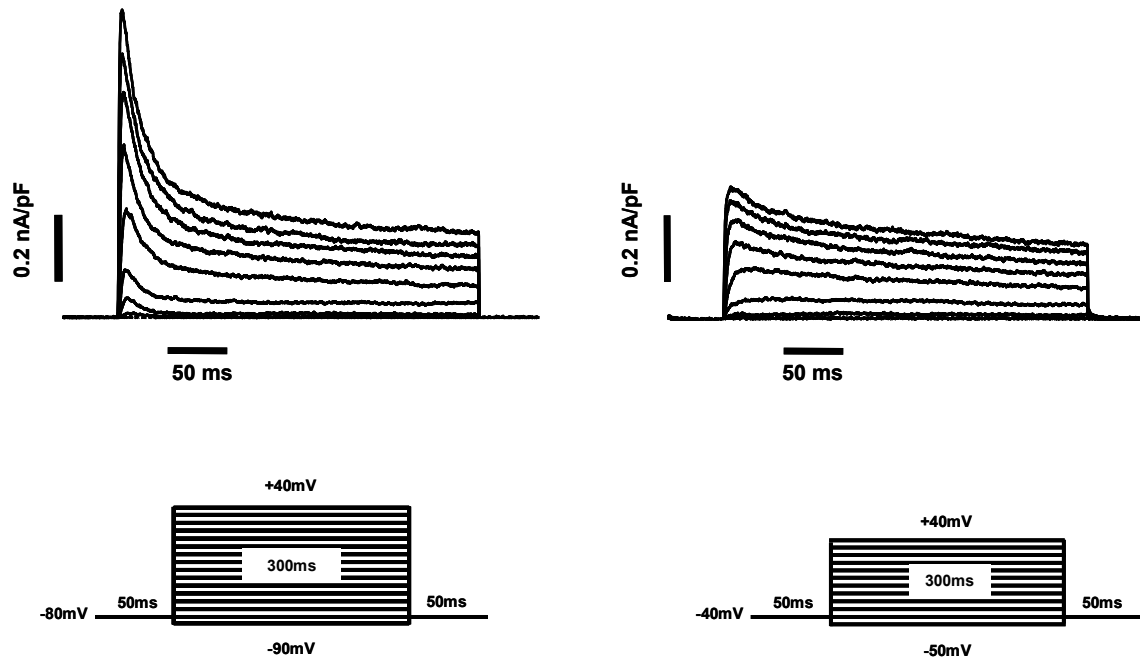
A família de canais sensíveis à voltagem ( $K_V1.x - K_V9.x$ ) incluem os retificadores-retardados e os do tipo-A. Há pelo menos 26 subunidades  $\alpha$ , para canais para  $K^+$ , expressas nos neurônios granulares do cerebelo, contudo as correntes de potássio dos neurônios granulares são bem ajustadas por modelos biofísicos que consideram apenas seis condutâncias distintas [Tabela I] (Mathie *et al.*, 2003; D'Angelo *et al.*, 2001).

**Tabela I – Condutâncias para o potássio na célula granular do cerebelo.**

<b>CANAL</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
<b><math>K_A</math></b>	Dependente de voltagem, com ativação e inativação rápida
<b><math>K_{Ca}</math></b>	Dependente de $Ca^{++}$ intracelular (corresponde ao “Maxi-K”)
<b><math>K_{IR}</math></b>	Retificadora de entrada
<b>TASK</b>	Vazantes
<b><math>K_{lenta}</math></b>	Lenta, independente de cálcio e insensível a tetraetilamônio
<b><math>K_V</math></b>	Dependente de voltagem do tipo retificadora-retardada

D'angelo *et al.*, 2001 e Mathie *et al.*, 2003.

Funcionalmente a corrente de potássio é dividida em dois componentes: o do tipo-A (transiente) e o retificador-retardado (sustentado) [Figura 8]. O componente transiente apresenta ativação e inativação rápida seguindo a despolarização, sendo que o componente sustentado apresenta inativação lenta até o termino do pulso despolarizante.



**Figura 8 – Correntes de potássio nos neurônios granulares do cerebelo.** Painel esquerdo superior mostra correntes de potássio transientes e sustentadas obtidas com o protocolo de pulsos de voltagem despolarizantes (painel esquerdo inferior) partindo de um potencial de repouso de -80 mV. As correntes do painel direito superior mostram apenas o componente sustentado da corrente de potássio em resposta a pulsos despolarizantes a partir do potencial de repouso de -40 mV (painel direito inferior) onde o componente transiente está inativado.

Se considerarmos apenas as subunidades  $\alpha$ , sem sofrerem modulações, as correntes de potássio nos neurônios granulares poderiam ser representadas por sete canais para potássio sensíveis a voltagem: 1.1, 1.3, 1.5, 2.2, 3.1, 4.2 e 4.3 (Mathie *et al.*, 2003). Aparentemente os  $K_V$  4.2 e 4.3 são responsáveis pela corrente do tipo-A, atuando singularmente ou em conjunto. Contudo, a co-expressão de  $KV1.1/KV\beta1$  e/ou  $KV1.5/KV\beta3.1$  também poderiam gerar correntes do tipo-A (Mathie *et al.*, 2003).

O componente do tipo retificador-retardado apresenta uma maior complexidade, sendo difícil definir com exatidão quais subunidades estariam envolvidas. O que parece mais provável é que os  $K_v$  1.1, 3.1, 1.3, 1.5 e 2.2 são os canais que geram esta corrente. No componente sustentado da corrente de  $K^+$ , aparentemente, a co-expressão das subunidades moduladoras parecem desempenhar um papel fundamental (Mathie *et al.*, 2003).

Com a diversidade de subunidades  $\alpha$  de canais para potássio nos neurônios granulares do cerebelo e suas possíveis combinações com subunidades  $\beta$ -acessórias e/ou formando heteromeros fica explícita a importância destas proteínas na modulação das funções da célula granular. Portanto, se alguma alteração ocorrer em uma de suas propriedades intrínsecas é possível que estas alterações afetem a função celular levando a mudanças da atividade cerebelar e do comportamento motor (Grillner, 2003).

## **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## JUSTIFICATIVA

A mortalidade por doenças neurodegenerativas é uma das mais importantes causas de morte no mundo moderno. Ultimamente uma grande quantidade de estudos objetiva explorar as bases moleculares das doenças neurodegenerativas, mostrando como é relevante a compreensão dos diversos mecanismos envolvidos na sua patogênese. De um modo geral, tentativas para aumentar a capacidade de investigações dependem da possibilidade do desenvolvimento de modelos experimentais que poderiam, de algum modo, refletir mudanças fisiológicas que culminariam com os processos neurodegenerativos.

Deficiências nutricionais podem causar dano neuronal. Tiamina (vitamina B1) é um nutriente essencial e desempenha um importante papel na função metabólica e celular, particularmente dentro do cérebro. Tiamina e as enzimas que utilizam tiamina como co-fator estão envolvidas na excitabilidade celular (Schoffeniels, 1989), no metabolismo oxidativo e de carboidratos (Collins *et al.*, 1970). Após a captação pela célula, a tiamina é rapidamente pirofosforilada produzindo tiamina difosfato (TPP, forma ativa) um importante co-fator em várias reações enzimáticas envolvidas na produção de energia (Pannunzio *et al.*, 2000; Stryer *et al.*, 2004). Sabe-se que o encéfalo é particularmente vulnerável a deficiência de tiamina durante a ontogênese e seu desenvolvimento (Ba *et al.*, 1999; Ba, 2005; Mulholland, 2006). A deficiência de tiamina em modelos animais resulta em lesão cerebelar e comprometimento de memória semelhante àquelas observadas na síndrome de Wernicke. Curiosamente, disfunções cerebelares

podem ser em parte revertidas após a administração de tiamina, do mesmo modo os distúrbios metabólicos da deficiência são revertidos seguindo a re-administração, entretanto existem mudanças que são irreversíveis (Hazell *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2003; Mulholland, 2006).

A redução de tiamina pode causar dano neuronal através do comprometimento do metabolismo. A morte celular programada, apoptose, é um mecanismo de extrema importância para manter a homeostase tecidual, limitar o crescimento celular e manter o organismo livre de células indesejáveis. Um desbalanço na sobrevivência e morte celular é característica de muitas doenças, as quais incluem desordens neurodegenerativas (Deutch and Winder, 2006; Harter *et al.*, 1997; Krantic *et al.*, 2005).

Há fortes evidências que implica o fluxo iônico transmembrana via canais iônicos como participante não só do início como também da progressão da apoptose (Andersen, 2004; Jiao *et al.*, 2004; Lauritzen *et al.*, 2003). Canais para potássio são amplamente distribuídos e, praticamente, encontrados em todas as células. Os canais para potássio, quando ativados, podem estar associados ao desenvolvimento de apoptose através do aumento do efluxo de potássio, o que parece ser o passo inicial que conduzira a morte por apoptose. Estudos usando modelos *in vivo* e *in vitro* de apoptose neuronal sugerem que: isquemia, Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose amiotrófica lateral, privação de fatores de crescimento, radicais livres e/ou deficiência nutricional provavelmente ativam vias de sinalização que conduzem a morte neuronal (Andersen, 2004; Desjardins and Ledoux, 1998; Deutch and Winder,



2006; Hazell *et al.*, 1998; Krantic *et al.*, 2005; Pannunzio *et al.*, 2000; Sheline and Wei, 2006; Wei *et al.*, 2004).

Há a possibilidade de que a deficiência em tiamina possa ativar canais para  $K^+$  e induzir a morte neuronal durante a ontogênese, o desenvolvimento ou no tecido neural já formado.

### **OBJETIVO GERAL:**

Estudar aspectos comportamentais, fisiológicos, bioquímicos e morfológicos resultante dos efeitos degenerativos em neurônios granulares do cerebelo submetidos à deficiência de vitamina B1 (tiamina).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Verificar se a deficiência de tiamina, produzida na dieta, causa alterações nas características morfológicas do cerebelo;
2. Verificar se a deficiência de tiamina na alimentação altera a motricidade e o aprendizado motor.
3. Verificar se a deficiência de tiamina causa alterações nos parâmetros morfológicos do cerebelo;
4. Verificar se a deficiência de tiamina produz alterações sobre as correntes de potássio nos neurônios granulares do cerebelo
5. Verificar se a deficiência de tiamina altera a excitabilidade dos neurônios granulares do cerebelo

6. Propor mecanismo(s) é(são) responsável(is) pela morte dos neurônios granulares do cerebelo submetidos a deficiência de tiamina.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **ANIMAIS**

Ratos Wistar machos ou fêmeas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos no biotério do Laboratório de Membranas Excitáveis desta mesma instituição (BIOMEX). Durante todo o experimento os animais eram acondicionados em caixas plásticas, no máximo quatro (4) por caixa, com o ciclo claro/escuro (12h/12h) controlado e livre acesso a alimentação e água. Estas condições foram mantidas do início ao final do processo experimental. Os animais utilizados para cultura de neurônios granulares do cerebelo foram obtidos diretamente dos biotérios e utilizados no mesmo dia para a obtenção dos neurônios. Os procedimentos experimentais estão registrados no comitê de ética em experimentação animal (CETEA) com o número de protocolo 042/06.

## **CULTURA PRIMÁRIA DAS CÉLULAS GRANULARES DO CEREBELO**

Para a cultura de células granulares foram utilizados animais com 7 dias após o nascimento (P7). Os animais foram sacrificados por decapitação e as células preparadas segundo RANDALL e TSIEN (1995) e modificado por LEÃO et al. (2000). Os animais foram rapidamente decapitados e tiveram seu cerebelo retirado e colocado dentro de um recipiente contendo meio Hank com soro (soro fetal bovino – SFB – Cultilab, Brasil). Os cerebelos sofriam tratamento enzimático no meio Hanks padrão com 5 mg/ml de tripsina tipo III (Sigma Chemical Co., EUA), por aproximadamente 5 min a temperatura ambiente. O tecido foi lavado mecanicamente e dissociado em meio Hank padrão adicionado

de  $\text{MgSO}_4$  (12 mM) e DNase I (1 U/ml – Sigma Chemical Co., EUA) para então sofrer sucessivas passagens através de pipetas Pasteur polidas de diâmetros decrescentes. As células em suspensão eram centrifugadas duas vezes durante três minutos a 1000 rpm e ressuspensas em Hank suplementado com soro. Após tal procedimento as células eram plaqueadas em lamínulas contendo poli-L-lisina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  – Sigma, EUA) e incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  em DMEM (dulbecco's modified eagle's medium – D1152, Sigma Chemical Co., EUA) suplementado com soro fetal bovino (FBS - 10%) e antibiótico (penicilina/estreptomicina - 1%). Para os experimentos eletrofisiológicos o meio foi trocado de dois em dois dias por DMEM com FBS (10%) e antibiótico (1%), suplementado por arabinosideo-C (4 $\mu\text{M}$  – Pfizer Labs, Brasil) para evitar proliferação glial. Para os experimentos de morfologia o arabinosideo-C não foi usado.

#### 1. Soluções utilizadas para obtenção da cultura de neurônios granulares

##### A. HANK

	<b>Concentração (mM)</b>	<b>g/l</b>
<b>KCl</b>	5,36	0,4
<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	0,44	0,06
<b><math>\text{NaHCO}_3</math></b>	4,16	0,35
<b>NaCl</b>	136,9	8,0
<b><math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math></b>	0,336	0,0478
<b>Glicose</b>	5,55	1,0

pH ajustado para 7,4 com NaOH (1 M) e filtrado em membrana própria para esterilizar (0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro).

### B. HANKS padrão (sem soro)

- Adicionado 1% (v/v) de solução de PS (penicilina e estreptomicina)
- Concentração final de penicilina = 50 unidades / ml;
- Concentração final de estreptomicina = 50 µg / ml.

### C. HANKS com soro

- Adicionado 20% (v/v) de soro fetal bovino no HANKS padrão.

## **ESTUDO BIOQUÍMICO**

Os animais submetidos a deficiência de tiamina, na dieta, durante 35 dias, tiveram seu sangue coletado periodicamente (0, 16, 32 e 48 dias) para a dosagem de tiamina segundo Warnock, (1975).

O método de dosagem de tiamina baseou-se na atividade da transcetolase (EC 2.2.1.1.) do hemolisado sanguíneo. Sendo a transcetolase uma enzima dependente de tiamina difosfato (TPP) que catalisa as reações na via das pentoses-fosfato (equação 1 e 2).

Pela fácil disponibilidade, os eritrócitos, os quais possuem alta atividade enzimática, foram escolhidos para a dosagem e confirmação da deficiência em vitamina B<sub>1</sub> no modelo experimental. A dosagem consistia na coleta de sangue dos animais em tubos contendo 0.1ml de EDTA (0.01 g/ml) para cada 0.9 ml de sangue. Após a coleta os tubos eram agitados para homogeneização e para prevenir a coagulação sanguínea. As amostras eram congeladas a -80 °C por no máximo três (3) semanas.

1. Soluções utilizadas para o estudo da dosagem bioquímica.

A.1. Ribose-5-fosfato disódico ( $C_5H_9O_8PNa_2 \cdot 2H_2O$ ) – 12 mmol/L.

- 3,72 mg/ml de ribose-5-fosfato disódico

A.2. Padrão de ribose-5-fosfato disódico – 0,040 mmol/L.

- 0,0124 mg/ml de ribose-5-fosfato disódico

A.3. Padrão de sedoheptulose – 40  $\mu$ mol/L.

- 0,0084 mg/ml de sedoheptulose

A.4. Ácido tricloracético (TCA – 15%)

- 15g de TCA diluídos em 100 ml de água Milli-Q

A.5. Cloreto férrico·HCl

- 1mg de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  em 1ml de HCl concentrado (12N).

Armazenado a  $-20^{\circ}C$  na ausência de luz.

A.6. Orcinol

- 100 mg/ml em etanol absoluto

A.7. Solução tampão

	<b>Concentração (mM)</b>	<b>g/L</b>
<b>NaCl</b>	154	9,0
<b>KCl</b>	154,24	11,5
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100,46	17,5
<b>MgSO<sub>4</sub> – 7H<sub>2</sub>O</b>	154,18	38,0

pH ajustado para 7,4 com HCl (1M)

PS: o reagente orcinol-  $FeCl_3 \cdot HCl$  foi preparado diariamente, diluindo-se 1ml de orcinol em 10ml de Cloreto férrico·HCl

Para a determinação da transcetolase adicionou-se 50 µl de sangue total e 50 µl de solução tampão (A7) em um tubo eppendorf. Esta solução, sangue-tampão, foi congelada e descongelada por três (3) vezes, o que levava à lise das células sanguíneas. O hemolisado resultante foi incubado à temperatura de 37°C e foram adicionados 100 µl de ribose-5-fosfato (12 mM – A1), esta fase marca o começo da reação (equação 2). A solução permaneceu a 37°C por 10 e 40 minutos. Após os tempos de 10 e 40 minutos, respectivamente, a reação foi interrompida com 100 µl de ácido tricloracético e deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Os volumes de cada tubo foram ajustados para 3 ml com água mili-Q (2,7 ml) e centrifugados.

Para a determinação do consumo da pentose e da formação de sedoheptulose adicionou-se 100 µl do sobrenadante a 900 µl de água Mili-Q, sendo o experimento feito em triplicata tanto para a dosagem de pentose quanto para a dosagem de sedoheptulose. Acrescentou-se 1 ml de reagente orcinol-FeCl<sub>3</sub>-HCl (A5+A6) em cada tubo. A cor foi obtida aquecendo-se as amostras a 100°C durante 40 minutos. Os tubos foram vedados para minimizar a evaporação. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e transferidas para cubetas para a leitura em espectrofotômetro (absorbância a 580 e 670nm).

O branco da reação era composto de 1 ml do reagente orcinol-cloreto férrico (A5+A6), mais 1 ml de água Mili-Q. O padrão das amostras de ribose-5-fosfato (A2) e sedoheptulose (A3) foram feitos com 1 ml de cada reagente, separadamente em tubos, adicionados de 1 ml de solução orcinol-cloreto férrico



(A5+A6). Após a medida da absorvância os cálculos foram feitos segundo as equações abaixo.

$$w = \frac{0.65 * (A_{\text{Ribose-5-F}}_{670nm})}{0.040}$$

$$x = \frac{A_{\text{Sedoheptulose}}_{670nm}}{0.040}$$

$$y = \frac{0.65 * (A_{\text{Ribose-5-F}}_{580nm})}{0.040}$$

$$z = \frac{A_{\text{Sedoheptulose}}_{580}}{0.040}$$

PS: A = absorvância. No cálculo do w e y, 0.65 é usado pois o equilíbrio da mistura de aldo e ceto-pentoses no sangue ou eritrócitos tem 0.65 de absorvância em relação ao padrão ribose-5-fosfato.

Sendo que para determinar a pentose e sedoheptulose em cada amostra os valores encontrados acima foram substituídos nas seguintes equações:

$$\text{pentose / tubo}(\mu\text{mol}) = \frac{[z * (A_{\text{amostra}}_{670nm})] - [x * (A_{\text{amostra}}_{580nm})]}{wz - xy}$$

$$\text{sedoheptulose / tubo}(\mu\text{mol}) = \frac{[w * (A_{\text{amostra}}_{580nm})] - [y * (A_{\text{amostra}}_{670nm})]}{wz - xy}$$

PS: A = absorvância

O fator de diluição para determinar a quantidade para 1 ml de sangue total para ambos os procedimentos é 600, assim multiplicando micromoles por tubo por 600 temos  $\mu\text{mol/ml}$ , sendo que a mudança no substrato ocorre entre 10 e 40 min a atividade da enzima é medida durante 30 min. Assim se multiplicarmos por 2 terá a quantidade em 1 h.

No ensaio é fornecido o substrato (ribose-5-fosfato), assim ele mostra a quantidade de ribose-5-fosfato consumida e a formação de sedoheptulose. Esta reação necessita da enzima transcetolase, a qual tem a tiamina como co-fator enzimático (equação 2). A tiamina do ensaio provém do hemolisado do sangue dos animais, retirado previamente.

## **ESTUDO COMPORTAMENTAL**

Avaliamos a motricidade, aprendizado e ataxia dos animais deficientes em tiamina, através dos testes comportamentais: barra estacionária, barra rotatória e ataxia de marcha (Bures *et al.*, 1983; Collin *et al.*, 2004; Shakkottai *et al.*, 2004).

O aparelho utilizado para testar motricidade e aprendizado foi a barra giratória. Este teste consiste em medir o tempo que o animal permanece sob o aparelho, o qual consiste de uma barra de 10 cm de diâmetro, suspensa 50 cm do chão a qual é fixa por suas extremidades. Por acionamento de um motor, que está ligado à barra, ela começa a girar a uma velocidade de 10 rotações/seg (Bures *et al.*, 1983). O tempo que o animal permaneceu na barra giratória (tempo até a queda) foi registrado. O aprendizado motor dos animais em

decorrência do tempo foi obtido através do ajuste dos pontos no teste da barra giratória pela equação 5.

$$f(t) = y_0 + a * x \quad \text{equação (5)}$$

Equação (5): “ $y_0$ ” é a motricidade inicial, “ $a$ ” é o grau de aprendizado; “ $x$ ” é o tempo até a queda.

O teste de ataxia foi feito em um aparelho que é formado por um corredor (13,5 x 20 x 150 cm) e uma caixa (30 x 50 x 20 cm) em uma de suas extremidades. Este corredor tem a face superior totalmente aberta, assim o animal fica exposto à luz que se encontra na parte superior da sala de treinamento. A caixa que fica ao fim do corredor é totalmente fechada, exceto por uma abertura (13 x 10 cm) que dá acesso ao seu interior e está virada para a extremidade final do corredor. O animal é solto na extremidade inicial do corredor, que foi previamente forrado com papel branco; ele caminha em direção a extremidade final do corredor, em direção a caixa escura. Antes de o animal ser colocado no aparelho as patas dianteiras e traseiras são marcadas com tinta de preta.

As patas do rato, que estão marcadas com tinta preta, ficam impressas no papel colocado no assoalho do corredor e servem para a quantificação dos parâmetros motores. A quantificação fez-se através da mensuração (em centímetros) da passada e base das patas do animal. Estes parâmetros serviram para a avaliação motora evidenciando o comprometimento cerebelar.

## ESTUDO MORFOLÓGICO

O estudo morfológico foi dividido em duas partes: (1) fixação do encéfalo e (2) fixação de células mantidas em cultura primária. A coloração empregada foi a de hematoxilina e eosina (H&E) para a identificação dos tipos celulares presentes, quantificação do número de células e disposição das camadas cerebelares (Celis, 1998; Goldowitz and Hamre, 1998). A coloração de H&E foi realizada no tecido cerebelar (fatias de cerebelo) e em lamínulas das culturas de neurônios granulares do cerebelo.

O cerebelo, depois de retirado do animal, foi fixado em parafina e levado a um vibrátomo para ser fatiado. As fatias foram feitas a partir de um corte mediano do vermis cerebelar com espessura de 200 $\mu$ m, elas foram paralelas ao plano mediano, portanto os cortes se apresentaram nas mesmas coordenadas cerebelares durante a comparação nas diferentes situações. Já as lamínulas foram comparadas na situação tiamina(+) e tiamina(-) vindas da mesma cultura. Tanto os experimentos com tecidos (fatias) quanto com culturas de neurônios cerebelares foram repetidos pelo menos cinco vezes com animais diferentes.

A coloração H&E consiste em dois passos separadamente, um para fixação do núcleo e outro para fixação do citoplasma e tecido conectivo. Hematoxilina é um marcador púrpuro que fixa a cromatina (material nuclear) dentro do núcleo, conduzindo a uma coloração púrpuro-azulada escura. A eosina é um corante róseo-alaranjado para vermelho que fixa o material citoplasmático, incluindo tecido conectivo e colágeno, conferindo uma coloração rosa-alaranjada ao plano de fundo. Esta fixação de fundo age como um

excelente contraste para a fixação nuclear e ajuda a identificar outras características do tecido, assim como membrana celular (contornos).

O processo para fixação em H&E consistiu em envolver o tecido em parafina, seccionar e transferi-lo para uma lamínula. Esta fatia foi submetida a sucessivas passagens através de xilol (3 vezes, 5 min cada vez), etanol (3 vezes, 2 min cada vez) e água Mili-Q (1 vez durante 1 min) para hidratação. Esta etapa proporciona ao tecido uma maior afinidade aos marcadores.

As lamínulas foram fixadas com o marcador nuclear, hematoxilina (5 min), e enxaguadas (água Mili-Q – 3 min), depois se fixou o plano de fundo, em eosina (30 seg). Elas foram novamente enxaguadas através de sucessivas passagens por água Mili-Q (30 seg), ethanol (2 min) e xilol (2 min) para finalizar a coloração.

As fatias do cerebelo e as lamínulas com células cerebelares foram levadas a morfometria para análise dos neurônios e da camada granular.

1. As soluções consistiam em:

- Hematoxilina de Mayer – 1 g de hematoxilina, 50 g de sulfato de alumínio potássico, 0,2 iodato de sódio e 1000 ml de água Mili-Q. A hematoxilina era dissolvida juntamente com sulfato de alumínio potássico e iodato de sódio em água Mili-Q. Esta solução era filtrada e armazenada por, no máximo, três meses.

- Eosina – 0,05% (P/v): 5 g de eosina, 990 ml de água Mili-Q e 10 ml de ácido

- Etanol ácido – 99 ml de etanol e 1 ml ácido clorídrico (1N).

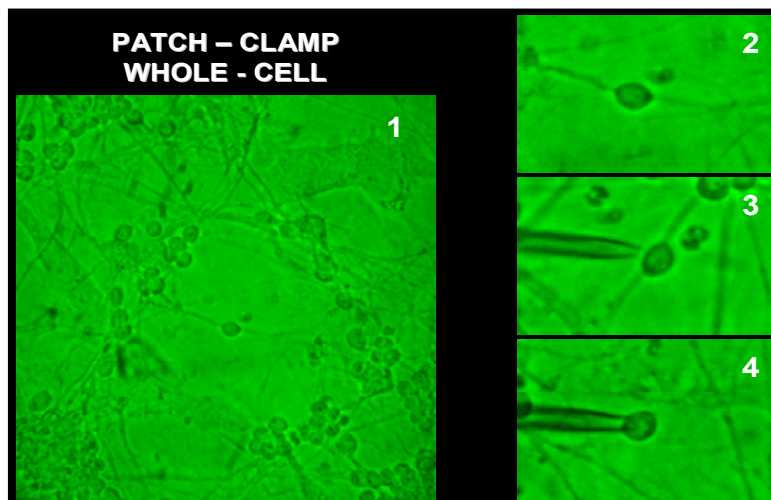
Na cultura de células, também, foi observada a viabilidade dos neurônios granulares e células da glia através do corante biológico azul de tripan (0,4%). O ensaio é definido como um teste de exclusão, na qual células que estão viáveis são capazes de internalizarem e excluir o corante, sendo que as inviáveis internalizam este corante e não o excluem, tornando-se azuis (Heo and Lee, 2004).

A cultura primária de neurônios granulares do cerebelo e células gliais foi preparada como previamente descrito. Nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 9 o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com Hanks (composição relatada acima) acrescido do corante azul de tripan (0,4%) por um período de 5 minutos na temperatura de 37°C. Após este tempo o sobrenadante foi retirado novamente e substituído por Hanks durante 10 minutos a temperatura de 37°C para então ser fixado com formol tamponado. Os neurônios foram contados randomicamente, por campo, por microscopia simples no aumento de 40X. Os neurônios que mantinham o corante internalizado e mostravam um aspecto escuro foram considerados inviáveis, entretanto os neurônios que apresentavam exclusão do corante e mostravam aspecto transparente da membrana foi considerado viável. Os neurônios bipolares e pequenos foram tidos como neurônios granulares do cerebelo e as células da glia cerebelares foram aquelas com aspecto multipolar e de grande dimensão. O ensaio serviu para a quantificação tanto de neurônios granulares quanto para a contagem de células da glia.

## ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

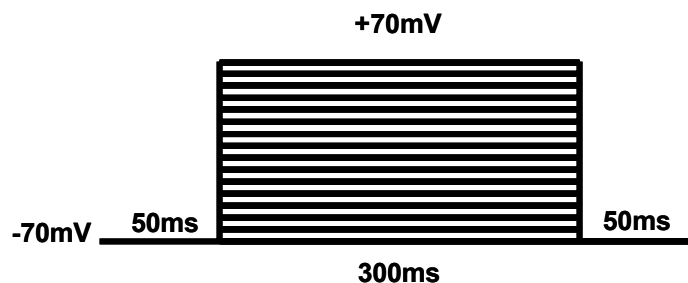
- Eletrofisiologia Celular

Fizemos uso de um amplificador EPC-10 (HEKA Instruments, Germany) para a realização dos experimentos de “patch-clamp”. Todas as medidas eletrofisiológicas foram feitas usando as configurações de “whole-cell voltage clamp” (para medir correntes de membrana) e/ou “whole-cell current clamp” (para medir potenciais de ação) (Hamill *et al.*, 1981) [Figura 9]. Todo o sistema é controlado pelo software PULSE (HEKA Instruments).



**Figura 9 – Patch-Clamp Whole-Cell.** Patch-Clamp realizado na cultura de neurônios granulares do cerebelo utilizando a modalidade Whole-Cell. Painel 1 mostra a cultura de células granulares do cerebelo mantidas durante 7 dias (aumento 5X). Painel 2 mostra, em seu centro, um neurônio granular do cerebelo de aspecto bipolar. A pipeta é aproximada da célula por um micromanipulador, cuidadosamente [painel 3]. O painel 4 mostra a pipeta de Patch-Clamp formando um selo de alta resistência (Giga-selo), para então proceder a ruptura da membrana, fazendo com que a solução do interior da pipeta tenha continuidade com o meio interno. Painel 2 a 4 em aumento de 40X.

Os protocolos utilizados para registrar as correntes macroscópicas geradas pelos canais para potássio sensíveis a voltagem variaram de acordo com o objetivo do experimento. O protocolo utilizado para o registro das correntes de potássio partiu do potencial de membrana de -70 mV (potencial de holding) com pulsos despolarizantes até +70 mV acrescidos de 10 mV. Os pulsos tinham a duração de 300 ms, voltando ao potencial de holding ao seu final [Figura 10].



**Figura 10 – Protocolo de voltagem utilizado para o registro de correntes de potássio durante os experimentos eletrofisiológicos na modalidade de whole-cell voltage-clamp.**

Para a diferenciação das correntes de potássio, “A” ou retificadora-ratardada, nos neurônios granulares do cerebelo o protocolo partiu de um potencial de membrana de -80 mV com pulsos partindo de -90 mV até +40 mV durante 300 ms, acrescidos de 10 mV. As correntes geradas por este protocolo foram subtraídas das correntes geradas por um protocolo partindo de um potencial de membrana de -40 mV com pulsos de -50 mV até +40 mV, durante 300 ms, acrescidos de 10 mV [Figura 11]. Estes experimentos foram realizados na presença de CdCl<sub>2</sub> (0,2 mM) e tetrodotoxina (0,1 mM).



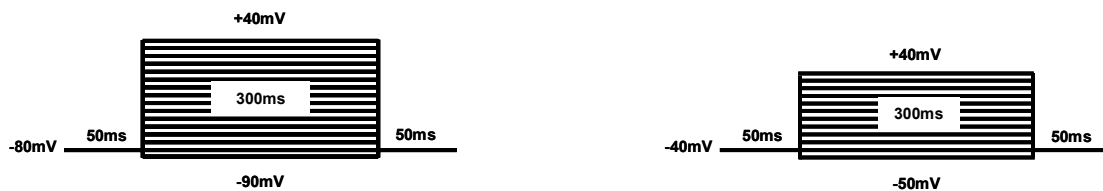
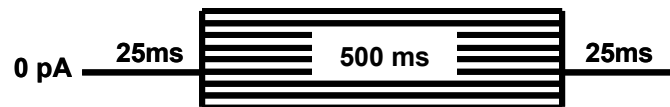


Figura 11 –Correntes foram registradas a partir de um potencial de repouso de -80 e -40mV conforme indicado no protocolo acima. As correntes geradas por cada protocolo foram subtraídas para determinação da  $I_A$ .

A pipeta de registro tinha resistência entre 4 a 6 M $\Omega$ . Todas as correntes foram filtradas passa-baixa com frequência de corte de 2,9 kHz e digitalizados a 10 kHz. A resistência em série foi de aproximadamente 10-15 M $\Omega$  e foram compensadas em pelo menos 70% em todos os experimentos. Experimentos que tinham aumento de 20% da resistência em série durante os registros não foram usados durante o estudo. O protocolo de pulsos P4 foi usado para subtração das correntes vazantes (leakage) e capacitivas. As correntes foram analisadas quantificando o valor máximo das correntes de saída ( $I_{pico}$ ) ou pelos valores médios de corrente nos 40 ms finais do pulso de voltagem aplicado. Os potenciais de junção não foram corrigidos, contudo estavam na faixa de 5 mV.

O protocolo utilizado para o registro dos potenciais de ação partiu do potencial de membrana de -70 mv (ajustado pela injeção de corrente no neurônio) com injeções de corrente de  $-69.5 \pm 11.9^*$  pA (n=6) para os neurônios submetidos à deficiência e  $-41.4 \pm 3.42$  pA (n=6) para os controles. Durante 500 ms pulsos tanto hiperpolarizantes (2 pulsos) quanto despolarizantes (3 pulsos)

com incrementos de 30 pA foram aplicados aos neurônios. O primeiro pulso que gerasse um potencial de ação era considerado como pulso limiar, então as medidas subseqüentes foram utilizadas para análise. [Figura 12].



**Figura 12 – Protocolo de injeção de corrente utilizado para obtenção dos potenciais de ação durante o experimento eletrofisiológico na modalidade whole-cell current-clamp.**

As correntes foram registradas e analisadas usando o software pulsefit (HEKA Instruments, Alemanha). A constante de tempo do decaimento foi ajustada por uma (1) ou a soma de duas (2) funções exponenciais, e tiveram as seguintes equações, respectivamente:

$$f(t) = A_0 + \left[ A * \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \right] \quad \text{equação (6)}$$

$$f(t) = A_0 + \left[ A_{\text{rápido}} * \exp\left(\frac{-t}{\tau_{\text{rápido}}}\right) \right] + \left[ A_{\text{lento}} * \exp\left(\frac{-t}{\tau_{\text{lento}}}\right) \right] \quad \text{equação (7)}$$

Equação (6) e (7):  $A_0$  = corrente de potássio que não sofre inativação até o término do pulso;  $A$  = valor máximo da corrente de potássio;  $A_{\text{rápido}}$  = contribuição do componente rápido para o decaimento da corrente de potássio;  $A_{\text{lento}}$  = contribuição do componente lento para o decaimento da corrente de potássio;  $t$  = tempo;  $\tau$  = constante de tempo para o decaimento da corrente;  $\tau_{\text{rápido}}$  = constante de tempo para o componente rápido da corrente;  $\tau_{\text{lento}}$  = constante de tempo para o componente lento da corrente.

A razão entre  $A_{\text{rápido}}$  ou  $A_{\text{lento}}$  foi usada para determinar a porcentagem de contribuição de cada componente durante o decaimento da corrente, segundo as equações abaixo.

$$A_{\text{lento}} (\%) = \frac{A_{\text{lento}}}{A_{\text{lento}} + A_{\text{rápido}}} \quad \text{equação (8)}$$

$$A_{\text{rápido}} (\%) = \frac{A_{\text{rápido}}}{A_{\text{rápido}} + A_{\text{lento}}} \quad \text{equação (9)}$$

Equação (8) e (9):  $A_{\text{rápido}}$  = contribuição do componente rápido para o decaimento da corrente de potássio;  $A_{\text{lento}}$  = contribuição do componente lento para o decaimento da corrente de potássio.

A relação de densidade de corrente vs a voltagem foi ajustada pela equação (10):

$$I(V) = G_{\text{min}} \frac{(V_m - E_k)}{1 + \exp((V_a - V_m)/S)} \quad \text{equação (10)}$$

Equação (10):  $G_{\text{min}}$  = condutância mínima;  $V_m$  = potencial de membrana;  $E_k$  = potencial de equilíbrio eletroquímico do potássio;  $V_a$  = voltagem que ativa 50% dos canais;  $S$  = Slope.

Para o ajuste da cinética de ativação da corrente tipo-A, uma equação de terceira ordem [equação 11] obteve os melhores parâmetros estatísticos ( $R^2$  e

F). Já para a constante de tempo de ativação a equação que melhor se ajustou foi a de número 12.

$$f(t) = A_1 * \left( 1 - \exp\left[\frac{-t}{\tau}\right] \right)^3 \quad \text{equação (11)}$$

$$\tau_a = a_a + b_a * \exp\left(-\left[\frac{V_m + V_a}{K_a}\right]\right) \quad \text{equação (12)}$$

Equação (11) e (12):  $A_1$  = corrente basal de potássio;  $t$  = tempo;  $\tau$  = constante de tempo para a ativação da corrente;  $a_a$  = valores basais para a corrente de potássio;  $b_a$  = ponto máximo de ativação da corrente;  $V_m$  = potencial de membrana;  $V_a$  = voltagem que ativa 50% dos canais;  $K_a$  = constante.

Através dos valores obtidos do pico das correntes de potássio tipo-A foi calculada a condutância [equação 13] e o estado-estacionário de ativação ( $a^\infty$ ) [equação 14].

$$g = I_{pico} / (V_m - E_k) \quad \text{equação (13)}$$

$$a^\infty = (g_a(V_m) / g_{máx})^{1/3} \quad \text{equação (14)}$$

Equação (13) e (14):  $I_{pico}$  = corrente máxima;  $V_m$  = potencial de membrana;  $E_k$  = potencial de equilíbrio eletroquímico do potássio;  $g_a$  = condutância específica;  $g_{máx}$  = condutância máxima.

O ajuste dos valores do  $a^\infty$  se fez pela equação abaixo.

$$a(V) = \{1 + \exp[(V_a - V_m)/K_b]\}^{-1} \quad \text{equação (15)}$$

Equação (15):  $V_m$  = potencial de membrana;  $V_a$  = voltagem que ativa 50% dos canais;  $K_b$  = constante.

Os valores da constante de decaimento (inativação) das correntes de potássio do tipo-A foram obtidos por apenas uma exponencial através da equação 6. A relação tau de inativação vs voltagem, para os potenciais de -30 a +40 mV, foi ajustada pela equação 16.

$$\tau_{ha} = a_{ha} + b_{ha} * \exp(-[(V_m + V_{ha})/K_{ha}]) \quad \text{equação (16)}$$

Equação (16):  $a_{ha}$  = constante de inativação;  $b_{ha}$  = constante de inativação do componente linear;  $V_m$  = potencial de membrana;  $V_{ha}$  = voltagem que inativa 50% dos canais;  $K_{ha}$  = constante.

Tanto o cálculo dos valores da constante de inativação para os potenciais de -40 a -100 mV quanto os ajustes do tau de inativação em relação a voltagem usados para o modelamento da corrente de potássio do tipo A, foram obtidos usando a equação abaixo:

$$\tau_{ha} = a + b * V_m + \frac{1}{(c * \exp(V_m * d) + e * \exp(-V_m * f))} \quad \text{equação (17)}$$

Equação (17):  $a_{ha}$  = componente da corrente que não inativa;  $b_{ha}$  = constante de inativação do componente linear;  $V_m$  = potencial de membrana;  $c$  = corrente residual da fase crescente de inativação;  $d$  = constante do componente crescente da inativação;  $e$  = corrente residual da fase decrescente de inativação;  $f$  = constante do componente decrescente da inativação.

A corrente de potássio do tipo-A apresenta um componente residual a partir de potenciais mais despolarizados do que -10 mV (Bardoni and Belluzzi, 1993). Assim após a quantificação desta corrente, seus valores foram ajustados segundo a equação abaixo.

$$f(t) = a * \exp\left(\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{equação (18)}$$

Equação (18):  $a$  = corrente basal;  $t$  = tempo;  $\tau_{ha}$  = constante de tempo de inativação.

## 1. Soluções utilizadas para o estudo eletrofisiológico.

### 1.1 VOLTAGE-CLAMP

- para os registros de correntes de potássio.

#### Solução interna

Reagentes	Concentração (mM)
KCl	150
EGTA	10
Hepes	5

pH ajustado para 7.2 por KOH

## Solução externa

Reagentes	Concentração (mM)
NaCl	130
KCl	5
CaCl <sub>2</sub>	1,8
MgCl <sub>2</sub>	1
Glicose	10
Hepes	5

pH ajustado para 7.4 por NaOH

- para a subtração de correntes de potássio a solução externa foi modificada para:

## Solução externa

Reagentes	Concentração (mM)
NaCl	130
KCl	5
CaCl <sub>2</sub>	1,8
MgCl <sub>2</sub>	1
Glicose	10
Hepes	5
CdCl <sub>2</sub>	0,2
tetrodotoxina	0,1

pH ajustado para 7.4 por NaOH

## 1.2 CURRENT-CLAMP

## Solução interna

Reagentes	Concentração (mM)
KCl	130
EGTA	10
Hepes	5
NaCl	5
MgATP	10

pH ajustado para 7.2 por KOH

## Solução externa

Reagentes	Concentração (mM)
NaCl	130
KCl	5
CaCl <sub>2</sub>	1,8
MgCl <sub>2</sub>	1
Glicose	10
Hepes	5

pH ajustado para 7.4 por NaOH



## RECONSTRUÇÃO MATEMÁTICA NEURONIAL

O modelamento matemático neuronal foi feito através do software de simulação NEURON (Hines and Carnevale, 1997; Hines and Carnevale, 2001) utilizando como base o neurônio granular do cerebelo proposto por D'Angelo et al. (2001).

O modelo proposto por D'Angelo et al. (2001) possui um único compartimento, devido ao neurônio granular ter uma compacta estrutura eletrotônica. O valor da capacitância de membrana usada para calcular a superfície granular foi de 3 pF. Assumimos que a célula granular possui uma forma esférica com uma capacitância de membrana específica de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

O modelo inclui uma corrente de vazamento e correntes sensíveis a voltagem para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  segundo a tabela II. Os potenciais de equilíbrio iônico foram calculados e alterados de acordo com a situação experimental dos registros de voltagem e current-clamp, quando possível.

A corrente de potássio do tipo-A foi calculada e formulada de acordo com os dados experimentais obtidos neste estudo e propostos por BARDONI E BELLUZZI (1993).

**Tabela II – parâmetros cinéticos das condutâncias dependentes de voltagem.**

Canais iônicos		n	$G_{max}$ (S/cm <sup>2</sup> )	$E_{ion}$ (mV)	$\alpha$ (seg <sup>-1</sup> )	$\beta$ (seg <sup>-1</sup> )
$g_{Na-f}$	Ativação	3	0.013	87.39	$0.9(V+19)/(1-\exp(-(V+19)/10))$	$36 \exp(-0.055(V+44))$
	Inativação	1			$0.315 - \exp(-0.3(V+44))$	$4.5 / (1 + \exp(-(V+11)/5))$
$g_{Na-r}$	Ativação	1	$5e^{-4}$	87.39	$0.00024 - 0.015(V-4.5)/(\exp(-(V-4.5)/6.8)-1)$	$0.14+0.047(V+44)/(\exp((V+44)/0.11)-1)$
	Inativação	1			$0.96 * \exp(-V+80)/62.5$	$0.03 * \exp((V+83.3)/16.1)$
$g_{Na-p}$	Ativação	1	$2e^{-4}$	87.39	$0.091(V+42)/(1-\exp(-(V+42)/5))$ $x^\infty = 1/(1+\exp(-(V+42)/5))$ $\tau^\infty = 5/(Alfa + beta)$	$-0.062(V+42)/(1-\exp((V+42)/5))$
$g_{K-v}$	Ativação	4	0.003	-84.69	$0.13(V+25)/(1-\exp(-(V+25)/10))$	$1.69 \exp(-0.0125(V+35))$
$g_{K-a}$	Ativação	3	0.004	-84.69	$14.67/(1+\exp(-(V+9.17)/23.32))$	$2.98(\exp(-(V+18.28)/19.47))$
	Inativação	1			$0.33/(1+\exp((V+111.33)/12.84))$ $x^\infty = 1/(1+\exp(-(V+46.7)/19.8))$ $y^\infty = 1/(1+\exp((V+78.8)/8.4))$	$0.31/(1+\exp(-(V+49.95)/8.9))$
$g_{K-ir}$	Ativação	1	$9e^{-4}$	-84.69	$0.4 \exp(-0.041(V+83.94))$	$0.51 \exp(0.028(V+83.94))$

$g_{K-Ca}$	Ativação	1	0.004	-84.69	$2.5/(1+1.5e^{-3/[Ca]} \exp(-0.085V))$	$1.5/(1+[Ca]/(0.15e^{-3 \exp(-0.085V)}))$
$g_{Ca}$	Ativação	2	$4.6 e^{-4}$	129.33	$0.15 \exp(0.063 (V+29.06))$	$0.089 \exp(-0.039(V+18.66))$
	Inativação	1		*	$0.0039 \exp(-0.055(V+48))$	$0.0039 \exp(0.012(V+48))$
$g_{K-slow}$	Ativação	1	$3.5 e^{-4}$	-84.69	$0.008 \exp(0.025(V+30))$ $x^\infty = 1/(1+\exp(-(V+30)/6))$	$0.008 \exp(-0.05(V+30))$

- n é o número de partículas de “gating” (ativação);  $G_{máx}$  = condutância máxima;  $E_{ion}$  = potencial de equilíbrio iônico (\* valores de repouso para  $Ca^{2+}$ ) que foram usados para calcular as correntes iônicas (D'Angelo *et al.*, 2001). Os símbolos  $\alpha$  e  $\beta$  representam constantes de tempo. O retângulo mostra a corrente de potássio do tipo-A

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros do teste comportamental para o aprendizado foram obtidos através da análise de regressão linear.

As correntes de potássio foram quantificadas pelo pico da corrente, que era considerado como o componente transiente (tipo A), e pela média dos 40 ms finais (250 a 390 ms), que foi considerado como o componente sustentado (tipo retificador-retardado) da corrente. Após a subtração das correntes obtidas pelo potencial de holding de -40 mV em relação a família de correntes obtidas pelo potencial de holding de -80 mV, as correntes de potássio do tipo  $I_A$  e retificadoras-retardadas foram quantificadas pelo pico. Todos os parâmetros eletrofisiológicos foram determinados por análise de regressão não linear.

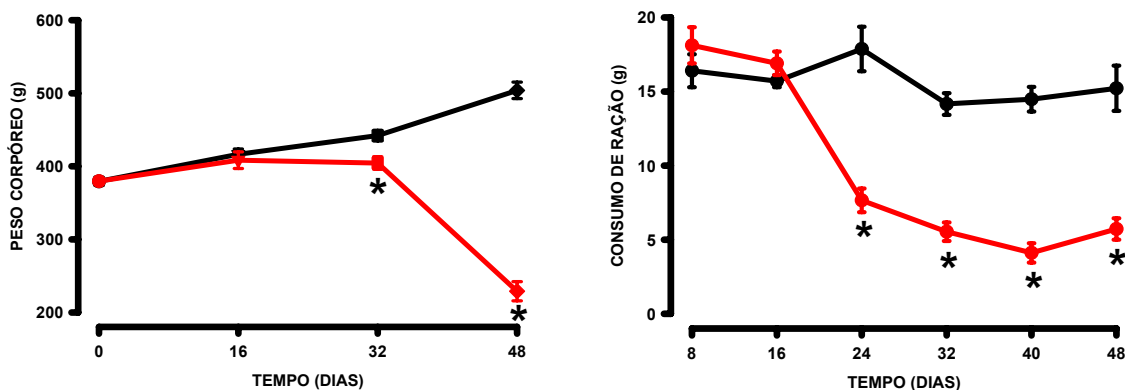
Os resultados foram comparados pelo test t de Student e ANOVA quando necessário, sendo expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), com o valor de probabilidade  $p < 0.05$  considerado estatisticamente significativo.

## **RESULTADOS**

## **1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO**

**(Ratos adultos submetidos à deficiência de tiamina na alimentação)**

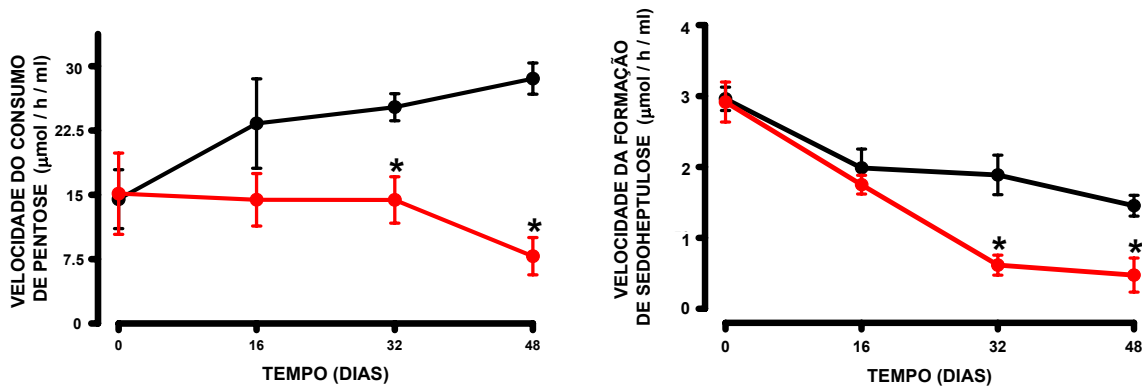
A primeira fase do estudo procurou certificar que uma dieta deficiente em tiamina ocasionava a depleção deste fator vitamínico no sangue, pois é através deste meio que a tiamina chega nas células após sua absorção pelo trato intestinal. Os animais (machos) submetidos à alimentação deficiente em tiamina durante o período de 48 dias apresentaram diminuição do peso corporal a partir do 32<sup>o</sup> dia de alimentação [tiamina (+):  $442 \pm 7,3$  g – n=12; tiamina (-):  $404 \pm 8,6$  g – n=10; Figura 13 – painel esquerdo] e anorexia, medida indiretamente pelo consumo líquido de ração, a partir da segunda semana em diante [tiamina (+):  $17 \pm 1,5$  – n=12; tiamina (-):  $7 \pm 0,8$  – n=21 - Figura 13 - painel direito].



**Figura 13 – Deficiência de tiamina causa diminuição do peso corpóreo (esquerda) e diminui o consumo de ração (direita).** Símbolos de cor preta representam tiamina (+), os de cor vermelha tiamina (-). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM com \* $p < 0.05$  considerado estatisticamente significativo, Teste t de *Student*.

Quando da dosagem de tiamina do hemolisado dos animais foi verificado uma diminuição significativa a partir do 32<sup>o</sup> dia de tratamento [Consumo de pentose ( $\mu\text{mol/h/ml}$ ): tiamina (+):  $25,2 \pm 1,6$  – n=10; tiamina (-):  $14,4 \pm 2,7$  –

n=12 – Figura 14 – painel esquerdo; Produção de **sedoheptulose** ( $\mu\text{mol/h/ml}$ ): tiamina (+):  $1,9 \pm 0,3$  – n=10; tiamina (-):  $0,6 \pm 0,1$  – n=12 - Figura 14 – painel direito]. O conjunto destes dados mostra que a dieta deficiente em tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) é eficiente em causar a diminuição deste fator vitamínico nos animais submetidos a este tratamento.

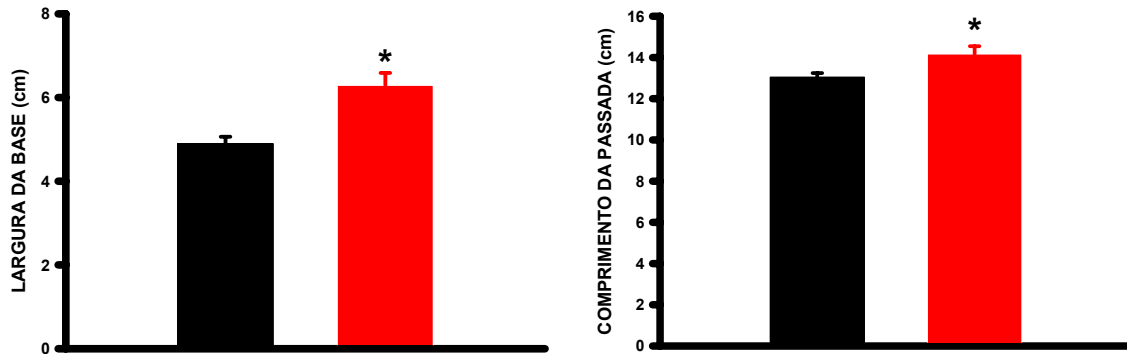


**Figura 14 – A deficiência de tiamina na dieta leva a redução dos níveis sanguíneos de vitamina B<sub>1</sub>.** As medidas mostram a diminuição do consumo de pentose (painel esquerdo) e a formação de sedoheptulose (painel direito) no hemolisado de ratos submetidos à deficiência de tiamina na dieta. Símbolos de cor preta representam a situação tiamina (+) e os de cor vermelha, tiamina (-). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM com \* $p < 0.05$  considerado estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.

Os testes comportamentais mostraram que os ratos que eram submetidos a deficiência de tiamina durante o período de 35 dias apresentavam distúrbios motores. No teste de marcha os animais deficientes apresentaram base alargada [tiamina (+):  $4,9 \pm 0,2$  cm – n=16; tiamina (-):  $6,3 \pm 0,3$  cm – n=20 - Figura 15 – painel esquerdo] e passada mais longa [tiamina (+):  $13,1 \pm 0,2$  cm – n=16; tiamina (-):  $14,2 \pm 0,4$  cm – n=20 - Figura 15 – painel direito] quando comparados

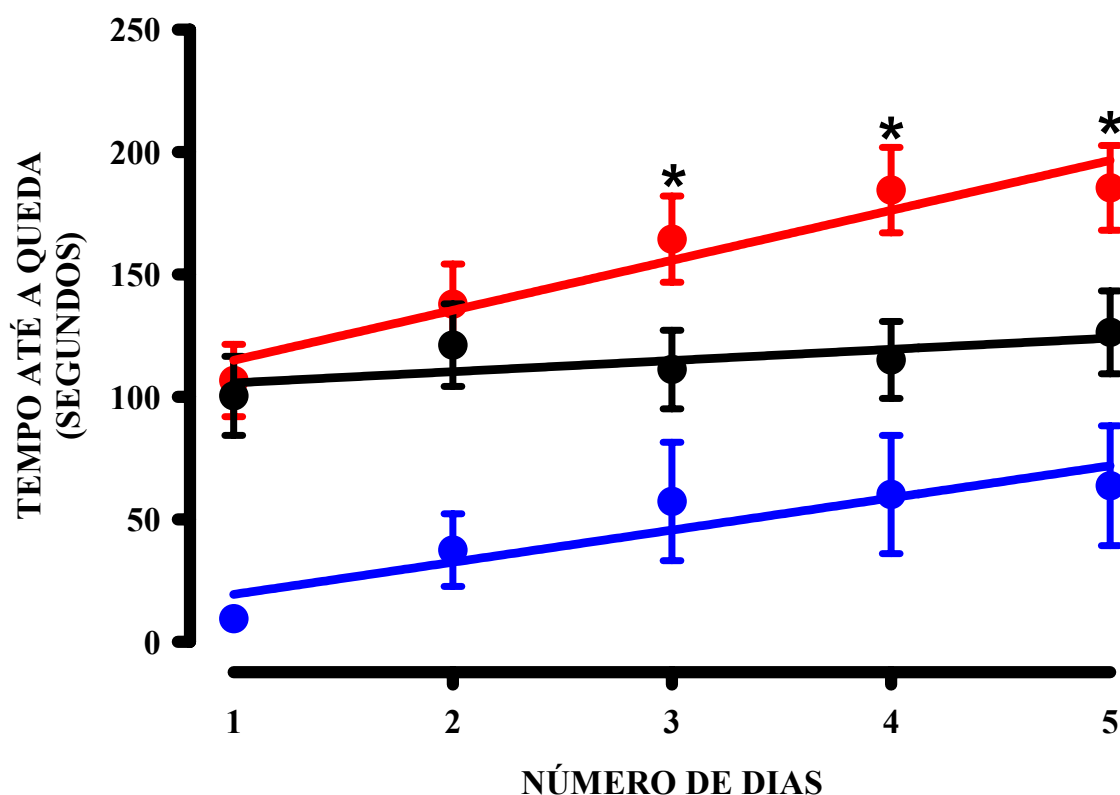


ao grupo controle. Estes sinais sugerem fortemente a presença de ataxia cerebelar (Jiao *et al.*, 2005).



**Figura 15 – Deficiência de tiamina causa distúrbios na marcha.** Os ratos submetidos a deficiência de tiamina apresentaram aumento da base de sustentação (painel esquerdo) e aumento da passada (painel direito). As barras pretas representam o controle e as vermelhas a situação deficiente em tiamina (35º dia). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM com \* $p < 0.05$  considerado estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.

Já no teste de motricidade os animais deficientes, curiosamente, apresentaram-se melhor. Os animais de mesma idade quando comparados entre si, tinham, no começo, a motricidade superior aos seus pares considerados como controles [tiamina (+):  $9,4 \pm 0,9$  s –  $n=9$ , símbolos azuis; tiamina (-):  $106 \pm 15$  s –  $n=15$ , símbolos vermelhos Figura 16], contudo o ganho motor, ou seja o aprendizado, foi semelhante ao término das sessões [tiamina (+):  $13 \pm 6$  s/dia –  $n=7$ ; tiamina (-):  $20 \pm 7$  s/dia –  $n= 25$ , equação 5]. Os ratos submetidos à dieta por entrarem em um quadro de anorexia (Figura 13 – painel direito) exibiam menor peso no período do teste (35<sup>o</sup> dia – Figura 13, painel esquerdo).

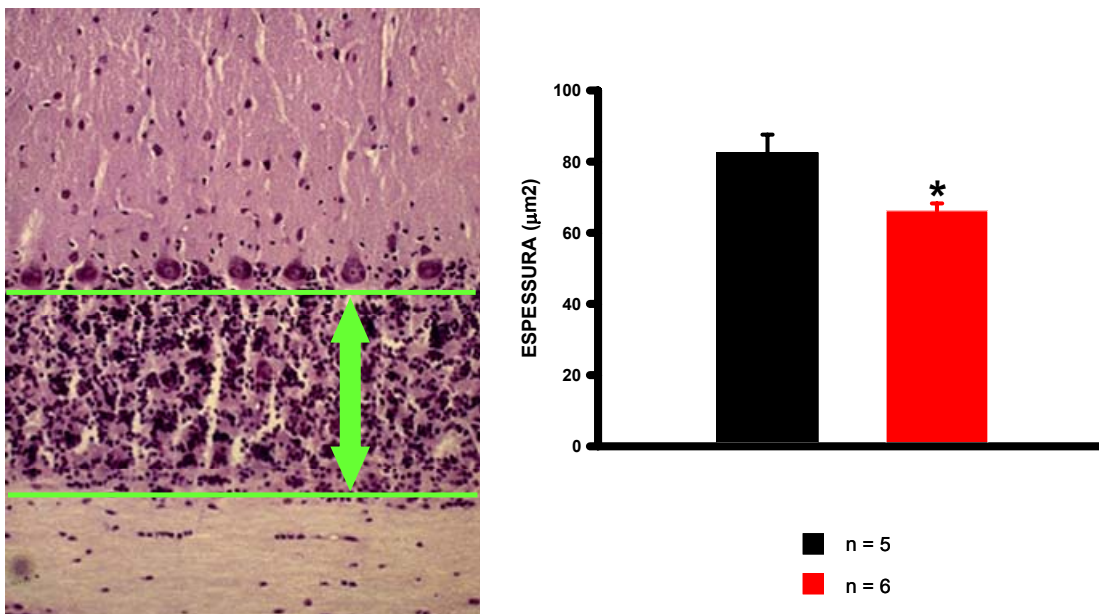


**Figura 16 – Motricidade e aprendizado dos animais deficientes em tiamina.** Os animais deficientes em tiamina foram submetidos ao teste de RotaRod e o tempo até a queda foi medido. Símbolos vermelhos representam os animais deficientes; Símbolos azuis mostram os animais do grupo controle (sem restrição alimentar) em relação ao grupo deficiente; Símbolos pretos animais do grupo controle (com restrição alimentar, recebendo o mesma quantidade de alimentação que o grupo deficiente consumia diariamente) com o mesmo peso dos animais do grupo deficiente. Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM com  $*p < 0.05$  considerado estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (ANOVA). As retas representam o ajuste da equação 5.

Assim, foram realizados experimentos com ratos de mesmo peso, os quais tiveram sua alimentação restringida aos valores consumidos pelo grupo considerado deficiente. Observou-se que os ratos deficientes apresentaram o

mesmo grau de motricidade inicial em relação aos controles (com restrição alimentar), contudo os ratos controles (com restrição alimentar) não mostraram aprendizado durante as 5 sessões [tiamina (+) [dia 5]:  $126 \pm 17$  s – n=16; tiamina (-) [dia 5]:  $185 \pm 17$  s – n=25, equação 5]. A Figura 16 mostra a composição dos resultados, deixando evidente ou uma melhor motricidade ou um melhor aprendizado do grupo experimental em relação aos grupos controles de peso diferentes ou de mesmo peso.

A morfometria cerebelar, a qual foi cega para o pesquisador que a realizou, mostrou uma diminuição da espessura da camada granular do cerebelo nos ratos submetidos a deficiência em vitamina B<sub>1</sub> [tiamina (+):  $82 \pm 5$   $\mu\text{m}^2$ , Barra preta; tiamina (-):  $66 \pm 2$   $\mu\text{m}^2$ , Barra vermelha - Figura 17].

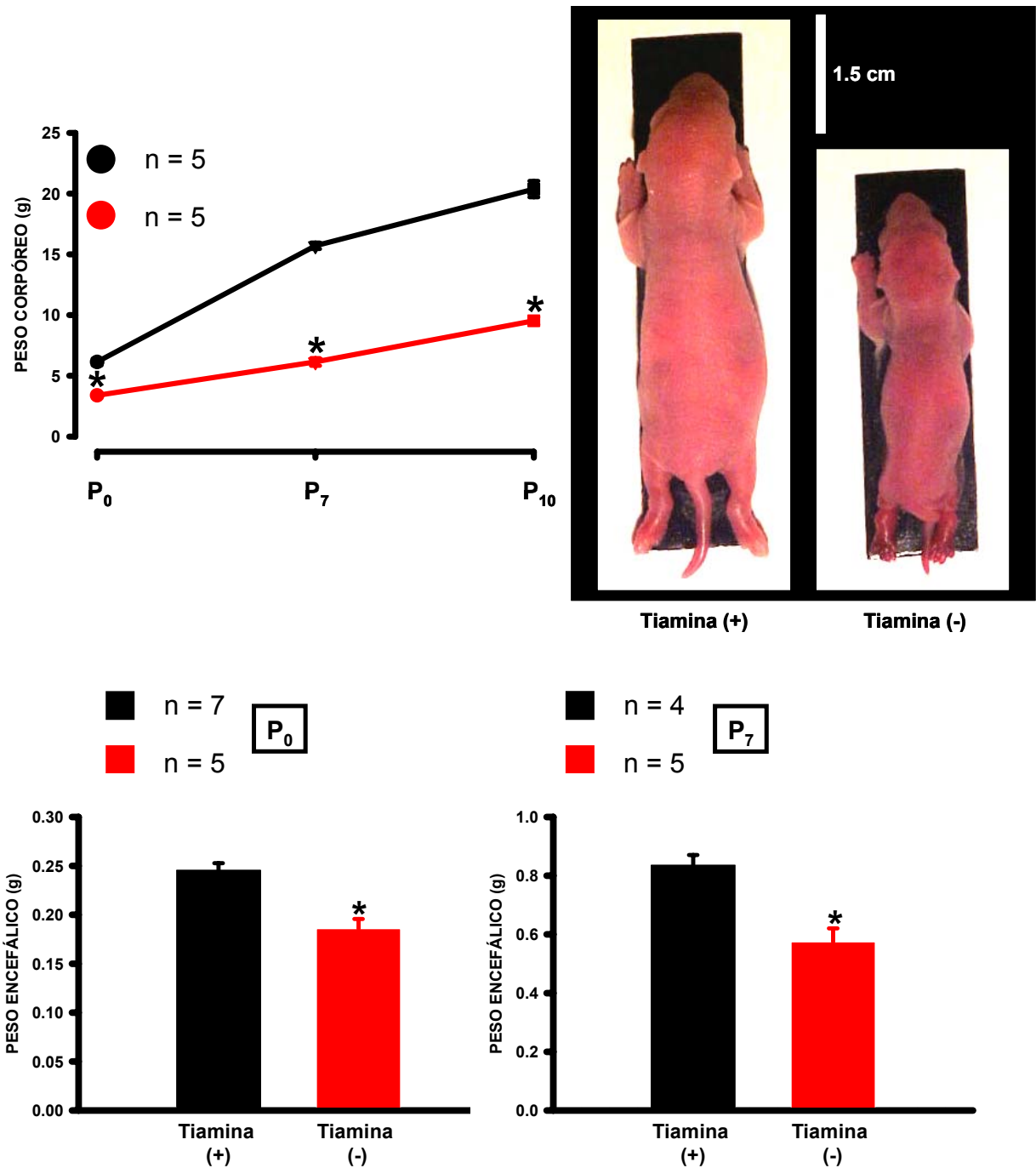


**Figura 17 – Morfometria da camada granular do cerebelo.** Os cortes histológicos foram submetidos à análise morfométrica na camada granular do cerebelo conforme mostra o painel esquerdo. A barra preta representa a situação controle e a vermelha a situação deficiente em

tiamina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM com  $*p < 0.05$  considerado estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.

## **2. ANIMAIS NASCIDOS DE RATAS DEFICIENTES EM TIAMINA**

**(animais nascidos de ratas submetidas à deficiência de tiamina durante a  
gestação)**



**Figura 18– Deficiência de tiamina durante a gestação causa baixo peso corporal e encefálico em ratos nascidos de mães deficientes.** O painel esquerdo superior mostra o peso corpóreo da prole de ratas deficientes durante a gestação. No painel direito superior estão representados os animais nascidos de mães deficientes em tiamina [tiamina (-)] ou não [tiamina (+)]. A parte inferior da figura refere-se ao peso encefálico dos ratos recém-nascidos

(esquerdo – P<sub>0</sub>) e com sete dias de vida (direito – P<sub>7</sub>). Os símbolos ou barras pretas representam a situação tiamina (+), os vermelhos tiamina (-). Os resultados são expressos como média ± EPM; \*p<0.05 foi considerado ter diferença estatística. Teste t de *Student*.

Os animais nascidos de ratas deficientes em tiamina apresentaram baixo peso corporal [tiamina (+): 6,1 ± 0,3 g; tiamina (-): 2,5 ± 0,8 g - Figura 18 – painel superior esquerdo] e encefálico [P<sub>0</sub> - tiamina (+): 0,25 ± 0,01 g; P<sub>0</sub> - tiamina (-): 0,18±0,01 g – Figura 18 - painel inferior esquerdo] e mostravam crescimento retardado quando comparados aos animais nascidos de ratas normais [Peso corpóreo (P10) - tiamina (+): 20,4 ± 0,7 g; tiamina (-): 9,5 ± 0,3 g – Figura 18 – painel superior esquerdo; Peso encefálico (P7): tiamina (+): 0,84 ± 0,03 g; tiamina (-): 0,57 ± 0,05 g – Figura 18 – painel inferior direito]. A Figura 18 (painel superior direito) mostra uma foto comparativa dos animais recém-nascidos (P<sub>0</sub>) de ratas tiamina (+) e tiamina (-).

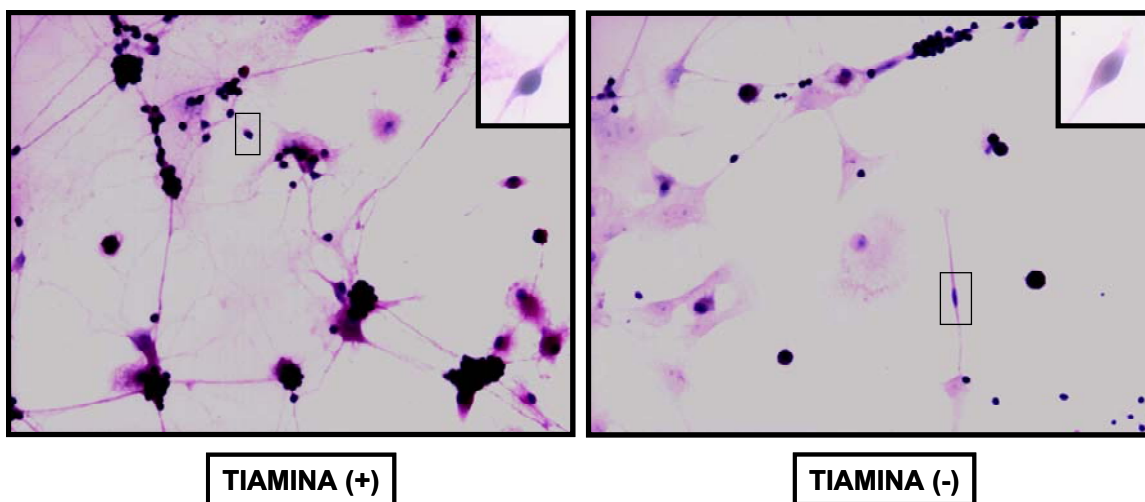
### **3. NEURÔNIOS GRANULARES**

#### **SUBMETIDOS À DEFICIÊNCIA DE TIAMINA *IN VIVO***

**(Cultura de neurônios granulares do cerebelo retirados de animais, de 7 dias pós-natal, nascidos de ratas submetidas à deficiência de tiamina durante a gestação, porém os neurônios foram mantidos em meio contendo tiamina)**



O cerebelo é uma região do encéfalo que apresenta grande renovação (turnover) de tiamina e durante a deficiência desta vitamina há acentuada diminuição da atividade enzimática da piruvato desidrogenase (Butterworth, 1982). Este substrato neural é severamente acometido durante a deficiência de tiamina, evidenciando um “encolhimento” e acentuada morte de células granulares (Butterworth, 1982; Mulholland, 2006). Culturas de neurônios granulares de cerebelo de ratos nascidos de ratas deficientes em tiamina foram mantidas durante doze dias em meio (DMEM) contendo vitamina B<sub>1</sub>. Os neurônios granulares apresentaram acentuada morte celular quando comparados a situação controle [Figura 19 ].

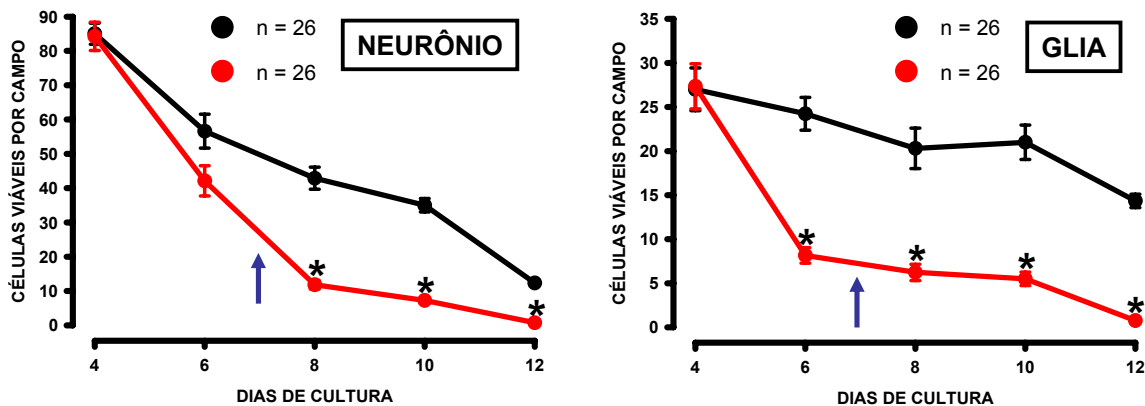


**Figura 19 – Deficiência de tiamina, durante a gestação, conduz a morte de neurônios granulares do cerebelo mantidos em cultura.**

As células foram retiradas de animais nascidos de ratas submetidas a deficiência de tiamina durante a gestação, porém mantidas, durante 7 dias, em meio contendo tiamina. A micrografia da esquerda representa o controle e a micrografia da direita representa a situação deficiente em tiamina. Os painéis mostram culturas de neurônios granulares tiamina (+) e

tiamina (-) em aumento de 20x. Há evidências de morte neuronal e de células da glia. Os Insertsos (100x) são neurônios na situação tiamina (+) e tiamina (-) mostrando alteração na morfologia e provável aumento no volume celular. Teste t de *Student*

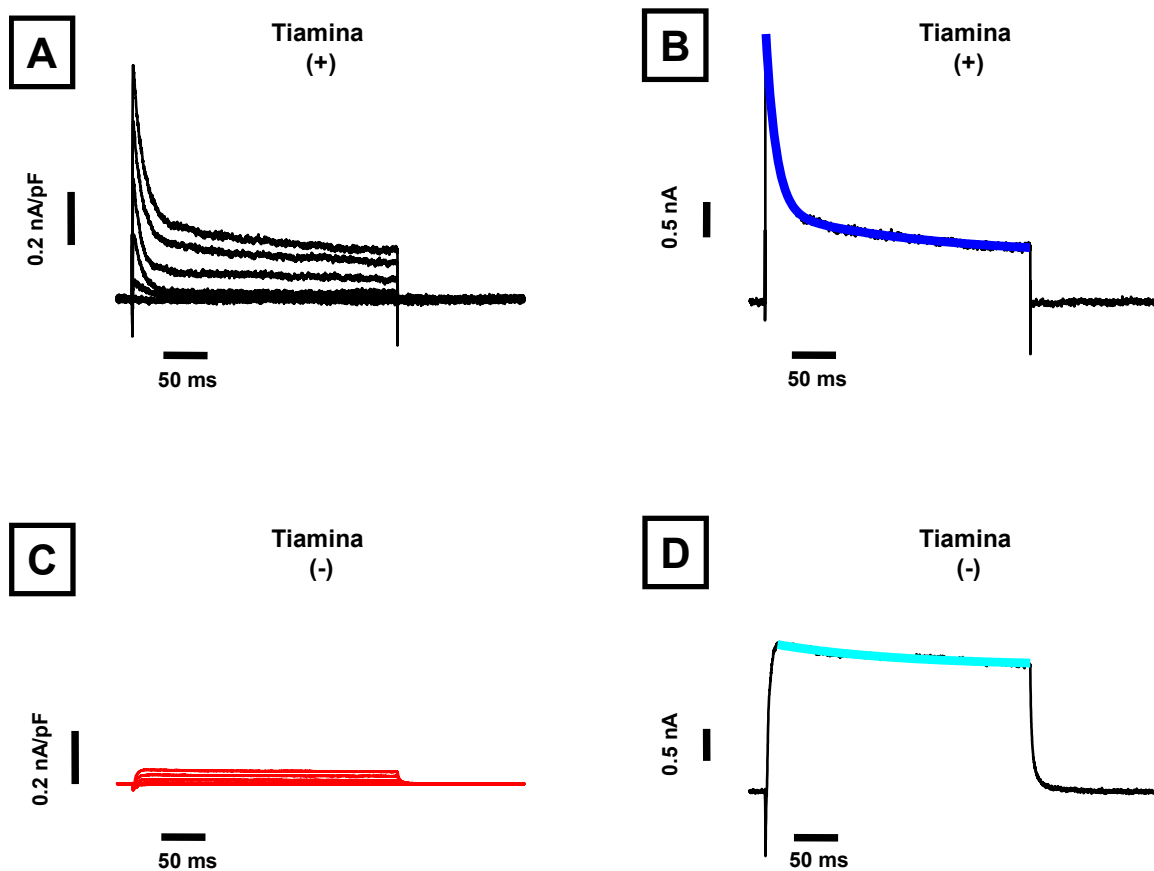
A viabilidade dos neurônios granulares apresentou-se diminuída a partir do 8<sup>o</sup> dia de cultura [tiamina (+):  $42,9 \pm 3,2$  células/campo; tiamina (-):  $11,8 \pm 1,3$  células/campo - Figura 20 – painel esquerdo], sendo que as células gliais diminuíram drasticamente logo ao final da primeira semana, dia 6 [tiamina (+):  $24 \pm 1,9$  células/campo ; tiamina (-):  $8 \pm 0,9$  células/campo - Figura 20 – painel direito]. Aparentemente, o mecanismo para explicar a morte neuronal observada era ocasionado por um mecanismo irreversível, pois a morte continuava acentuada mesmo após a suplementação da vitamina.



**Figura 20 – Deficiência de tiamina provoca diminuição na viabilidade celular.** Os neurônios foram retirados de animais que nasceram tanto de mães com dieta normal (Tiamina (+) ) quanto mães com dieta deficiente em tiamina (Tiamina (-) ) durante a gestação. Símbolos pretos representam a situação tiamina (+) e os vermelhos a situação tiamina (-).

Seta azul representa o 7<sup>o</sup> dia de cultura. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significante. Teste t de *Student*.

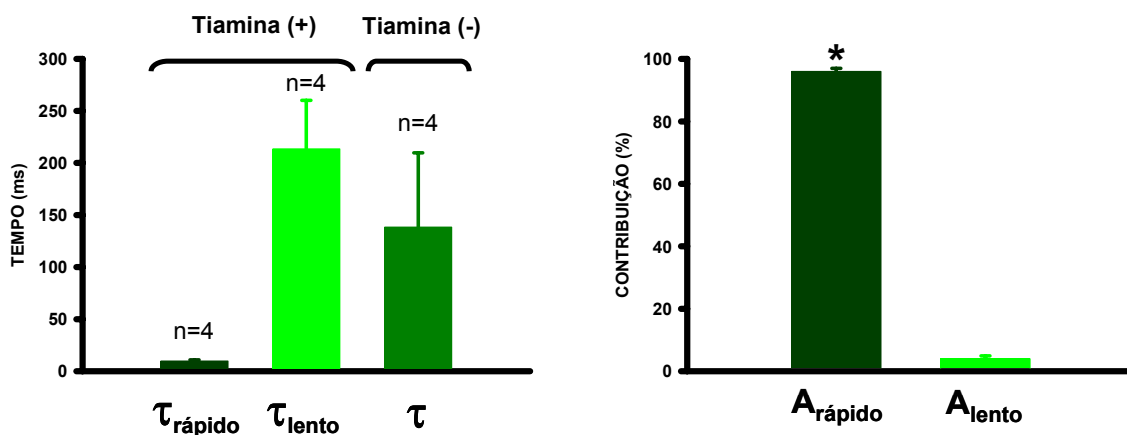
Sabe-se que canais para potássio podem estar envolvidos na morte neuronal (Hu *et al.*, 2005; Yu, 2003), assim a corrente de potássio nos neurônios granulares foi registrada em células mantidas 7 dias em cultura.



**Figura 21 – Deficiência de tiamina durante a gestação induz mudanças nas correntes de potássio de neurônios granulares do cerebelo.** O painel (A) mostra uma família de correntes de potássio registradas de um neurônio tiamina (+). (B) Corrente registrada por pulso despolarizante de +40mV na situação tiamina (+). A função dependente de tempo com a soma de duas exponenciais ajustou-se ao decaimento da corrente (painel B, linha azul

escuro). (C) Registros obtidos de neurônios tiamina (-). (D) O registro mostra uma corrente de potássio tiamina (-) a +40mV. Apenas uma função exponencial ajustou-se ao decaimento (linha azul clara). Os neurônios granulares foram despolarizados com passos de -80 a +70mV, acrescidos de 10mV. O intervalo entre pulso foi de 10 segundos. Os neurônios em ambas situações, tiamina (+) e tiamina (-), foram estudados com sete dias de cultura. O potencial de membrana foi mantido em -80mV. Teste t de *Student*.

A Figura 21A mostra a corrente total de potássio de um neurônio tiamina (+), evidenciando um componente transiente e outro sustentado. O decaimento desta corrente foi ajustado com a soma de duas funções exponenciais [Figura 21B – linha azul escuro – ver equação 7]. A Figura 21C representa os registros de corrente de potássio na situação tiamina (-), mostrando diminuição dramática do componente transiente. O decaimento da corrente tiamina (-) foi ajustado com, apenas, uma única exponencial [Figura 21D - linha azul claro – equação 6].



**Figura 22 – Deficiência de tiamina durante a gestação altera a inativação das correntes de potássio de neurônios granulares do cerebelo.** Os Valores médios para as constantes de tempo da inativação calculados para o potencial de membrana de +40 mV. Neurônios

tiamina (+) mostraram duas constantes de tempo [rápida ( $\tau_{\text{rápido}}$ ) e lenta ( $\tau_{\text{lento}}$ ) – ver equação 7], já os neurônios tiamina (-) apenas uma ( $\tau$ ) (equação 6). O painel a direita mostra a contribuição relativa calculada para cada componente, rápido e lento, para os neurônios tiamina (+), segundo as equações 8 e 9. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$  foi considerado ser estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.

Os valores das constantes de tempo obtidas pelo ajuste do decaimento segundo as equações 6 e 7 são mostrados na Figura 22 [tiamina (+):  $\tau_{\text{rápido}} = 9,8 \pm 1,1$  ms e  $\tau_{\text{lento}} = 213 \pm 46$  ms; tiamina (-):  $\tau = 138 \pm 71$  ms – painel esquerdo]. Para saber a contribuição relativa de cada componente para o decaimento da corrente total as equações 8 e 9 foram utilizadas, e seus resultados estão mostrados na Figura 22 (painel direito).

A densidade de corrente de potássio transiente, analisada pelo pico, apresentou-se menor para valores de potencial acima de -30 mV nos neurônios submetidos a deficiência durante a gestação [Figura 23]. As linhas azuis [Figura 23] mostram o melhor ajuste obtido por regressão não linear segundo a equação 10.

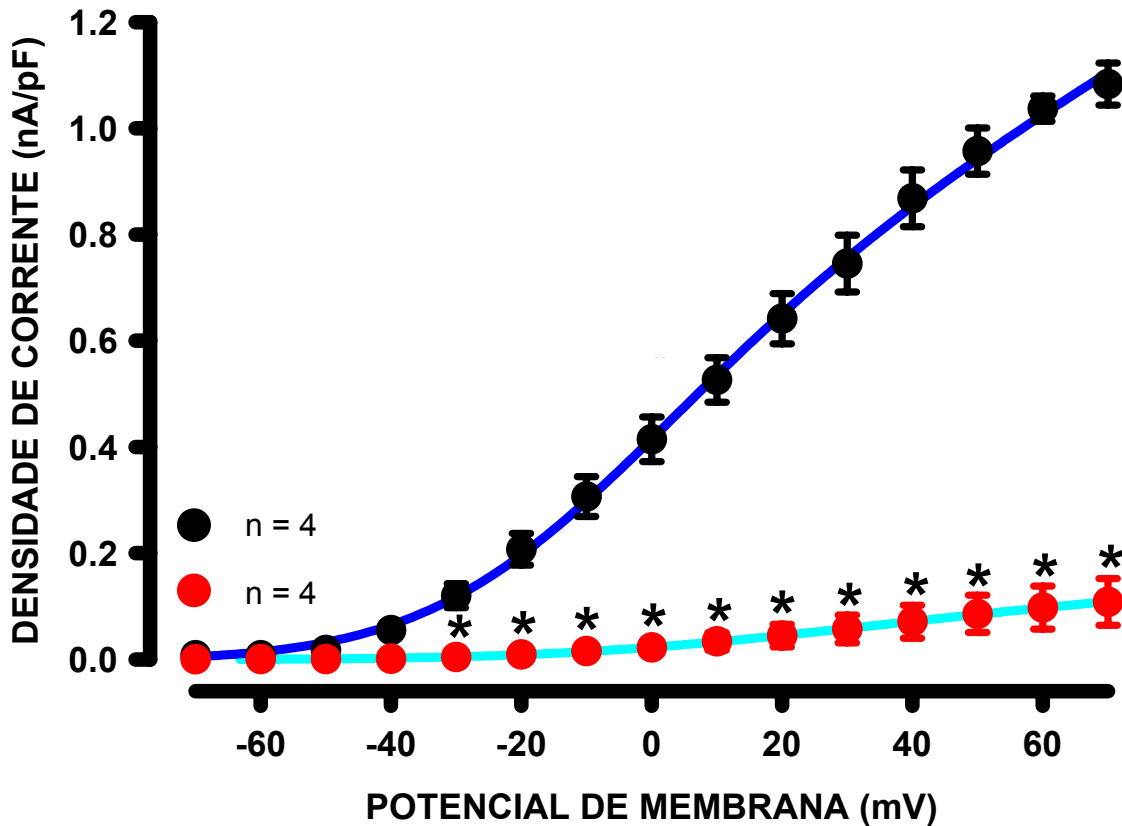


Figura 23 – Densidade de corrente de potássio do tipo A em neurônios granulares do cerebelo é diminuída pela deficiência de tiamina durante a gestação.

Densidade de corrente em relação à voltagem. Tiamina (+) (círculos pretos) e tiamina (-) (círculos vermelhos). Os valores foram medidos no pico. As linhas contínuas (azuis) foram obtidas usando a equação (10). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de registros de neurônios controle ou deficientes com  $*p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.

A tabela III mostra os parâmetros obtidos pelo ajuste.

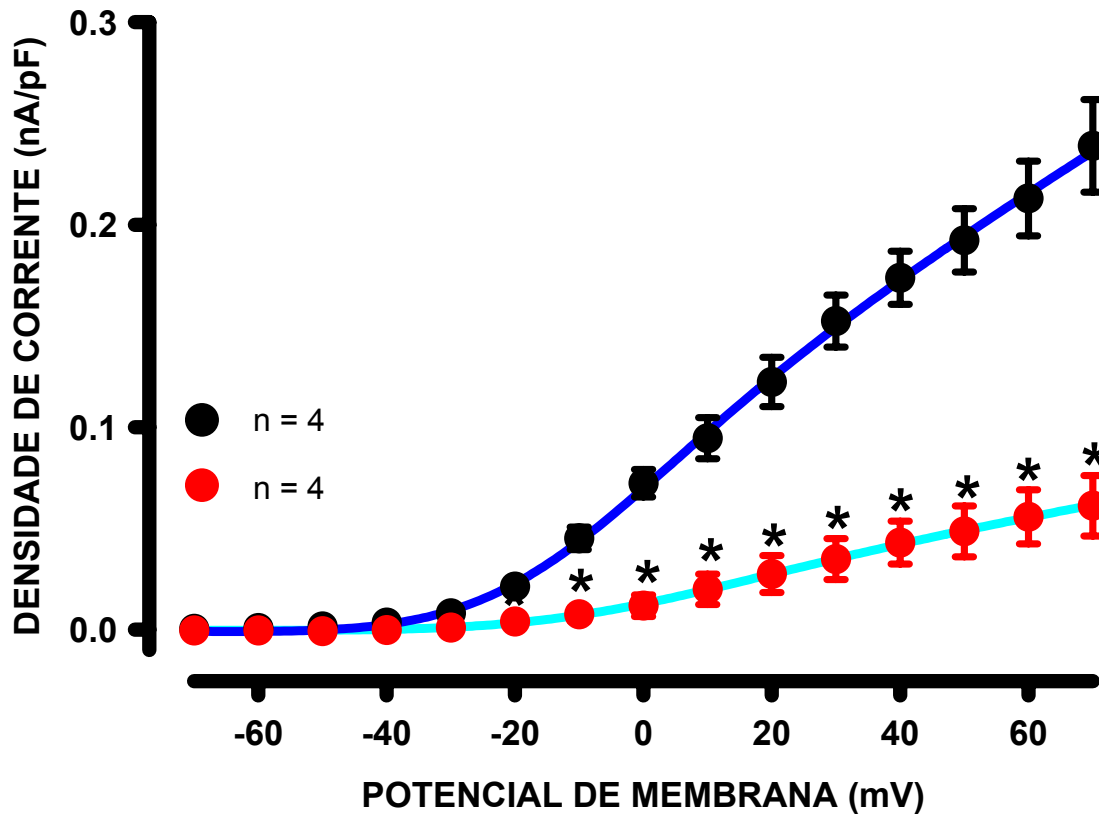
Tabela III – Parâmetros obtidos segundo a equação 10 para o ajuste da relação densidade de corrente versus voltagem.

### CORRENTE TRANSIENTE

	$G_{máx}$	$V_a$	$K_a$
Tiamina (+)	$7.2 \pm 0.6 \text{ nS}/\rho\text{F}^*$	$-14.0 \pm 4 \text{ mV}^*$	$18.7 \pm 1.1 \text{ mV}^*$
Tiamina (-)	$0.9 \pm 0.0 \text{ nS}/\rho\text{F}$	$8.85 \pm 2.77 \text{ mV}$	$23.95 \pm 1.2 \text{ mV}$

Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$ . Teste t de *Student*.

A corrente de potássio sustentada, obtidas pelos valores médios dos 250 ms aos 390 ms finais, também se mostrou de menor amplitude [Figura 24]. As linhas contínuas [Figura 24] foram obtidas pela equação 10 e seus parâmetros para o melhor ajuste estão sumarizados na tabela IV.



**Figura 24 – Densidade de corrente de potássio, do tipo retificadora retardada, diminui nos neurônios granulares submetidos a deficiência de vitamina B1 durante a gestação.**

Densidade de corrente em relação a voltagem. Tiamina (+) (círculos pretos) e tiamina (-) (círculos vermelhos). As correntes foram medidas pelos valores médios de corrente dos 250ms aos 390ms finais. As linhas contínuas (azuis) foram obtidas usando a equação (10). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de registros de neurônios controle ou deficientes com \* $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.



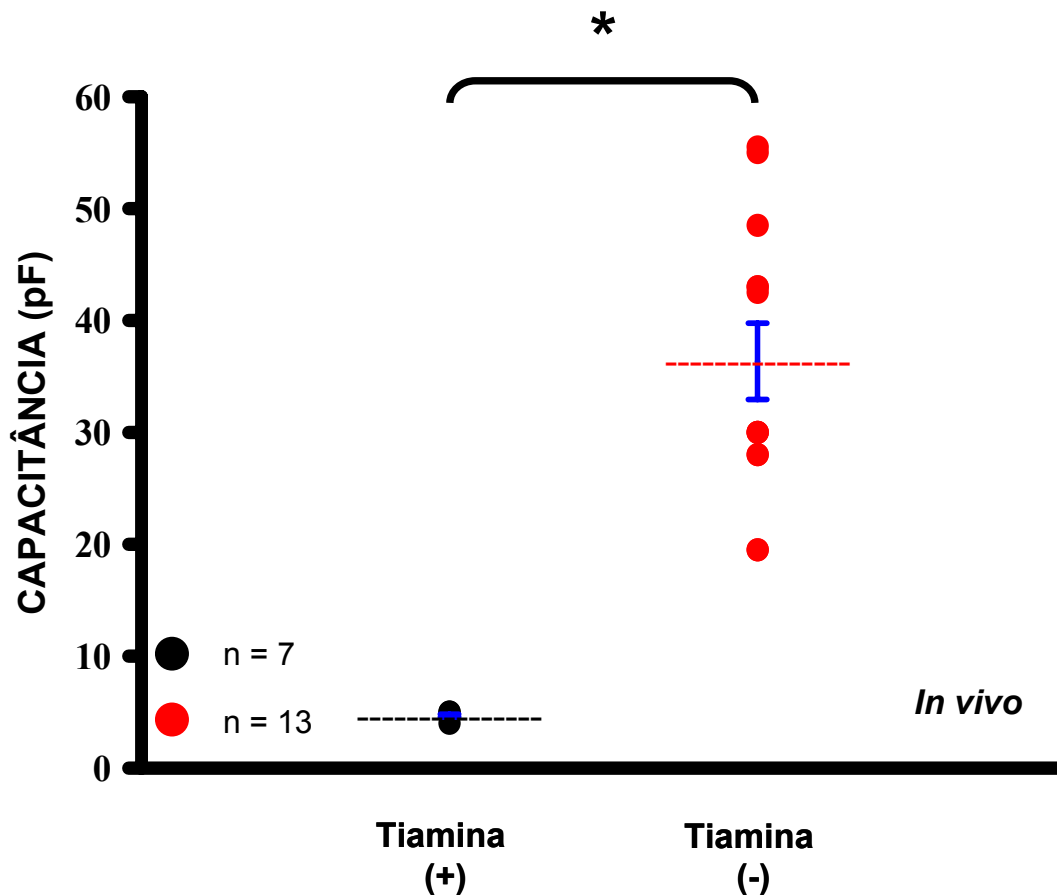
Tabela IV – Parâmetros segundo o melhor ajuste obtido pela equação (10).

## CORRENTE SUSTENTADA

	$G_{máx}$	$V_a$	$K_a$
Tiamina (+)	$2 \pm 0.1 \text{ nS}/\rho\text{F}^*$	$-13.7 \pm 4.1 \text{ mV}^*$	$14.8 \pm 1.2 \text{ mV}^*$
Tiamina (-)	$0.6 \pm 0.1 \text{ nS}/\rho\text{F}$	$-3.8 \pm 2.7 \text{ mV}$	$17.2 \pm 1.0 \text{ mV}$

Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$ . Teste t de Student.

A capacitância dos neurônios granulares, submetidos a deficiência durante a gestação, mostrou-se extremamente aumentada, cerca de 10x [tiamina (+):  $4,6 \pm 0,1$  pF; tiamina (-):  $36 \pm 3$  pF - Figura 25].



**Figura 25 – Deficiência de tiamina *in vivo* (durante gestação) aumenta a capacitância dos neurônios granulares de cerebelo.**

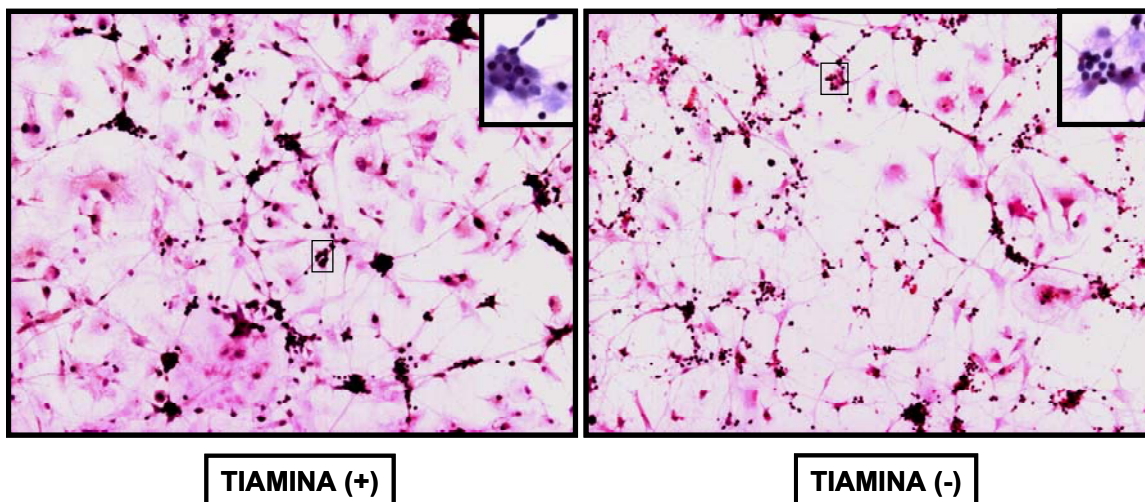
O gráfico mostra que as células tiamina (-) (círculos vermelhos) aumentaram sua capacitância cerca de 10x em relação ao grupo tiamina (+) (círculos pretos). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$ . Teste t de *Student*.

#### **4. NEURÔNIOS GRANULARES**

##### **SUBMETIDOS À DEFICIÊNCIA DE TIAMINA *IN VITRO***

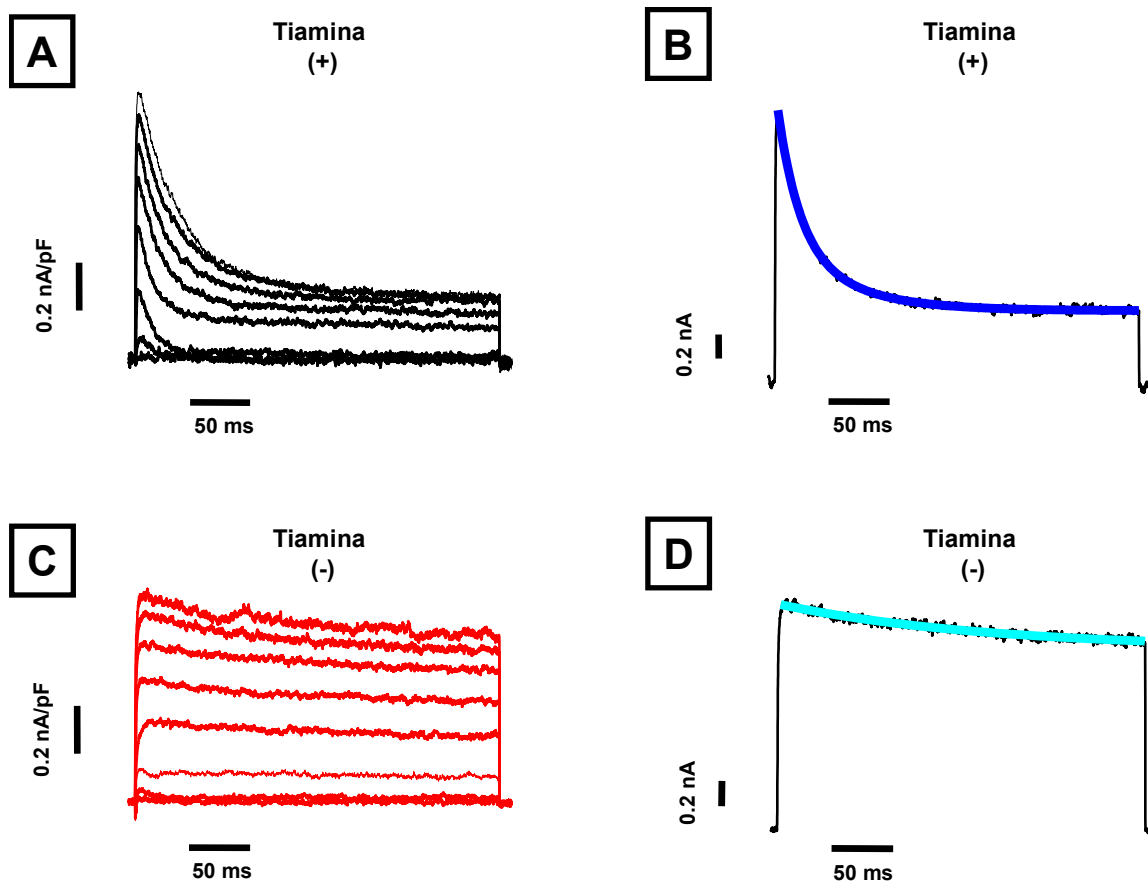
**(Cultura de neurônios granulares do cerebelo retirados de ratos normais, com 7 dias pós-natal, e mantidos em meio deficiente em tiamina durante 7 dias)**

Para averiguarmos se as mudanças ocorridas nos neurônios granulares dos animais nascidos de mães submetidas a uma dieta deficiente em tiamina (contudo mantidos em meio de cultura contendo tiamina (0,004 g/L), portanto deficientes somente durante a gestação e amamentação) se reproduziam *in vitro*, realizamos a deficiência somente na cultura, ou seja, os neurônios granulares eram retirados de animais normais e mantidos em meio deficiente em tiamina durante 7 dias. Estes neurônios apresentaram morte celular [Figura 26] e indícios de apoptose [Figura 26 - inserto].



**Figura 26 – Micrografias de culturas primárias de células granulares do cerebelo submetidas a deficiência de tiamina *in vitro*.**

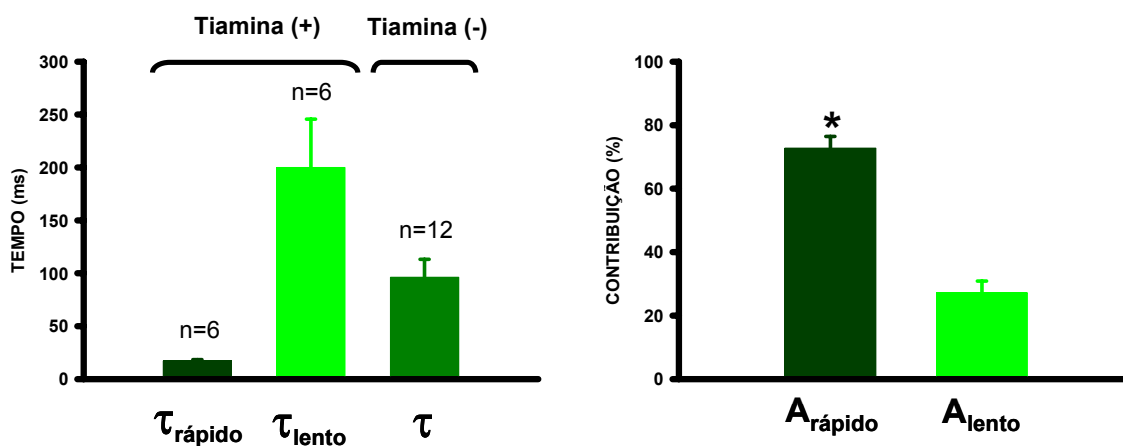
Os neurônios foram obtidos do mesmo animal tiamina (+), só que foram mantidos em meio tiamina (-), durante 7 dias. A micrografia da esquerda representa o controle e a micrografia da direita representa a situação deficiente. Os painéis mostram culturas de neurônios granulares tiamina (+) e tiamina (-), em aumento de 10x. O Inseto (40x) são células na situação tiamina (+) (esquerda) e tiamina (-) (direita) evidenciando núcleos picnóticos e morte neuronal na situação deficiente em tiamina. Teste t de *Student*.



**Figura 27 – Deficiência de tiamina *in vitro* altera as correntes de potássio em neurônios granulares do cerebello.** O painel (A) mostra uma família de correntes de potássio registradas de um neurônio tiamina (+), em (B) é o pulso despolarizante de +40 mV mostrando a soma duas funções exponenciais se ajustando ao decaimento da corrente (painel B, linha azul escuro). (C) São registros obtidos de neurônios tiamina (-), já em (D) o registro mostra uma corrente de potássio a +40 mV, com apenas uma função exponencial se ajustando ao decaimento da corrente (linha azul clara). Tanto na situação tiamina (+) quanto tiamina (-) o potencial de membrana foi mantido em -80 mV e os neurônios foram despolarizados com passos de -80 a +70 mV, acrescidos de 10mV. O intervalo entre pulso foi de 10 segundos. Os neurônios em ambas situações, tiamina (+) e tiamina (-), foram estudados com sete dias de cultura. Teste t de *Student*.

As correntes de potássio obtidas dos neurônios granulares controle [tiamina (+)] apresentaram o componente transiente e o sustentado [Figura 27A]. O decaimento foi ajustado pela soma de duas exponenciais [Figura 27B – equação 7]. As correntes de potássio obtidas a partir dos neurônios “deficientes” [Figura 27C] apresentaram, aparentemente, apenas o componente sustentado. O decaimento da corrente pode ser ajustado com apenas uma exponencial [Figura 27D – equação 6]

A figura 28 mostra as constantes de tempo obtidas para os neurônios granulares, tiamina (+) e tiamina (-), [tiamina (+):  $\tau_{\text{rápido}} = 17 \pm 1,3$  ms e  $\tau_{\text{lento}} = 200 \pm 46$  ms; tiamina (-):  $\tau = 96 \pm 17$  ms – painel esquerdo] e a contribuição relativa de cada componente para o decaimento da corrente total de potássio [painel direito].

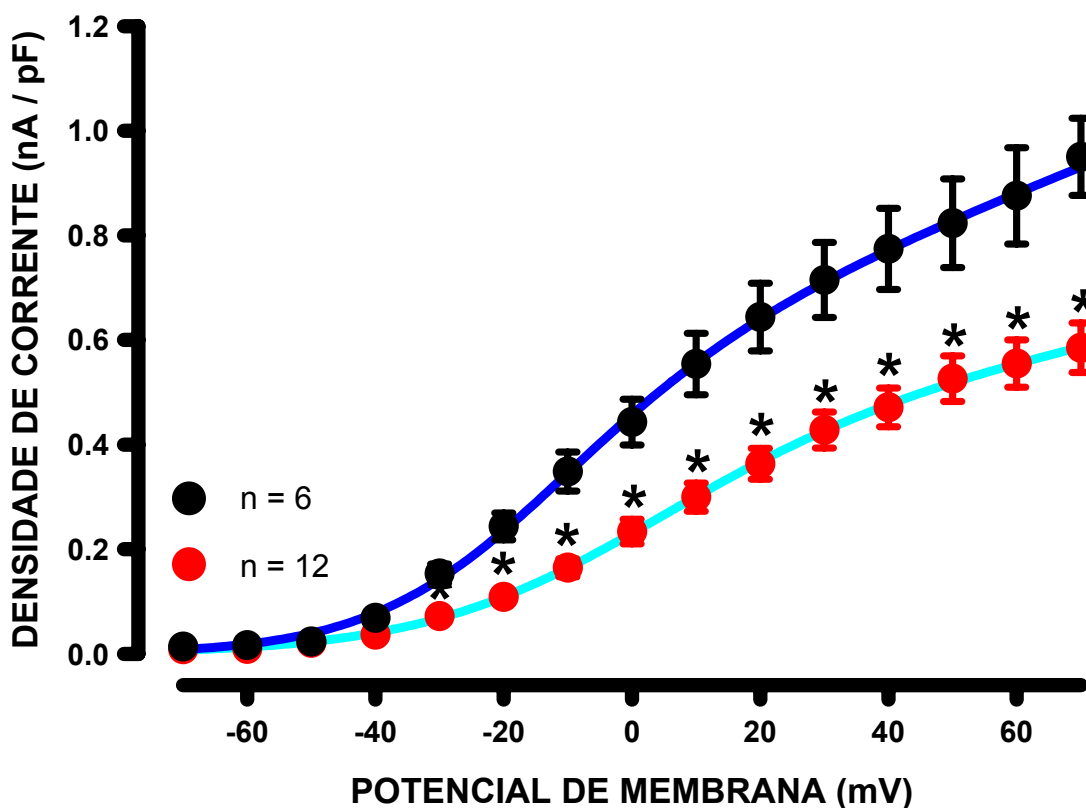


**Figura 28 – Deficiência de tiamina *in vitro* altera a inativação das correntes de potássio dos neurônios granulares.**

Painel a esquerda mostra o valor das constantes de tempo para a inativação no potencial de membrana de +40 mV. Neurônios tiamina (+) mostraram duas constantes de tempo [rápida

( $\tau_{\text{rápido}}$ ) e lenta ( $\tau_{\text{lento}}$ ) – equação 7], já os neurônios tiamina (-) apenas uma ( $\tau$ ) – equação 6. O painel a direita mostra a contribuição relativa calculada de cada componente, rápido e lento, para o neurônio tiamina (+), segundo as equações 8 e 9. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.

A densidade de corrente do tipo transiente mostrou-se diminuída para os neurônios “deficientes” a partir do potencial de -30 mV [Figura 29]. As linhas contínuas da Figura 29 representam o ajuste segundo a equação 10.



**Figura 29 – Deficiência de tiamina *in vitro* diminui a densidade de corrente de potássio do tipo A em neurônios granulares do cerebelo.**

Densidade de corrente em relação a voltagem. Tiamina (+) (círculos pretos) e tiamina (-) (círculos vermelhos). Os valores foram medidos no pico. As linhas contínuas (azuis) foram

obtidas usando a equação (10). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de registros de neurônios controle e deficientes com  $*p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.

A tabela V sumaria os dados obtidos pelo ajuste dos pontos da corrente de potássio transiente em relação à voltagem.

**Tabela V – Parâmetros obtidos para o melhor ajuste da relação densidade de corrente versus voltagem segundo a equação 10.**

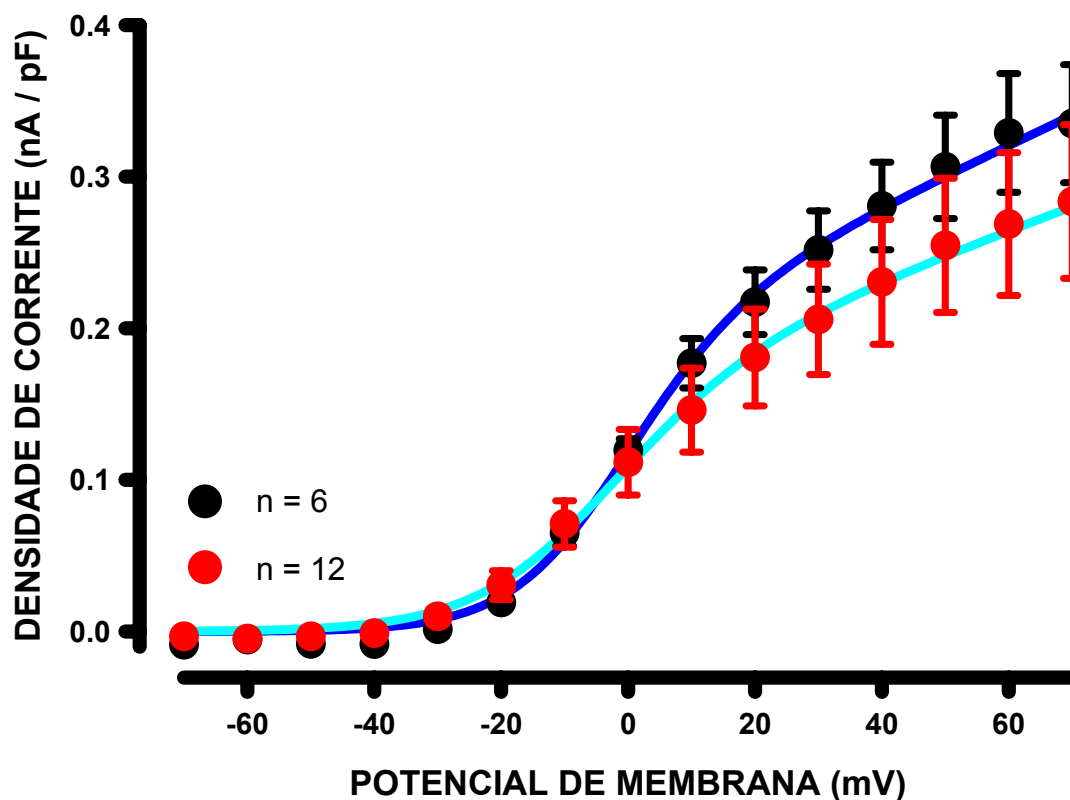
### CORRENTE TRANSIENTE

	$G_{máx}$	$V_a$	$K_a$
Tiamina (+)	$5 \pm 0.6 \text{ nS}/\rho\text{F}^*$	$-18.9 \pm 4.5 \text{ mV}^*$	$16.4 \pm 2.8 \text{ mV}$
Tiamina (-)	$2 \pm 0.4 \text{ nS}/\rho\text{F}$	$-4.10 \pm 3.0 \text{ mV}$	$18.7 \pm 1.1 \text{ mV}$

Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM;  $*p < 0,05$ . Teste t de *Student*.



A densidade de corrente sustentada [Figura 30, Tabela VI – equação 10], bem como a capacitância neuronal [Figura 31] não mostraram alterações significativas.



**Figura 30 – Deficiência de tiamina *in vitro* não altera a densidade de corrente de potássio do tipo retificadora retardada em neurônios granulares do cerebelo.**

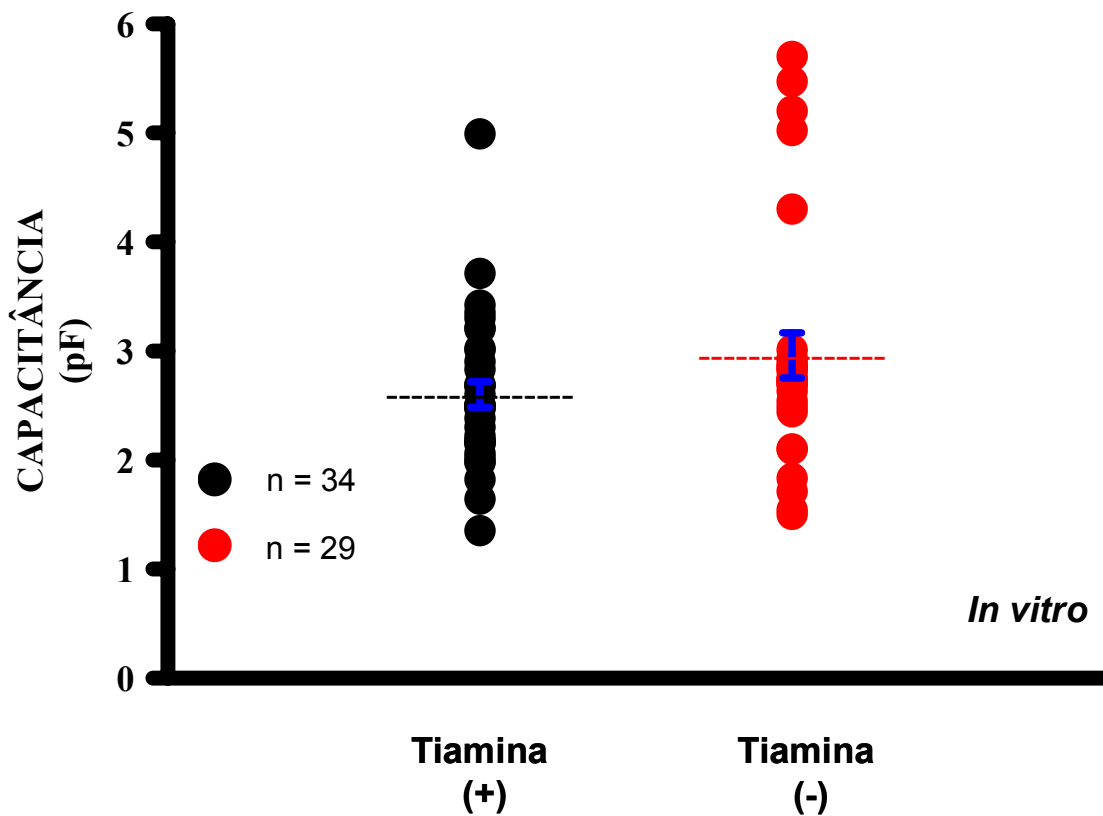
Densidade de corrente em relação a voltagem. Tiamina (+) (círculos pretos) e tiamina (-) (círculos vermelhos). As correntes foram medidas tomando os valores médios de corrente dos 250ms aos 390ms finais de cada pulso de voltagem. As linhas contínuas (azuis) foram obtidas usando a equação (10). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de registros de neurônios controle e deficientes. Teste t de *Student*.

Tabela VI – Parâmetros obtidos para o melhor ajuste da relação densidade de corrente versus voltagem segundo a equação 10.

### CORRENTE SUSTENTADA

	$G_{máx}$	$V_a$	$K_a$
Tiamina (+)	$2 \pm 0.2 \text{ nS}/\rho\text{F}$	$-3.12 \pm 1.73 \text{ mV}$	$9.41 \pm 1.06 \text{ mV}$
Tiamina (-)	$1.6 \pm 0.2 \text{ nS}/\rho\text{F}$	$-6.32 \pm 2.28 \text{ mV}$	$11.40 \pm 1.22 \text{ mV}$

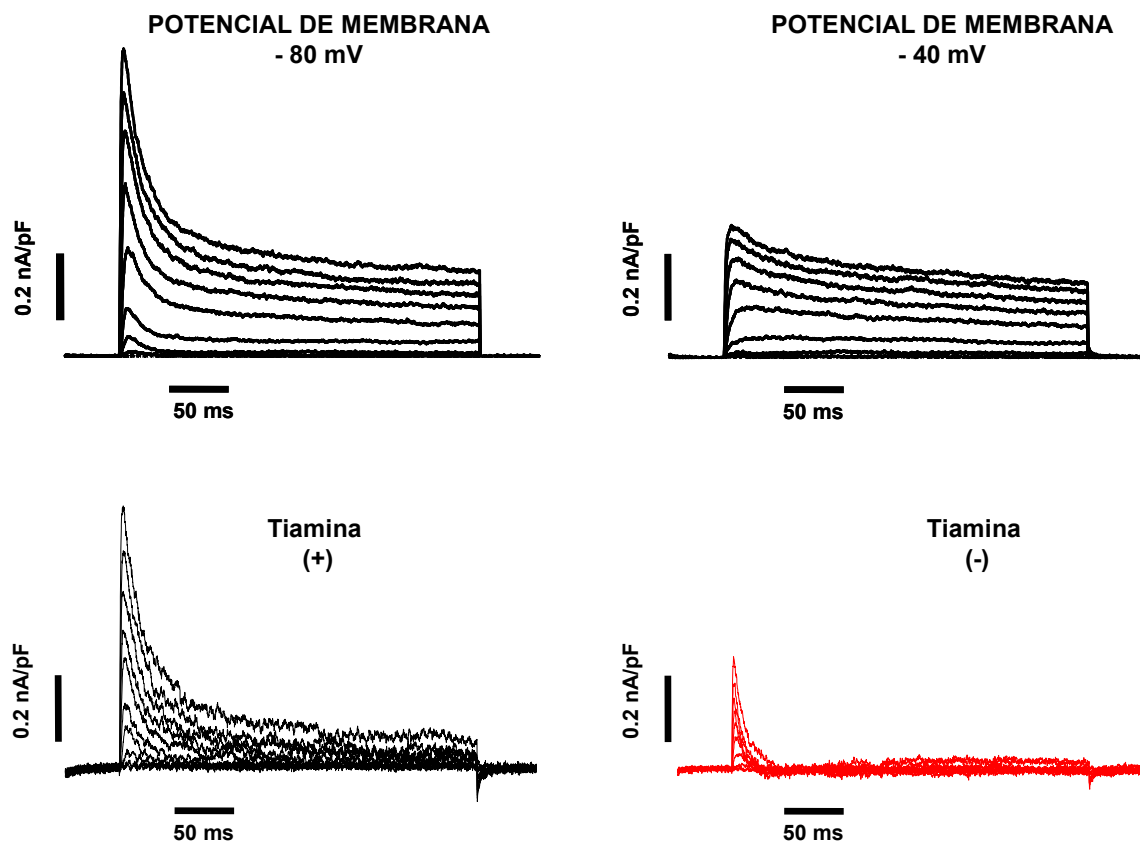
Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$ . Teste t de Student.



**Figura 31 – Deficiência de tiamina *in vitro* não aumenta a capacitância dos neurônios granulares de cerebello.**

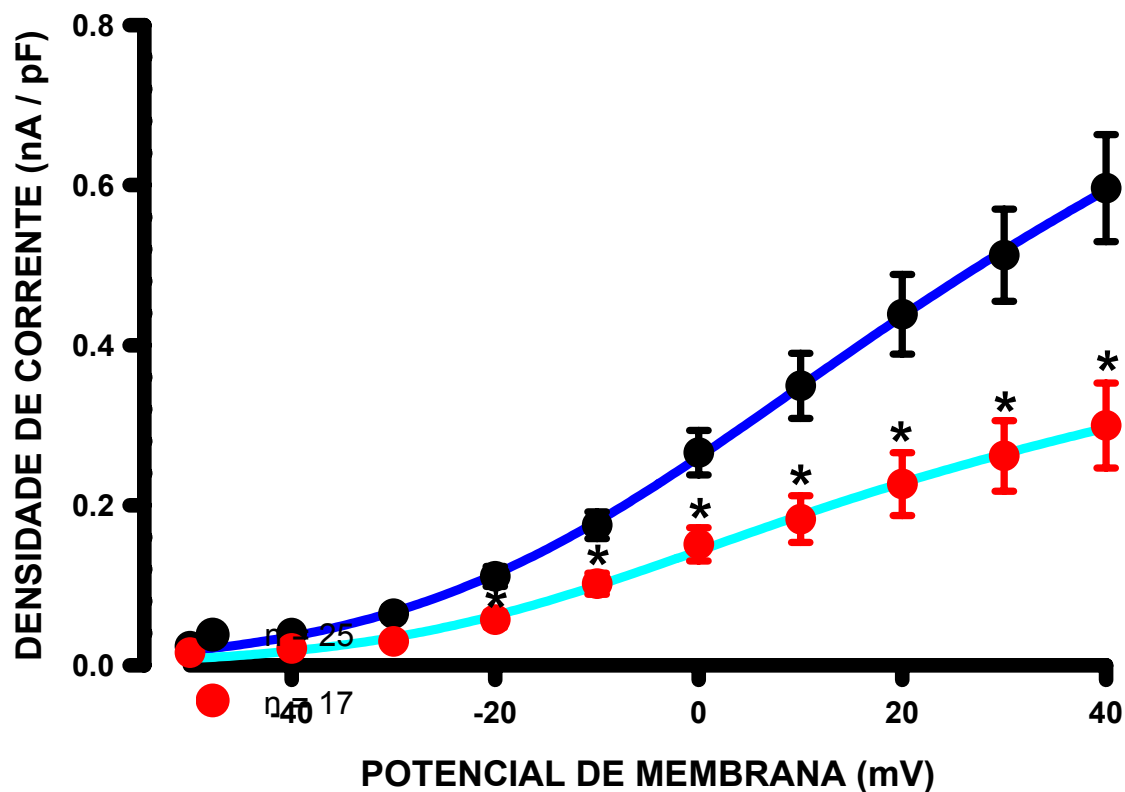
Os neurônios foram retirados de animais tiamina (+), e mantidos em meio tiamina (-) para a condição deficiente, durante 7 dias. O gráfico mostra que as células submetidas ao meio tiamina (-) (círculos vermelhos – n=29) não alteraram sua capacitância em relação ao grupo mantido em meio tiamina (+) (círculos pretos – n=34). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. Teste t de *Student*.

Os resultados das correntes de potássio nos neurônios granulares submetidos à deficiência em tiamina *in vivo* e *in vitro*, mostraram alterações no componente transiente da corrente. O componente transiente nas células granulares do cerebelo se correlaciona com a corrente de potássio chamada de “A”, assim o isolamento desta corrente fez-se necessário. Para isolar a corrente do tipo-A foram realizados protocolos de estimulação partindo de um potencial mantido em -80 mV e logo depois em -40 mV na presença de bloqueadores de canais para cálcio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) e para sódio (TTX) na solução externa [Figura 32 – painel superior]. O potencial de -40 mV inativa os canais que são responsáveis pela corrente de potássio transiente, assim a família de correntes relativas ao potencial de -40 mV eram subtraídas da família de correntes obtidas do potencial de repouso de -80 mV, restando assim, apenas a corrente do tipo-A (Bardoni and Belluzzi, 1991; Bardoni and Belluzzi, 1993; Mathie *et al.*, 2003) [Figura 32 – painel inferior].



**Figura 32 – Registros de correntes de potássio para subtração do componente retificador retardado.**  $K_V$  e  $K_A$  foram registradas por despolarizações progressivas de 10 mV com pulsos de 300 ms partindo de um potencial de repouso de -80 mV (painel superior esquerdo) ou -40 mV (painel superior direito). A subtração das famílias de correntes obtidas pelos dois protocolos resultava na corrente de potássio do tipo-A. O painel inferior esquerdo mostra uma  $K_A$  para um neurônio tiamina (+), sendo que o painel inferior direito uma  $K_A$  para o neurônio tiamina (-).

A densidade de corrente do tipo-A, nos neurônios granulares submetidos à deficiência *in vitro*, mostrou diminuição acentuada quando comparada aos neurônios controles [Figura 33]. As linhas azuis da Figura 33 representam o ajuste segundo a equação 10, sendo seus parâmetros apresentados na tabela VII.



**Figura 33 – Densidade de corrente em relação a voltagem para as correntes do tipo A.** O gráfico mostra o pico das correntes  $K_A$  em relação à voltagem da membrana. Os círculos pretos representam a média  $\pm$  EPM na situação tiamina (+) e os círculos vermelhos na situação tiamina (-). As linhas contínuas azuis são ajustes segundo a equação 10. \* $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significante. Teste t de *Student*.

Tabela VII – Parâmetros obtidos para o melhor ajuste da relação densidade de corrente versus voltagem segundo a equação 10.

### CORRENTE DE POTÁSSIO DO TIPO A

	$G_{máx}$	$V_a$	$K_a$
Tiamina (+)	$5 \pm 0.6 \text{ nS}/\rho\text{F}$	$-6.7 \pm 6.31 \text{ mV}$	$19 \pm 6 \text{ mV}$
Tiamina (-)	$2.4 \pm 0.3^* \text{ nS}/\rho\text{F}$	$-11.9 \pm 7 \text{ mV}$	$16 \pm 7 \text{ mV}$

Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$ . Teste t de Student.

Com o objetivo de melhor caracterizar o componente transiente da corrente total de potássio, os parâmetros cinéticos foram calculados. Para o estudo do processo de ativação a Figura 37 mostra o ajuste dos valores experimentais da corrente “A” segundo a equação 11 [painel superior]. O ajuste da cinética de ativação foi realizado por uma exponencial de 3<sup>o</sup> ordem (Bardoni and Belluzzi, 1993; D'Angelo *et al.*, 2001), a qual adequou-se melhor aos dados experimentais baseado em critérios estatísticos (valores de R<sup>2</sup> e de F). A relação constante de tempo *versus* voltagem revela que não há diferença para a ativação das correntes de potássio para os neurônios submetidos à deficiência *in vitro* [Figura 34, painel inferior]. As linhas contínuas representam o ajuste feito pela equação 12.



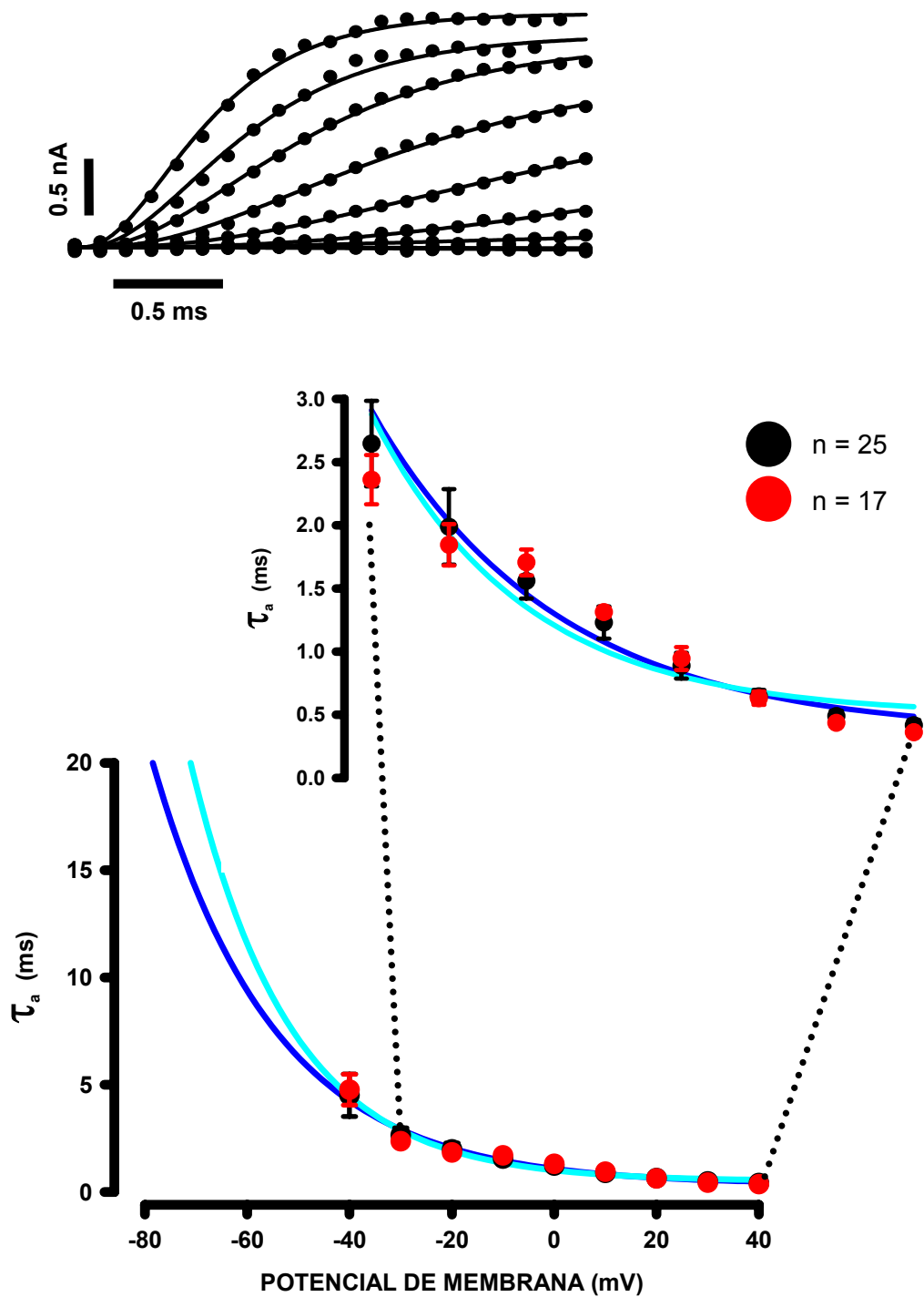
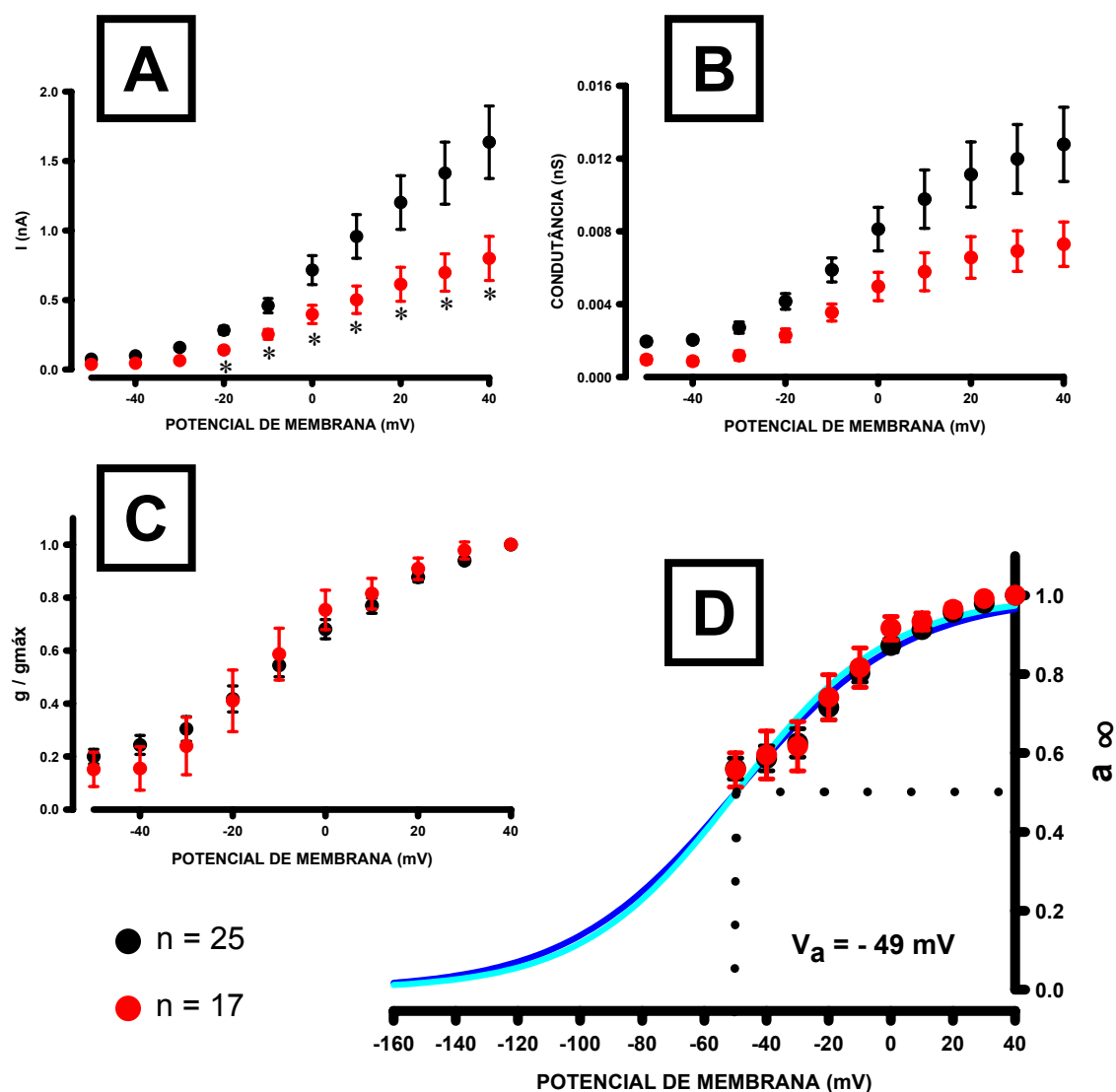


Figura 34 – Caracterização cinética do mecanismo de ativação da  $I_A$  em neurônios granulares do cerebelo. Painel superior mostra a análise da cinética de ativação da  $I_A$ . A linha contínua mostra o ajuste feito segundo equação 11, adotando uma cinética de terceira

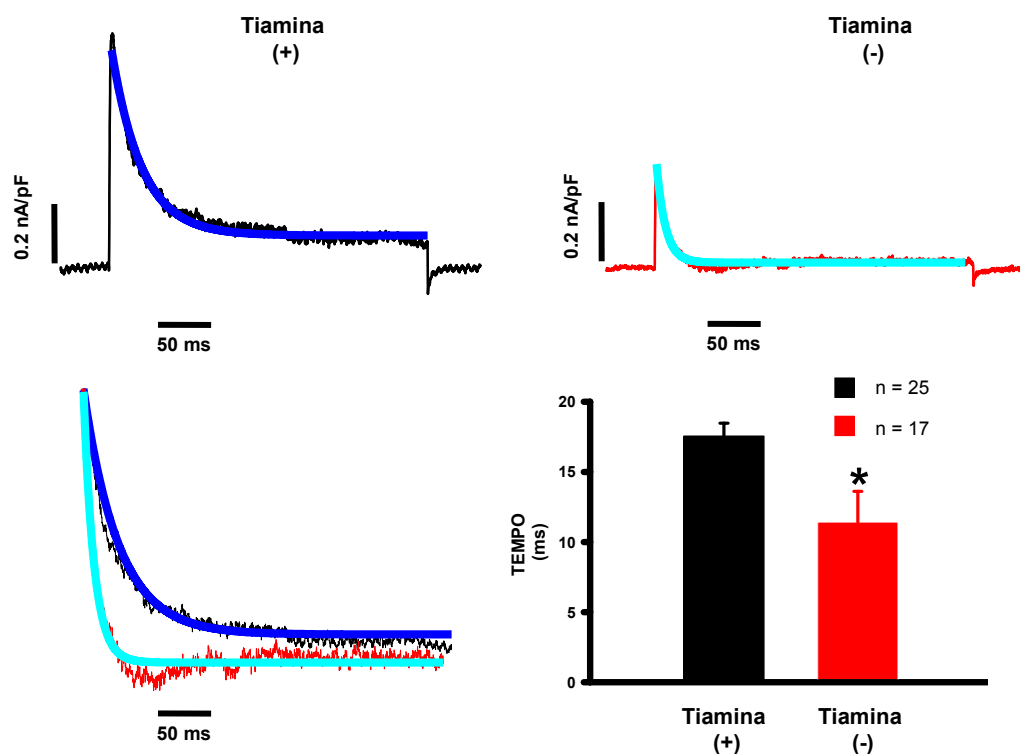
ordem. O gráfico (painel inferior) mostra a dependência de voltagem da constante de tempo de ativação. O setor evidenciado mostra uma ampliação do segmento de -30 a +40 mV. Os pontos foram ajustados pela equação 12. Círculos pretos e vermelhos representam a situação tiamina (+) e tiamina (-) respectivamente. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. Significante. Teste t de *Student*.

Através dos registros das correntes de  $K^+$  do tipo-A foram medidos os valores máximos nos potenciais de -50 a +40 mV [Figura 35A]. Com estes valores a condutância foi calculada pela equação 13 e normalizadas pela condutância máxima ( $g/g_{m\acute{a}x}$ ) [Figura 35B e C]. O estado de ativação estacionária,  $a^\infty$ , foi calculado pela equação 14 e está representado na Figura 35D. As curvas azuis (linhas contínuas) obedecem a equação 13.



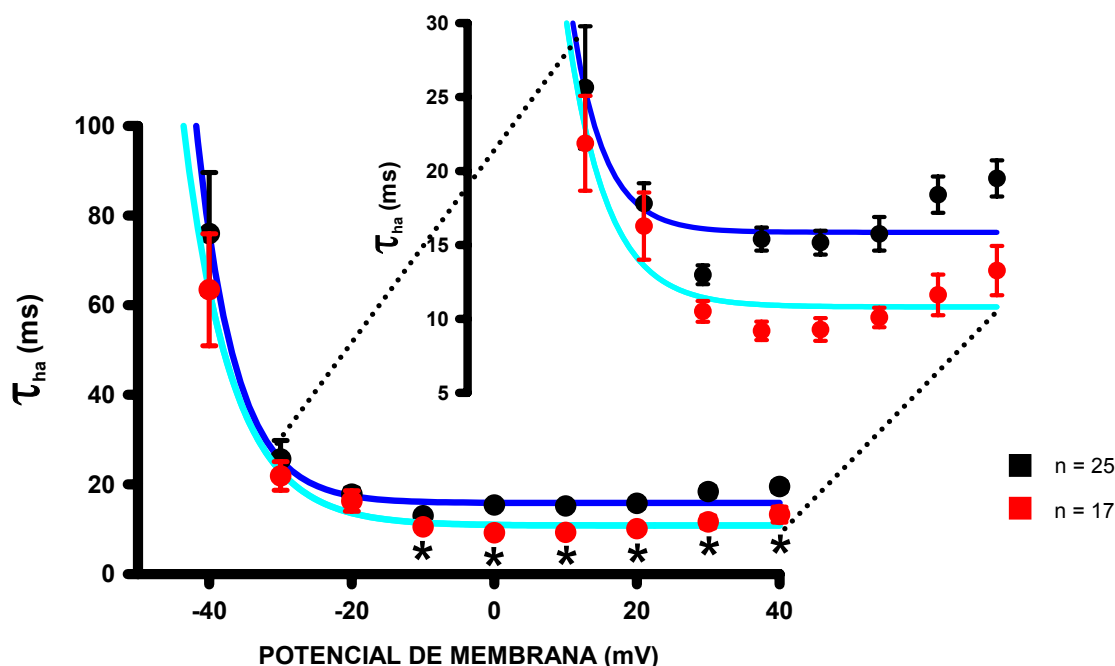
**Figura 35 – Dependência de voltagem do estado-estacionário de ativação.** (A) relação I-V da corrente  $I_A$ . (B) condutância de  $I_A$  calculada pela equação 13. (C) condutância normalizada pela condutância máxima ( $g/g_{\text{máx}}$ ). (D) dependência de voltagem do estado estacionário da ativação ( $a_{\infty}$ ). As linhas contínuas (azuis) foram obtidas usando a equação 15 com  $V_a = -49 \text{ mV}$  e a inclinação (slope) = 27 [tiamina (+)] e 25 [tiamina (-)]. Tiamina (+) (círculos pretos) e tiamina (-) (círculos vermelhos). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM com  $*p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Teste t de *Student*.

A cinética de inativação foi primeiramente investigada ajustando o decaimento das correntes registradas a +40 mV, tanto da situação tiamina (+) quanto tiamina (-) [Figura 36, painel superior]. Após a normalização das correntes ficou evidenciado que o decaimento da corrente de potássio em +40 mV possuía um curso temporal distinto nos neurônios submetidos a deficiência de tiamina *in vitro* [tiamina (+):  $17,6 \pm 0,9$  ms; tiamina (-):  $11,4 \pm 2,2$  ms; Figura 36, painel inferior].



**Figura 36 – Caracterização da constante de tempo de inativação.** Os painéis superiores representam correntes  $I_A$  em +40 mV, sendo o esquerdo na situação tiamina (+) e o direito na situação tiamina (-). Painel inferior esquerdo mostra as correntes normalizadas pelo pico. As linhas contínuas (azuis) foram obtidas usando a equação 6. O gráfico de barras representa a média  $\pm$  EPM das constantes de tempo para o decaimento da  $I_A$ ; \* $p < 0,05$  foi considerado ser estatisticamente significativo. Tiamina (+) barra ou correntes em preto; tiamina (-) barra ou corrente em vermelho. Teste t de *Student*.

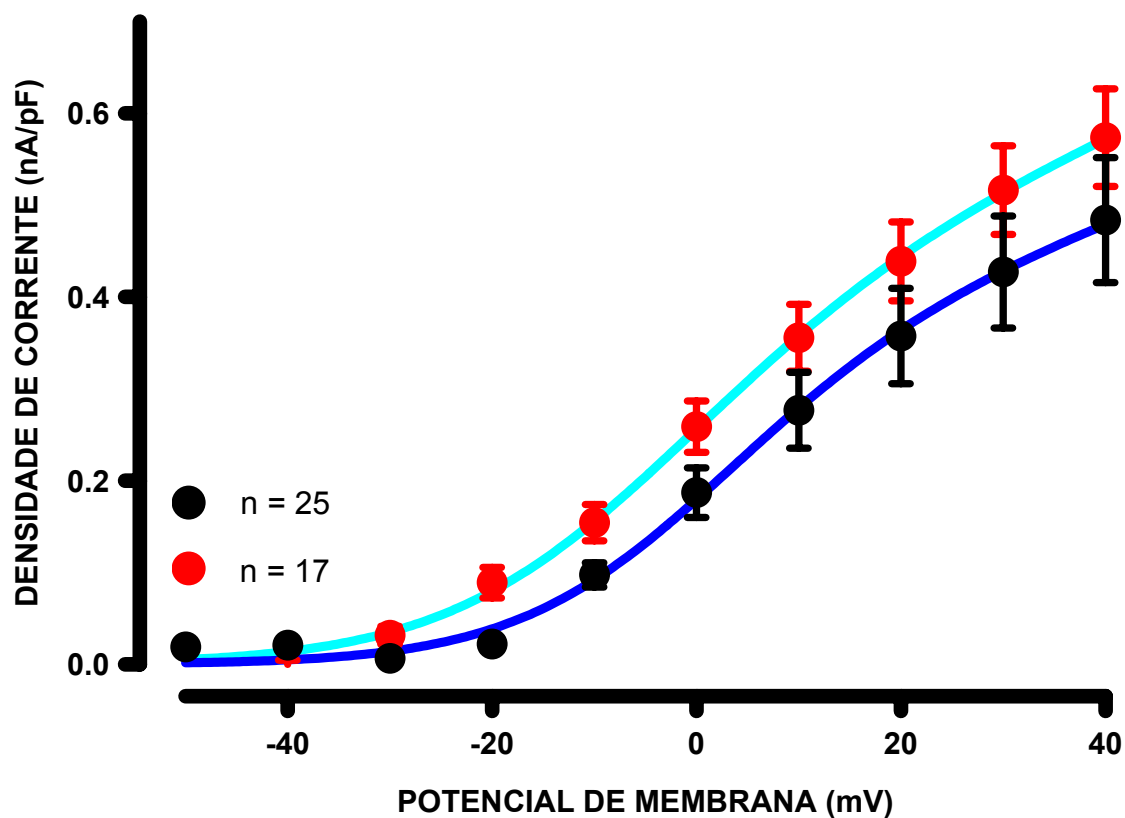
A figura 37 mostra a dependência de voltagem para a constante de tempo de inativação.



**Figura 37 – Dependência de voltagem para a constante de tempo de inativação da corrente tipo-A.** O gráfico mostra a dependência de voltagem da constante de tempo da inativação. O decaimento foi ajustado por apenas uma exponencial segundo a equação 6 [círculos pretos = tiamina (+); círculos vermelhos = tiamina (-)]. As linhas contínuas (azuis) foram obtidas usando a equação 16. Nas voltagens de -10 a +40 mV há diminuição no valor para a constante de tempo de inativação da situação tiamina (-) (círculos vermelhos). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significante. Teste t de *Student*.

As correntes de potássio do tipo retificadora-retardada, as quais foram obtidas através da subtração das correntes  $I_A$ , não apresentaram diferença na densidade de corrente [Figura 38] bem como nos parâmetros cinéticos [Figura

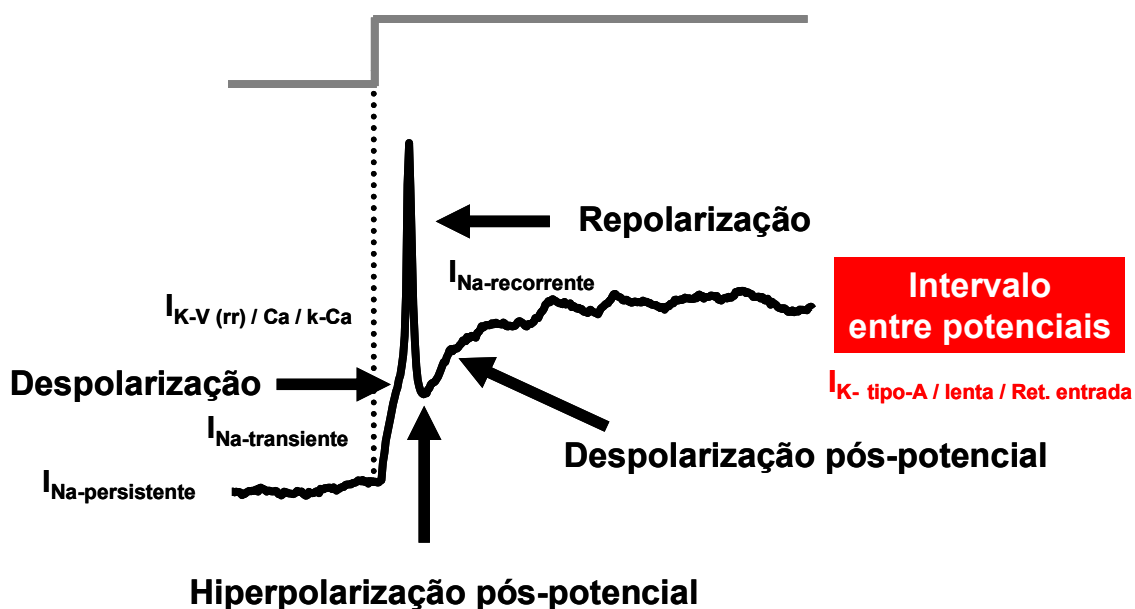
38, linhas azuis – equação 10] tiamina (+):  $V_a = -1,4 \pm 1,2$  mV,  $G_{m\acute{a}x} = 0,004 \pm 0,0001$  nS,  $K_a = 10,6 \pm 1,2$  mV; tiamina (-):  $V_a = -6,9 \pm 2,9$  mV;  $G_{m\acute{a}x} = 0,005 \pm 0,0003$  nS ;  $K_a = 12,2 \pm 2,9$  mV.



**Figura 38 –Densidade de corrente do tipo retificadora-retardada.** O gráfico mostra a densidade de corrente do tipo retificadora-retardada nos neurônios granulares do cerebelo após a subtração da  $I_A$ . Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas (azuis) foram obtidas usando a equação 10. Os Círculos pretos e vermelhos simbolizam a situação tiamina (+) e tiamina (-) respectivamente. Teste t de *Student*.

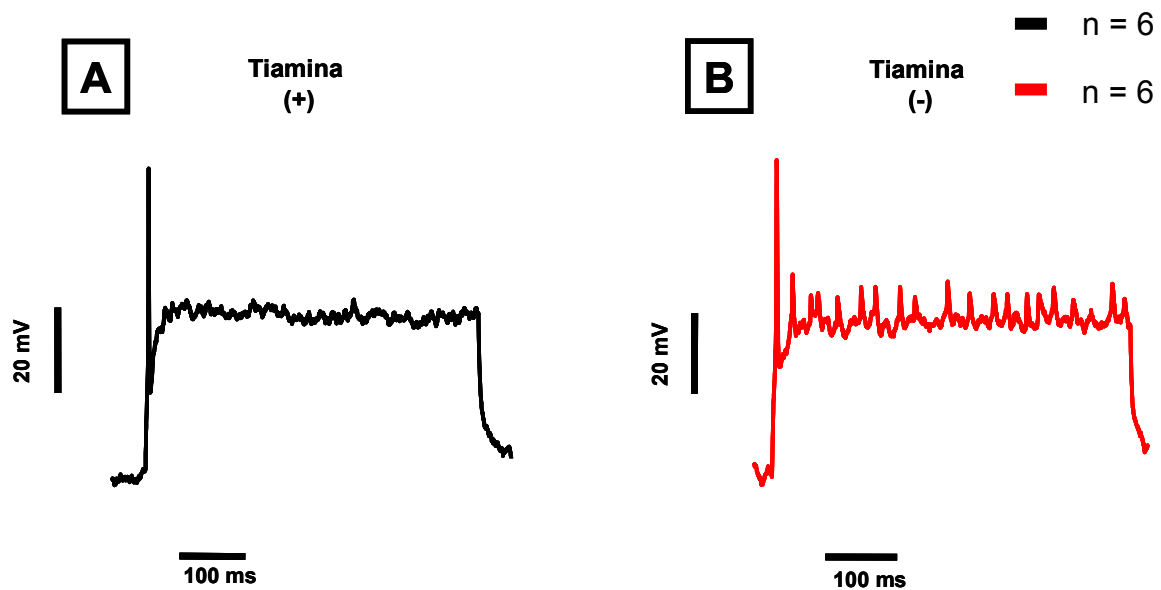
Com a caracterização biofísica do componente afetado em maior proporção no nosso modelo, fizemos a pergunta de como estaria a excitabilidade dos neurônios granulares submetidos a privação de tiamina, uma vez que a corrente de potássio A tem um papel muito importante no controle da frequência de disparos nestes neurônios. Para responder esta pergunta idealizamos um protocolo de estimulação que nos permitisse avaliar as características dos potenciais de ação.

O registro de potenciais de ação dos neurônios granulares do cerebelo foi feito através da técnica de patch-clamp no modo de fixação de corrente. O registro mostrou tipicamente 4 fases, a saber: despolarização, repolarização, hiperpolarização pós-potencial e despolarização pós-potencial [Figura 39].



**Figura 39 – Fases do potencial de ação nos neurônios granulares do cerebelo.** Potenciais de ação foram registrados nos neurônios granulares por pulsos de correntes despolarizantes. Neste potencial são evidenciadas as fases e os canais que provavelmente

estão ativados em cada uma delas.  $I_{K-V}$  = corrente de potássio dependente de voltagem, com similaridades aos retificadores-retardados;  $I_{K-Ca}$  = corrente de potássio dependente de cálcio ("Big-K");  $I_{K-tipo-A}$  = corrente de de potássio dependente de voltagem de ativação e inativação rápida;  $I_{lenta}$  = corrente de potássio lenta, independente de cálcio e insensível a tetraetilamônio (TEA);  $I_{ret. entrada}$  = corrente de potássio retificadora de entrada de cinética rápida.

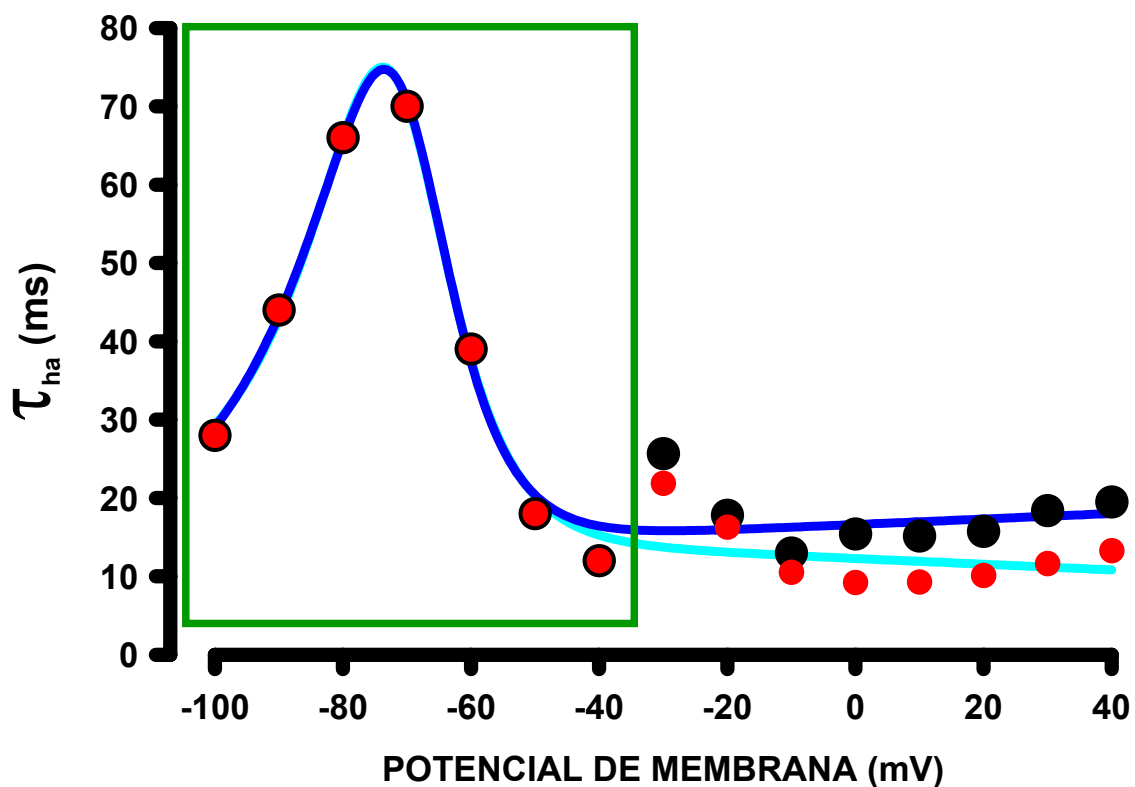


**Figura 40 – Deficiência de tiamina causa aumento da excitabilidade celular.** Os potenciais de ação foram registrados aplicando pulsos de despolarização supra-limiar nos neurônios granulares do cerebelo durante 500 ms. O painel (A) mostra o registro de um potencial de ação neuronal na situação tiamina (+). (B) registro do potencial de ação na deficiência de tiamina, evidenciando pequenas despolarizações durante o pulso.



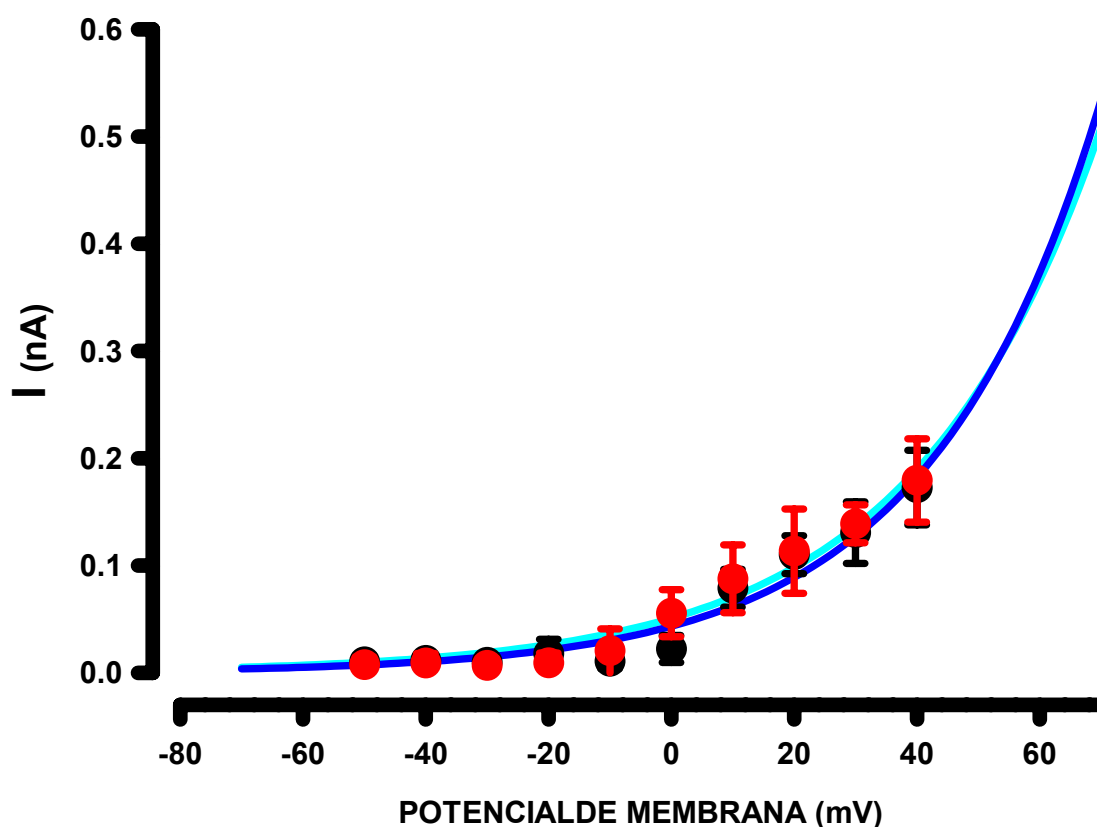
Os potenciais são gerados por súbito aumento da corrente de  $\text{Na}^+$  transiente seguida da ativação da  $I_{\text{K-V}}$ ,  $I_{\text{Ca}}$  e  $I_{\text{K-Ca}}$ . Estas correntes contribuem para a maior parte do potencial de ação (despolarização e repolarização), bem como para a fase de hiperpolarização pós-potencial, embora tenham outras correntes com menores amplitudes. A  $I_{\text{Na}_{\text{persistente}}}$  aumenta durante o potencial pré-potencial de ação e persiste durante vários milissegundos. A corrente de sódio recorrente ( $I_{\text{Na}_{\text{recorrente}}}$ ) aumenta logo após o potencial de ação. A  $I_{\text{K-A}}$ ,  $I_{\text{ret}}$  e  $I_{\text{lenta}}$  são importantes durante o intervalo entre potenciais, interferindo na frequência de disparo. Uma alta frequência de despolarizações de baixa amplitude durante o pulso foram observadas nos neurônios deficientes em tiamina [Figura 40B]. Este comportamento provavelmente está relacionado à diminuição da condutância ao potássio associada aos canais do tipo A.

Como o próximo passo do nosso estudo era tentar reconstruir as correntes e os potenciais de ação das células granulares, as quais têm potencial de repouso em aproximadamente -70 mV, precisávamos obter valores para as constantes de tempo da inativação para potenciais mais baixos do que -30 mV, pois só conseguimos ajustes satisfatórios a valores para potenciais iguais ou maiores que -30 mV [Figura 37], assim utilizamos os dados propostos por BARDONI E BELLUZZI (1993) para estimarmos as constantes de tempo nos potenciais de -40 a -100 mV [Figura 41 – quadro verde] e depois realizamos o ajuste dos pontos pela equação 17.



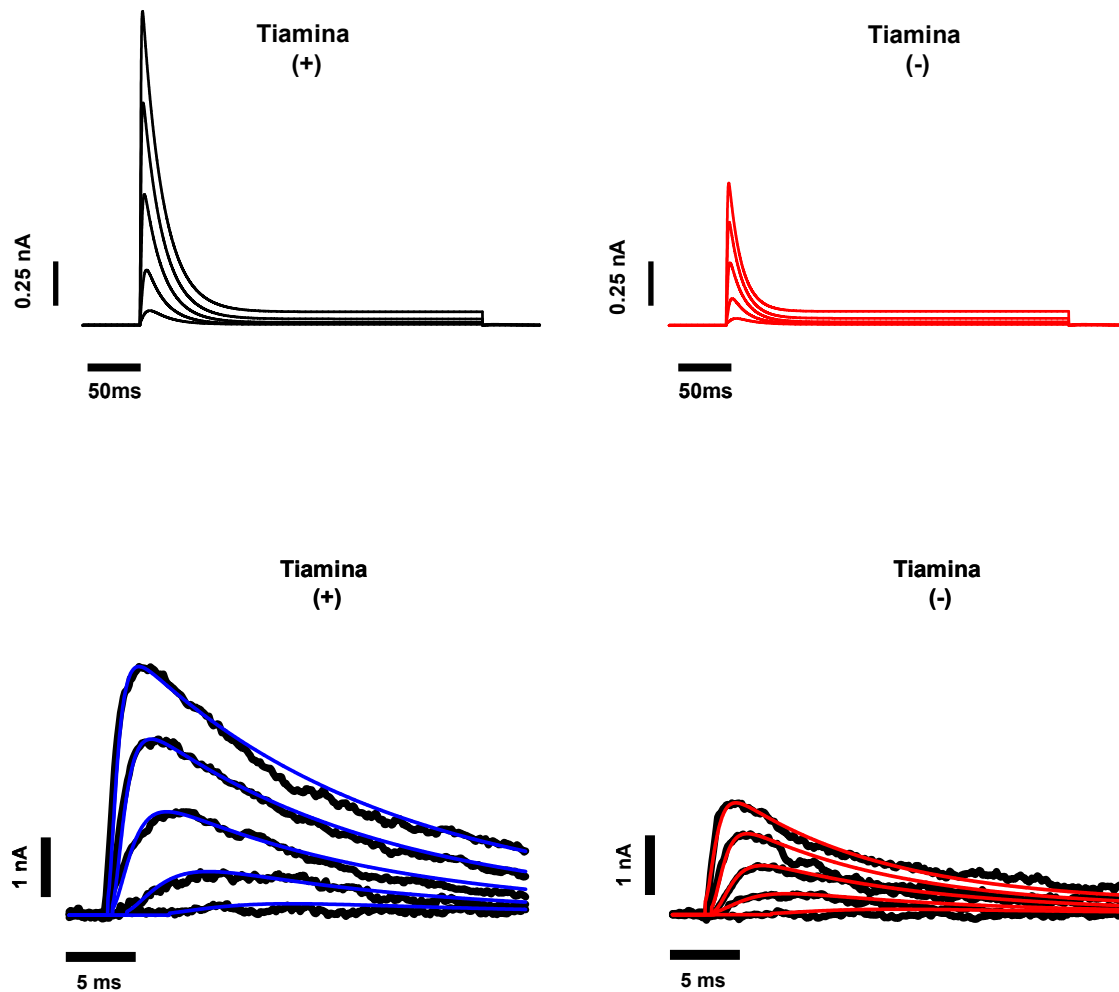
**Figura 41 – Dependência de tensão para a constante de tempo de inativação da corrente tipo-A em potenciais abaixo de -30 mV.** O gráfico mostra a constante de tempo de inativação em relação a tensão obtido do decaimento da corrente como mostrado na figura 33 entre a tensão de -30 a +40 mV [círculos pretos = tiamina (+); círculos vermelhos = tiamina (-)]. Os pontos da constante de inativação da corrente  $I_A$  para valores abaixo de -30 mV foram calculados através dos dados de BARDONI e BELLUZZI (1993). As linhas contínuas (azuis) foram obtidas usando a equação 17 (símbolos dentro do quadro verde).

As correntes de potássio “A” apresentam uma corrente residual, que aparece em voltagens mais despolarizantes do que -10 mV e aumenta para pulsos positivos (Bardoni and Belluzzi, 1993). Esta corrente foi quantificada, pelo componente  $A_0$  da equação 6 e está representada abaixo [ Figura 42].

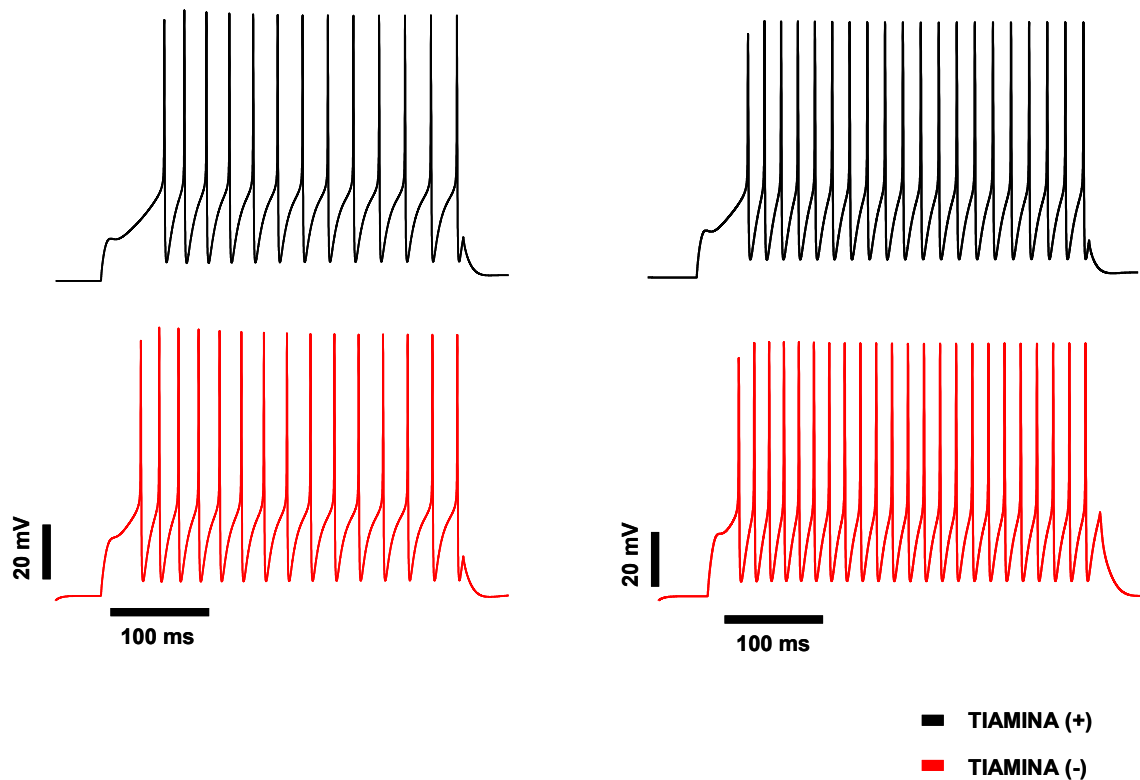


**Figura 42 – Dependência de voltagem para a corrente residual.** Símbolos pretos representam os valores médios  $\pm$  EPM para a situação controle e os vermelhos para a situação deficiente em tiamina. Teste t de *Student*. As linhas são ajustes que obedecem a equação 18.

O modelamento matemático das correntes de potássio “A” resultou em famílias de correntes semelhantes àsquelas obtidas experimentalmente [Figura 43].



**Figura 43 – Simulação das correntes de potássio tipo-A.** Correntes de potássio do tipo-A obtidas com parâmetros cinéticos dos dados experimentais de neurônios controle (preto – painel superior) e deficientes em tiamina (vermelho - painel superior). O painel inferior mostra registros experimentais (linhas pretas) superpostos pelas correntes obtidas no modelamento. As linhas azuis representam o resultado da simulação das correntes de potássio “A” controle e as vermelhas o modelamento para o deficiente em tiamina.



**Figura 44 - Simulação de potenciais de ação da célula granular do cerebelo.** Os traçados pretos representam os neurônios controle e os vermelhos os deficientes. Painel esquerdo 16pA de corrente injetada, painel direito 20pA.

Através do modelo proposto por D'angelo et al. (2001) para a célula granular do cerebelo, simulamos potenciais de ação nestes neurônios. Os parâmetros biofísicos das correntes de potássio do tipo-A no modelo foram substituídas pelos parâmetros obtidos durante o nosso estudo. A simulação de potenciais de ação referentes à situação deficiente mostrou um aumento na frequência de disparos, contudo as pequenas despolarizações obtidas durante o pulso não foram reproduzidas [Figura 44], sugerindo um possível envolvimento de outro sistema durante esta fase.

## **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

## DISCUSSÃO

A deficiência em tiamina leva a redução das enzimas dependentes deste co-fator . A tiamina por não ser sintetizada no organismo precisa ser ingerida juntamente com os alimentos. Após sua ingestão ela sofrerá absorção no trato gastrointestinal até ser, finalmente, transportada para dentro da célula. Dentro da célula ela servirá como co-fator para enzimas do metabolismo intermediário . Animais que foram submetidos à deficiência em tiamina a partir da dieta mostraram queda significativa na atividade da enzima transcetolase a partir apenas do 32<sup>o</sup> dia sendo que esta queda correlacionava-se com o desaparecimento da tiamina na circulação.[Figura 14] (Warnock, 1975). Os animais do grupo controle também apresentaram uma pequena queda na atividade da transcetolase no início do experimento, que pode ser explicado pela troca da alimentação industrial por uma alimentação balanceada, assim, logo após a redução das dosagens da atividade enzimática, os valores se mantiveram constantes até o final do experimento [Figura 14]. WARNOCK (1970) relata que ratos machos submetidos a uma dieta deficiente em tiamina exibem declínio na atividade da transcetolase já a partir do 8<sup>o</sup> dia de deficiência, contudo só podem ser considerados “deficientes” a partir do 17<sup>o</sup> dia, aproximadamente. O autor diz que a quantidade de tiamina usada na produção da ração controle foi de 200 mg/kg, sendo que nós usamos 500 mg/kg, o que poderia explicar o aumento da atividade enzimática nos ratos controles. Um parâmetro para a confirmação da existência de níveis baixos de tiamina são os sinais clínicos apresentados pelo animal submetidos a dieta deficiente, como

anorexia e perda de peso. Estes sinais são peculiares de animais que estão sofrendo da deficiência em vitamina B<sub>1</sub>. Nas nossas condições experimentais, os ratos exibiam perda de peso corpóreo a partir de 4 semanas e anorexia a partir da segunda semana, confirmando que o nosso tratamento estava sendo efetivo.

Existem dados mostrando que na ausência de tiamina certos substratos neurais são afetados, dentre eles o cerebelo (Butterworth, 1982; Mulholland, 2006). Quando o cerebelo é afetado, ocorrem sinais e sintomas que podem ser detectados por testes comportamentais (Bures *et al.*, 1983). Ataxia é um distúrbio cerebelar relacionado à falta de coordenação dos movimentos (Lent, 2001; Shumway-cook and Woollacott, 1995). No nosso estudo, os animais apresentaram ataxia cerebelar quando submetidos a testes comportamentais ao fim do primeiro mês. Estes ratos mostraram, no teste de marcha, uma base alargada e maior comprimento da passada [Figura 15]. Tomados em conjunto estes dados sugerem que os animais apresentaram distúrbios motores e que nos fez supor que o cerebelo estava sofrendo alterações funcionais importantes durante a depleção vitamínica. Surpreendentemente, quando este mesmo grupo de animais foi submetido ao teste de motricidade, ele apresentou melhor performance do que os animais do grupo controle [Figura 16]. Uma explicação possível seria o fato de que a deficiência em tiamina acomete preferencialmente os neurônios granulares (Mulholland, 2006; Pannunzio *et al.*, 2000). As células granulares poderiam, de alguma maneira, responder de forma mais rápida as aferências cinestésicas, e assim, corrigir os erros das fibras trepadeiras mais eficientemente perante a demanda funcional (Ohyama *et al.*, 2003).



Para nos certificar que o cerebelo estava envolvido nestas alterações e que a camada granular estava realmente comprometida, foi realizada a morfometria desta parte do córtex cerebelar. A camada granular se apresentou diminuída [Figura 17]. Esta observação sugeria de maneira significativa de que o modelo usado neste estudo estava levando os neurônios granulares à morte.

A encefalopatia de Wernicke é uma desordem neurodegenerativa, bem caracterizada, causada pela deficiência de vitamina B1 e, aparentemente ela tem dois mecanismos; um reversível, quando ocorre a reposição de tiamina e outro irreversível (Pannunzio *et al.*, 2000). A deficiência em tiamina, pode conduzir a uma diminuição do metabolismo oxidativo mitocondrial e, conseqüentemente, morte neuronal (Sparacia *et al.*, 1999). Contudo, estes mecanismos ainda não estão bem esclarecidos e suas vias ainda permanecem obscuras. Sabe-se que em alcoólatras crônicos, pacientes da SIDA, hiperemesis gravidarum, malnutrição, doenças do trato gastrointestinal, entre outras situações podem levar a deficiência de tiamina (Ba, 2005; Indraccolo *et al.*, 2005). Sendo assim, as ratas, durante toda sua gestação, foram submetidas a deficiência de tiamina e sua prole foi estudada. Os animais nasciam com baixo peso corporal e encefálico e tinham seu crescimento retardado [ver Figura 18], mostrando que a deficiência pode afetar o desenvolvimento do indivíduo (Ba *et al.*, 1999; Ba, 2005). Os neurônios obtidos por dissociação enzimática, foram mantidos em meio contendo tiamina durante sete dias. A cultura apresentou diminuição acentuada do número, tanto de neurônios quanto da glia, mesmo com a suplementação feita com tiamina diretamente no meio de cultura [Figura 19 e

20]. Estes resultados sugerem que estávamos frente a um mecanismo irreversível (Pannunzio *et al.*, 2000).

Os sinais mediados por canais para  $K^+$  são de fundamental importância para a regulação da apoptose neuronal, migração e desenvolvimento (Hu *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2004; Papworth *et al.*, 1997). Os canais para potássio do tipo A e retificadores retardados desempenham um papel crucial na excitabilidade neuronal, na regulação do potencial de repouso, no controle da duração do potencial de ação, na hiperpolarização pós-potencial (AHP), na determinação da frequência dos potenciais de ação (Hille, 2001; Shibata *et al.*, 2000) e na aquisição de memória motora (Maffei *et al.*, 2002). Pode-se especular que a diminuição da expressão destes canais poderia prolongar a duração dos potenciais de ação e/ou aumentarem a frequência de disparos (D'Angelo *et al.*, 2001); já sua super-expressão tem sido relacionada, principalmente, à apoptose (Yu, 2003). Os canais para potássio podem fazer parte do fenômeno de apoptose neuronal, por aumentar o efluxo de potássio (Hu *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2004; Mei *et al.*, 2004). Porém, somente a diminuição do potássio intracelular não é o fator determinante para a ativação do mecanismo de apoptose, em muitos casos é necessário o recrutamento das vias intracelulares de ativação para levar ao fenômeno apoptótico (Yu, 2003).

Os canais para  $K^+$  sensíveis a voltagem podem ter fundamental importância no mecanismo de sobrevivência neuronal (Hu *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2004; Yu, 2003). Usualmente, uma diminuição da condutância ao potássio está associada a um efeito anti-apoptótico (Hu *et al.*, 2005; Yu, 2003), contudo, Chin

et al. (1997) mostraram que o bloqueio induzido por 4-aminopiridina, em células de linhagem de astrocitoma maligno, sofrem morte neuronal pela diminuição da corrente de potássio sensível a 4-aminopiridina. Outros estudos também relatam apoptose celular pela diminuição das correntes de potássio (Choi *et al.*, 1999; Manikkam *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2000). A importância das correntes de  $K^+$  do tipo-A durante o fenômeno de apoptose neuronal ainda não foi bem documentada (Yu *et al.*, 2001). A existência de uma possível ligação entre a inibição de canais para  $K^+$ , pela deficiência de tiamina, e apoptose em neurônios granulares do cerebelo pode ser hipotetizada.

Com base nestas evidências, e sabendo que os canais para potássio podem estar envolvidos no fenômeno da morte celular, investigamos o envolvimento desta classe de proteínas no mecanismo da morte dos neurônios granulares do cerebelo submetidos à deficiência em tiamina durante a gestação. O registro eletrofisiológico para as correntes de potássio mostrou uma diminuição significativa tanto do componente transiente quanto do componente sustentado da corrente (ver Figura 23 e 24; Tabela III e IV). Este resultado se mostrou particularmente interessante, pois os mecanismos descritos que envolvem morte celular e canais para potássio, geralmente, estão relacionados com o aumento destas correntes (Fagni *et al.*, 1991; Angulo *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 1998; Lauritzen *et al.*, 2003). Como havíamos demonstrado que a camada granular estava reduzida no grupo privado de tiamina fizemos uma avaliação da capacitância dos neurônios granulares. A capacitância é uma medida biofísica que nos permite estimar o

tamanho da célula. A capacitância das células que foram submetidas a deficiência em tiamina foi maior que as células do grupo controle [Figura 25]. A degeneração cerebelar na deficiência de tiamina ocorre juntamente com a diminuição do volume do cerebelo (Yu and Choi, 2000; Mulholland, 2006), contudo, o aumento da capacitância sugeria um aumento no tamanho dos neurônios granulares o que, deveria produzir um aumento no volume do cerebelo! Nos estudos de morfometria ficou claro que a camada granular estava reduzida [ver Figura17] o que poderia parecer um paradoxo mas existem dados na literatura que correlacionam aumento do tamanho celular e morte por necrose (Desjardins and Ledoux, 1998). Se olharmos o cenário construído até agora não podemos ainda decidir qual mecanismo esta sendo preponderante. Contudo o trabalho de Bonfoco et al. (1995) mostra que dependendo da intensidade de um mesmo insulto a célula pode evoluir para um processo necrótico ou apoptótico, sendo tais processos dependentes da mesma via. Em células granulares do cerebelo Ankarcona et al. (1995) mostrou que populações de neurônios que entraram no processo necróticos devido a um insulto podem tardiamente evoluírem ao fenômeno apoptótico, sendo esta evolução dependente da função mitocôndrial.

No intuito de responder duas questões: 1) a de saber se a situação *in vivo* reproduzir-se-ia *in vitro* e, 2) de esclarecer se a alteração das correntes decorria não da deficiência de tiamina, mas do aumento da capacitância, que era ocasionado pela deficiência. Experimentos de deficiência *in vitro* foram realizados.

Como esperado, a mesma diminuição da corrente total de potássio foi observada nos neurônios obtidos de ratos normais e submetidos à deficiência de tiamina na cultura (*in vitro*). No entanto, a corrente do tipo sustentada não sofreu diminuição, sugerindo que a corrente transiente de efluxo sofra alterações anteriores àquelas sofridas pela sustentada. Outro fator relevante foi que a capacitância destas células não mudou [Figura 31], sugerindo que as alterações observadas, na corrente transiente de efluxo destes neurônios, eram decorrentes da deficiência em tiamina e não pelo simples aumento da capacitância, que estava alterada nas células submetidas à deficiência durante a gestação. A corrente de potássio transiente foi identificada como sendo uma corrente de potássio do tipo “A” pelo uso de um protocolo de estimulação específico [Materiais e Métodos – Figura 11 e Resultados – Figura 32]. Com estes resultados poderíamos levantar a hipótese de que os neurônios mantidos em meio de cultura sem tiamina poderiam estar em um estado de maior excitabilidade. Para testar esta hipótese foram feitos experimentos de “current-clamp” onde registramos os potenciais de ação gerados por estes neurônios. Os registros de potenciais de ação a partir dos neurônios mantidos na ausência de tiamina apresentaram despolarizações de pequena amplitude [Figura 40], demonstrando e reforçando a hipótese de uma possível hiperexcitabilidade neuronal. As correntes de potássio do tipo-A participam do controle da frequência de disparos neuronal, assim, neurônios que exibem alterações desta corrente, provavelmente exibirão modificações da frequência de disparo dos potenciais de ação (D'Angelo *et al.*, 2001; Hille, 2001). Os potenciais de ação

registrados mostram concordância com aqueles descritos na literatura para este tipo neuronal (D'Angelo *et al.*, 2001). Uma implicação que pode ser discutida, tendo em vista a presença de variações no potencial de membrana durante o pulso de corrente, seria que o aumento na excitabilidade poderia acarretar uma maior entrada de cálcio que poderia facilitar a liberação de glutamato gerando um estado de excitotoxicidade que explicaria a degeneração neuronal observada nos experimentos anteriores e as despolarizações de baixa amplitude.

Com o objetivo de explorar as propriedades biofísicas do componente modificado pela ausência da tiamina para que pudéssemos ter uma melhor compreensão do fenômeno que estávamos caracterizando decidimos usar bioinformática para reconstruir matematicamente as correntes do tipo A e os potenciais de ação. A reconstrução matemática das correntes do tipo-A mostrou boa congruência com as correntes medidas nas nossas condições experimentais [Figura 43]. Quando os parâmetros cinéticos e biofísicos calculados a partir dos nossos experimentos (presença e ausência de tiamina) foram inseridos no modelo proposto por D'Angelo e colaboradores (2001) para descrever o comportamento elétrico dos neurônios granulares do cerebelo. Os potenciais de ação gerados pelo modelo apresentaram como característica importante uma maior frequência de disparos para os neurônios mantidos na ausência de tiamina no meio de cultura, corroborando, pelo menos em parte, os dados obtidos no nosso estudo. Entretanto, o modelo falhou em mostrar de maneira clara as despolarizações de baixa amplitude registradas nos nossos

experimentos [Figura 44]. De qualquer forma os dados experimentais e de modelamento mostram que neurônio granular está provavelmente em um estado de maior excitabilidade durante a deficiência de tiamina e que esta característica ocorre por uma diminuição na densidade de corrente de potássio do tipo-A.

## **CONCLUSÃO**

Baseando-se nos nossos resultados podemos concluir que:

1. A deficiência de tiamina (vitamina B1), produzida na dieta, causou alterações reduzindo a camada granular do cerebelo;
2. Os animais submetidos a uma dieta livre de tiamina apresentaram alterações no comportamento motor com aumento da passada e base se sustentação, porem melhoraram o aprendizado motor.
3. A deficiência de tiamina diminuiu a magnitude das correntes de potássio do tipo-A nos neurônios granulares do cerebelo;
4. A excitabilidade neuronal foi significativamente aumentada pela ausência de tiamina;
5. O mecanismo molecular envolvido na degeneração celular descrita neste trabalho está diretamente relacionado à diminuição da densidade de corrente de potássio do tipo-A.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nat.Med.** (10): S18-S25. 2004.

ANGULO, E., NOE, V., CASADO, V., MALLOL, J., GOMEZ-ISLA, T., LLUIS, C., FERRER, I., CIUDAD, C. J., & FRANCO, R. Up-regulation of the Kv3.4 potassium channel subunit in early stages of Alzheimer's disease. **J.Neurochem.** (91): 547-557. 2004.

ANKARCRONA, Maria, DYPBUKT, Jeannette M., BONFOCO, Emanuela, ZHIVOTOVSKY, Boris, ORRENIUS, Sten, LIPTON, Stuart A., & NICOTERA, Pierluigi. Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron.** (15): 961-973. 1995.

ANTKIEWICZ-MICHALUK, L., LAZAREWICZ, J. W., PATSENKA, A., KAJTA, M., ZIEMINSKA, E., SALINSKA, E., WASIK, A., GOLEMBIOWSKA, K., & VETULANI, J. The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: the importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. **J.Neurochem.** (97): 846-856. 2006.

APPS, R. & GARWICZ, M. Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. **Nat.Rev.Neurosci.** (6): 297-311. 2005.

BA, A. Functional vulnerability of developing central nervous system to maternal thiamine deficiencies in the rat. **Dev.Psychobiol.** (47): 408-414. 2005.

BA, A., SERI, B. V., AKA, K. J., GLIN, L., & TAKO, A. Comparative effects of developmental thiamine deficiencies and ethanol exposure on the morphometry of the CA3 pyramidal cells. **Neurotoxicol.Teratol.** (21): 579-586. 1999.

BARDONI, R. & BELLUZZI, O. Kinetic analysis of a transient potassium current in rat cerebellar granule cells in vitro. **Boll.Soc.Ital.Biol.Sper.** (67): 1015-1021. 1991.

BARDONI, R. & BELLUZZI, O. Kinetic study and numerical reconstruction of A-type current in granule cells of rat cerebellar slices. **J.Neurophysiol.** (69): 2222-2231. 1993.

BEAR, M. F., CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A. **Neuroscience: exploring the brain** Williams & Wilkins. 1996.

BONFOCO, E., KRAINIC, D., ANKARCRONA, M., NICOTERA, P., & LIPTON, S. A. Apoptosis and Necrosis: Two Distinct Events Induced, Respectively, by Mild and Intense Insults with N-Methyl-D-Aspartate or Nitric Oxide/Superoxide in Cortical Cell Cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. (92): 7162-7166. 1995.

BOSSY-WETZEL, E., TALANTOVA, M. V., LEE, W. D., SCHOLZKE, M. N., HARROP, A., MATHEWS, E., GOTZ, T., HAN, J., ELLISMAN, M. H., PERKINS, G. A., & LIPTON, S. A. Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K<sup>+</sup> channels. **Neuron**. (41): 351-365. 2004.

BOYDEN, E. S., KATOH, A., & RAYMOND, J. L. Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. **Annu.Rev.Neurosci**. (27): 581-609. 2004.

BOYDEN, E. S. & RAYMOND, J. L. Active reversal of motor memories reveals rules governing memory encoding. **Neuron**. (39): 1031-1042. 2003.

BURES, J., BURESOVÁ, O. & HUSTON, J. P. **Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior**, 2 ed. Elsevier Science. 1983.

BUTTERWORTH, R. F. Neurotransmitter function in thiamine-deficiency encephalopathy. **Neurochemistry International**. (4): 449-464. 1982.

BUTTERWORTH, R. F. Pathophysiology of cerebellar dysfunction in the Wernicke-Korsakoff syndrome. **Can.J.Neurol.Sci**. (20 Suppl 3): S123-S126. 1993.

CELIS, J. E. **Cell biology**, 2 ed. Academic Press. 1998.

CHIN, L. S., PARK, C. C., ZITNAY, K. M., SINHA, M., DIPATRI, A. J., Jr., PERILLAN, P., & SIMARD, J. M. 4-Aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K<sup>+</sup> channel in malignant astrocytoma cell lines. **J Neurosci Res**. (48): 122-127. 1997.

CHOI, B. Y., KIM, H. Y., LEE, K. H., CHO, Y. H., & KONG, G. Clofilium, a potassium channel blocker, induces apoptosis of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells via Bcl-2-insensitive activation of caspase-3. **Cancer Lett.** (147): 85-93. 1999.

COLLIN, L., USIELLO, A., ERBS, E., MATHIS, C., & BORRELLI, E. Motor training compensates for cerebellar dysfunctions caused by oligodendrocyte ablation. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** (101): 325-330. 2004.

COLLINS, R. C., KIRKPATRICK, J. B., & MCDUGAL, D. B., Jr. Some regional pathologic and metabolic consequences in mouse brain of pyriethamine-induced thiamine deficiency. **J.Neuropathol.Exp.Neurol.** (29): 57-69. 1970.

COOK, G. C. **Manson's Tropical Diseases**, 12 ed. WB Saunders Company Ltd. 1996.

D'ANGELO, E., NIEUS, T., MAFFEI, A., ARMANO, S., ROSSI, P., TAGLIETTI, V., FONTANA, A., & NALDI, G. Theta-frequency bursting and resonance in cerebellar granule cells: experimental evidence and modeling of a slow k+-dependent mechanism. **J.Neurosci.** (21): 759-770. 2001.

DESJARDINS, P. & LEDOUX, S. The role of apoptosis in neurodegenerative diseases. **Metab Brain Dis.** (13): 79-96. 1998.

DEUTCH, A. Y. & WINDER, D. G. A channel to neurodegeneration. **Nat.Med.** (12): 17-18. 2006.

ELLIOT, K. A. C., PAGE, I. H. & QUASTEL, J. H. **Neurochemistry - the chemical dynamics of brain and nerve** Bannerstone House. 1995.

FAGNI, L., BOSSU, J. L., & BOCKAERT, J. Activation of A Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Dependent K<sup>+</sup> Channel by Stimulation of Glutamate Phosphoinositide-Coupled Receptors in Cultured Cerebellar Granule Cells. **European Journal of Neuroscience.** (3): 778-789. 1991.

FINGER, S. **Origins of neuroscience - a history of explorations into brain function** Oxford University Press, INC., New York. 1994.

GIANNITRAPANI, D. Developing concepts of lateralization for cerebral functions. **Cortex**. (3): 355-370. 1967.

GOLDOWITZ, D. & HAMRE, K. The cells and molecules that make a cerebellum. **Trends Neurosci**. (21): 375-382. 1998.

GRILLNER, S. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. **Nat.Rev.Neurosci**. (4): 573-586. 2003.

HAHN, J. S., BERQUIST, W., ALCORN, D. M., CHAMBERLAIN, L., & BASS, D. Wernicke encephalopathy and beriberi during total parenteral nutrition attributable to multivitamin infusion shortage. **Pediatrics**. (101): E10. 1998.

HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., & SIGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Arch**. (391): 85-100. 1981.

HARTER, D. H., DOHERTY, P. F., & CHIN, L. S. Current concepts of apoptosis. **Neurosurg.Focus**. (3): e6. 1997.

HAZELL, A. S., TODD, K. G., & BUTTERWORTH, R. F. Mechanisms of neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy. **Metab Brain Dis**. (13): 97-122. 1998.

HEO, H. J. & LEE, C. Y. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. **J.Agric.Food Chem**. (52): 7514-7517. 2004.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes**, 3 ed. Sinauer Associates, INC. 2001.

HINES, M. L. & CARNEVALE, N. T. The NEURON simulation environment. **Neural Comput**. (9): 1179-1209. 1997.

HINES, M. L. & CARNEVALE, N. T. NEURON: a tool for neuroscientists. **Neuroscientist**. (7): 123-135. 2001.

HOUZEN, H. & KANNO, M. Thiamine and its derivatives inhibit delayed rectifier potassium channels of rat cultured cortical neurons. **Neuropharmacology**. (37): 313-322. 1998.

HU, C. L., LIU, Z., GAO, Z. Y., ZHANG, Z. H., & MEI, Y. A. 2-iodomelatonin prevents apoptosis of cerebellar granule neurons via inhibition of A-type transient outward K<sup>+</sup> currents. **J.Pineal Res.** (38): 53-61. 2005.

INDRACCOLO, U., GENTILE, G., POMILI, G., LUZI, G., & VILLANI, C. Thiamine deficiency and beriberi features in a patient with hyperemesis gravidarum. **Nutrition**. (21): 967-968. 2005.

ITO, M. Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in motor learning. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** (978): 273-288. 2002.

ITO, M. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. **Prog.Neurobiol.** (78): 272-303. 2006.

JIAO, S., WU, M. M., HU, C. L., ZHANG, Z. H., & MEI, Y. A. Melatonin receptor agonist 2-iodomelatonin prevents apoptosis of cerebellar granule neurons via K(+) current inhibition. **J.Pineal Res.** (36): 109-116. 2004.

JIAO, Y., YAN, J., ZHAO, Y., DONAHUE, L. R., BEAMER, W. G., LI, X., ROE, B. A., LEDOUX, M. S., & GU, W. Carbonic anhydrase-related protein VIII deficiency is associated with a distinctive lifelong gait disorder in waddles mice. **Genetics**. (171): 1239-1246. 2005.

JOHNSTON, A. R., FRASER, J. R., JEFFREY, M., & MACLEOD, N. Alterations in potassium currents may trigger neurodegeneration in murine scrapie. **Exp.Neurol.** (151): 326-333. 1998.

KIM, J. A., KANG, Y. S., JUNG, M. W., KANG, G. H., LEE, S. H., & LEE, Y. S. Ca<sup>2+</sup> influx mediates apoptosis induced by 4-aminopyridine, a K<sup>+</sup> channel blocker, in HepG2 human hepatoblastoma cells. **Pharmacology**. (60): 74-81. 2000.

KRANTIC, S., MECHAWAR, N., REIX, S., & QUIRION, R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. **Trends Neurosci.** (28): 670-676. 2005.

LAURITZEN, I., ZANZOURI, M., HONORE, E., DUPRAT, F., EHRENGRUBER, M. U., LAZDUNSKI, M., & PATEL, A. J. K<sup>+</sup>-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K<sup>+</sup> channels. **J.Biol.Chem.** (278): 32068-32076. 2003.

LEAO, R. M., CRUZ, J. S., DINIZ, C. R., CORDEIRO, M. N., & BEIRAO, P. S. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. **Neuropharmacology.** (39): 1756-1767. 2000.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios - conceitos fundamentais de neurociência** Atheneu, São Paulo. 2001.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional** Atheneu. 1988.

MAFFEI, A., PRESTORI, F., ROSSI, P., TAGLIETTI, V., & D'ANGELO, E. Presynaptic current changes at the mossy fiber-granule cell synapse of cerebellum during LTP. **J.Neurophysiol.** (88): 627-638. 2002.

MANIKKAM, M., LI, Y., MITCHELL, B. M., MASON, D. E., & FREEMAN, L. C. Potassium channel antagonists influence porcine granulososa cell proliferation, differentiation, and apoptosis. **Biol.Reprod.** (67): 88-98. 2002.

MARTIN, P. R., SINGLETON, C. K., & HILLER-STURMHOFEL, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Res.Health.** (27): 134-142. 2003.

MATHIE, A., CLARKE, C. E., RANATUNGA, K. M., & VEALE, E. L. What are the roles of the many different types of potassium channel expressed in cerebellar granule cells? **Cerebellum.** (2): 11-25. 2003.

MATSUKAWA, H., WOLF, A. M., MATSUSHITA, S., JOHO, R. H., & KNOPFEL, T. Motor dysfunction and altered synaptic transmission at the parallel fiber-Purkinje cell synapse in mice lacking potassium channels Kv3.1 and Kv3.3. **J.Neurosci.** (23): 7677-7684. 2003.

MEI, Y. A., VAUDRY, D., BASILLE, M., CASTEL, H., FOURNIER, A., VAUDRY, H., & GONZALEZ, B. J. PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I<sub>k</sub> in the anti-apoptotic action of PACAP. **Eur.J.Neurosci.** (19): 1446-1458. 2004.

MULHOLLAND, P. J. Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. **Cerebellum**. (5): 55-63. 2006.

NAIR, D. G., PURCOTT, K. L., FUCHS, A., STEINBERG, F., & KELSO, J. A. Cortical and cerebellar activity of the human brain during imagined and executed unimanual and bimanual action sequences: a functional MRI study. **Brain Res.Cogn Brain Res**. (15): 250-260. 2003.

NIEUS, T., SOLA, E., MAPELLI, J., SAFTENKU, E., ROSSI, P., & D'ANGELO, E. LTP regulates burst initiation and frequency at mossy fiber-granule cell synapses of rat cerebellum: experimental observations and theoretical predictions. **J.Neurophysiol**. (95): 686-699. 2006.

OHYAMA, T., NORES, W. L., MURPHY, M., & MAUK, M. D. What the cerebellum computes. **Trends Neurosci**. (26): 222-227. 2003.

PANNUNZIO, P., HAZELL, A. S., PANNUNZIO, M., RAO, K. V., & BUTTERWORTH, R. F. Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an in vitro model for the study of cell death mechanisms in Wernicke's encephalopathy. **J.Neurosci.Res**. (62): 286-292. 2000.

PAPWORTH, J., COLVILLE-NASH, P., ALAM, C., SEED, M., & WILLOUGHBY, D. The depletion of substance P by diclofenac in the mouse. **Eur.J.Pharmacol**. (325): R1-R2. 1997.

PARK, L. C., CALINGASAN, N. Y., UCHIDA, K., ZHANG, H., & GIBSON, G. E. Metabolic impairment elicits brain cell type-selective changes in oxidative stress and cell death in culture. **J.Neurochem**. (74): 114-124. 2000.

PHILLIPS, S. A. & THORNALLEY, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. **Eur.J.Biochem**. (212): 101-105. 1993.

RANDALL, A. & TSIEN, R. W. Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. **J.Neurosci**. (15): 2995-3012. 1995.

SAN SEBASTIAN, M. & JATIVA, R. Beriberi in a well-nourished Amazonian population. **Acta Trop**. (70): 193-196. 1998.

SCHOFFENIELS, E. Molecular aspects of bioelectrogenesis. **Arch.Int.Physiol Biochim.** (97): 389-402. 1989.

SCHWEIGHOFER, N. A model of activity-dependent formation of cerebellar microzones. **Biol.Cybern.** (79): 97-107. 1998.

SHAKKOTTAI, V. G., CHOU, C. H., ODDO, S., SAILER, C. A., KNAUS, H. G., GUTMAN, G. A., BARISH, M. E., LAFERLA, F. M., & CHANDY, K. G. Enhanced neuronal excitability in the absence of neurodegeneration induces cerebellar ataxia. **J.Clin.Invest.** (113): 582-590. 2004.

SHANGARI, N., DEPEINT, F., FURRER, R., BRUCE, W. R., & O'BRIEN, P. J. The effects of partial thiamin deficiency and oxidative stress (i.e., glyoxal and methylglyoxal) on the levels of alpha-oxoaldehyde plasma protein adducts in Fischer 344 rats. **FEBS Lett.** (579): 5596-5602. 2005.

SHELINE, C. T. & WEI, L. Free radical-mediated neurotoxicity may be caused by inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. **Neuroscience.** (140): 235-246. 2006.

SHIBATA, R., NAKAHIRA, K., SHIBASAKI, K., WAKAZONO, Y., IMOTO, K., & IKENAKA, K. A-type K<sup>+</sup> current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. **J.Neurosci.** (20): 4145-4155. 2000.

SHUMWAY-COOK, A. & WOOLLACOTT, M. **Motor control - Theory and practical applications** Willams & Wilkins. 1995.

SINGLETON, C. K. & MARTIN, P. R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Curr.Mol.Med.** (1): 197-207. 2001.

SPARACIA, G., BANCO, A., & LAGALLA, R. Reversible MRI abnormalities in an unusual paediatric presentation of Wernicke's encephalopathy. **Pediatr.Radiol.** (29): 581-584. 1999.

STRYER, L., TYMOCZKO, J. L. & BERG, J. M. **Biochemistry**, 5 ed. W.H. Freeman & Co Ltd, New York. 2004.



TALLAKSEN, C. M. & TAUBOLL, E. Excitatory effect of thiamin on CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices in vitro. **Eur.J.Neurol.** (7): 693-698. 2000.

TOHSE, N., HOUZEN, H., & KANNO, M. Inhibition of the delayed rectifier K current in guinea-pig cardiomyocytes by thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide. **Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.** (357): 540-547. 1998.

VASCONCELOS, M. M., SILVA, K. P., VIDAL, G., SILVA, A. F., DOMINGUES, R. C., & BERDITCHEVSKY, C. R. Early diagnosis of pediatric Wernicke's encephalopathy. **Pediatr.Neurol.** (20): 289-294. 1999.

WALTER, J. B. & TALBOLT, I. C. **General Pathology**, 7 ed. Churchill Livingstone. 1996.

WARNOCK, L. G. A new approach to erythrocyte transketolase measurement. **J.Nutr.** (100): 1957-1962. 1970.

WARNOCK, L. G. Transketolase activity of blood hemolysate, a useful index for diagnosing thiamine deficiency. **Clin.Chem.** (21): 432-436. 1975.

WEI, L., XIAO, A. Y., JIN, C., YANG, A., LU, Z. Y., & YU, S. P. Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons. **Pflugers Arch.** (448): 325-334. 2004.

YU, S. P. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. **Prog.Neurobiol.** (70): 363-386. 2003.

YU, S. P., CANZONIERO, L. M., & CHOI, D. W. Ion homeostasis and apoptosis. **Curr.Opin.Cell Biol.** (13): 405-411. 2001.

YU, S. P. & CHOI, D. W. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A.** (97): 9360-9362. 2000.