

UNIVERSIDAD EFEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Mariana Elena Jacobsen

**Culturas organotípicas de hipocampo como modelo para o
estudo dos efeitos neurobiológicos da deficiência de
tiamina: parâmetros morfológicos e níveis de BDNF**

Belo Horizonte

2020

Mariana Elena Jacobsen

Culturas organotípicas de hipocampo como modelo para o estudo dos efeitos neurobiológicos da deficiência de tiamina: parâmetros morfológicos e níveis de BDNF

Versão final

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia

Orientadora: Profa. Angela Maria Ribeiro

Belo Horizonte
2020




Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANA ELENA JACOBSEN. Aos vinte e sete dias do mês de agosto de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Culturas organotípicas de hipocampo como modelo para o estudo do processo de neurodegeneração pela deficiência de tiamina e seus efeitos sobre os níveis de BDNF", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ângela Maria Ribeiro, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Milene Alvarenga Rachid (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Jader dos Santos Cruz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Hudson de Souza Buck (Faculdade de Ciências Médicas - Santa Casa de São Paulo), aprovada; Dra. Cecília Hedin Pereira (Fiocruz-RJ), aprovada; Dra. Ângela Maria Ribeiro - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de agosto de 2020.


 Dra. Milene Alvarenga Rachid (UFMG)


 Dr. Jader dos Santos Cruz (UFMG)


 Dr. Hudson de Souza Buck (Faculdade de Ciências Médicas - Santa Casa de São Paulo)


 Dra. Cecília Hedin Pereira (Fiocruz-RJ)


 Dra. Ângela Maria Ribeiro - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes quatro anos de doutorado, muitas pessoas passaram pela minha vida e contribuíram, direta ou indiretamente, neste caminho que hoje finaliza. Minha gratidão a todas elas.

À minha família. Danilo, que durante todo este tempo me apoiou e incentivou a continuar neste caminho, apesar das dificuldades. Aos meus pais, Cristina e Alejandro, ao meu irmão, Axel, a Sammy e as minhas duas sobrinhas lindas, luzes da minha vida.

À minha orientadora, Profa. Angela Maria Ribeiro que, durante esta trajetória, foi muito mais do que uma orientadora. Uma pessoa excepcional em todo sentido, que me fez crescer tanto profissionalmente como pessoalmente. Com ela aprendi muito.

A todas as pessoas que tive a sorte de conhecer no LANEC e que me acompanharam nesta jornada: Briana, Carolina, Isabela, Joana, Lucas, Rogerio. E um especial agradecimento para Cida, a força invisível que conduz todos os nossos experimentos, sempre cheia de boa vontade e empolgação.

Agradeço muito a FIOCRUZ, por ter me deixado usar as instalações para a primeira parte do meu doutorado, e ao Prof. Ricardo Gazzinelli e todo o pessoal do seu laboratório, por ter me recebido e me ajudado no começo de tudo.

Obrigada ao Prof. Jader dos Santos Cruz e a todos os alunos do LAMEX, por me permitir usar seu laboratório e me fazer sentir como uma mais, e ao Narciso, por me ajudar inúmeras vezes com toda a paciência do mundo.

Agradeço à Profa. Fabíola Mara Ribeiro por me permitir usar as instalações e a todos os alunos do seu laboratório por me fazer sentir bem recebida e ter me ajudado incontáveis vezes.

Ao prof. Gustavo Menezes, pela sua ajuda com as minhas imagens e pelas horas que passei no microscópio do seu laboratório, a Maísa pela paciência e por toda a ajuda que me deu e a todo o pessoal do seu laboratório pela amabilidade e compreensão.

Agradeço também a todos os professores que me acolheram e me ensinaram muito na minha jornada como professora: Prof. Ronaldo Nagem, Profa. Andreia Fonzino Ribeiro, Profa. Liza Figueredo, Profa. Angélica Tomaz Vieira, Profa. Jaqueline Alvarez-Leite

Meu especial agradecimento ao Anderson Santos, que sempre se dispôs a me repassar seu vasto conhecimento, me aconselhar com a maior paciência e me ajudar sempre que precisei.

Ao Jamil, pelo bom humor, pela boa disposição e amabilidade permanente.

A Orlando e Alexandre, pelo suporte e pela grande atenção dispensada a todos os alunos da Pós-Graduação.

Às minhas amigas que, embora à distância, estão sempre presentes e me encorajando a seguir em frente: Daniela, Diana, Inés, Ximena.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia por me dar a oportunidade de desenvolver o meu doutorado.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro

RESUMO

A deficiência de tiamina (DT) pode levar à perda de neurônios em regiões específicas do cérebro, gerando um amplo espectro de doenças. Uma das áreas afetadas pela deficiência desta vitamina é o hipocampo, região do cérebro envolvida em processos cognitivos como aprendizado e memória. Os resultados de estudos utilizando modelos animais para avaliar os efeitos da DT nesta região são contraditórios, indicando consequências diversas, como: apenas disfunções bioquímicas, neurodegeneração ou déficit no processo de neuroregeneração. A cultura organotípica de hipocampo (COH) apresenta-se como um modelo adequado para contribuir na solução dessas aparentes contradições. A cultura *ex vivo* do tecido, mantendo a citoarquitetura e a relação entre os diferentes tipos celulares, é uma das vantagens deste modelo, que possibilita certos tipos de manipulações que seriam inviáveis no modelo experimental animal. No presente trabalho foram realizadas (i) a padronização do processo de obtenção de COH, (ii) o estabelecimento das COH como modelo para o estudo da DT e, (iii) o estudo dos efeitos da DT sobre os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, pelas siglas em inglês) por neurônios e oligodendrócitos. A contribuição de neurônios e oligodendrócitos nos efeitos da DT sobre a produção de BDNF é outra questão que ainda continua obscura. Esse fator neurotrófico tem, dentre outros, um papel na manutenção dos neurônios existentes, no crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses. No estabelecimento das COH para o estudo da DT, foi determinada a exposição das culturas ao meio neurobasal sem tiamina (NST) por 4, 7 e 10 dias. Observou-se uma diminuição significativa das áreas hipocampais como o giro denteado (GD, $p=0,006$) e da região CA1-CA3 ($p=0,004$) nas culturas expostas ao meio NST. Porém observou-se um aumento do tamanho total do tecido ($p=0,030$), provavelmente devido à proliferação glial no intuito de proteger a população neuronal. Foi observada uma diminuição significativa no número de neurônios, após exposição ao meio NST no sétimo dia, no GD ($p=0,0007$), na região CA1-CA3 ($p=0,0002$) e no tecido total ($p=0,0002$). No décimo dia de exposição parece ocorrer um processo de reações neurobiológicas compensatórias, possivelmente gerando a estimulação da neurogênese como um efeito compensatório contrário ao insulto. O número de oligodendrócitos não mudou após a exposição à DT, mas houve uma perda de correlação entre a área e a densidade oligodendrocitária na região CA1-CA3, indicando uma maior susceptibilidade desta região aos efeitos da DT. Os dados obtidos mostram pela primeira vez a ocorrência de um aumento na produção neuronal de BDNF no décimo dia no grupo deficiente, no GD ($p=0,001$), na região CA1-CA3 ($p=0,006$) e no tecido total ($p=0,030$). Após a recuperação da deficiência, observamos que existe uma correlação positiva entre o número de neurônios que produzem BDNF e a densidade neuronal no grupo deficiente ($r=0,77$; $p=0,010$), indicando que a produção de BDNF parece estar orientada à re-população após o insulto. Assim, este trabalho representa o primeiro estudo a estabelecer a COH como modelo para o estudo dos efeitos da DT, permitindo observar que existe uma perda significativa de neurônios no hipocampo e um aumento da produção de BDNF como um possível efeito compensatório de alterações bioquímicas neurodegenerativas induzidas pela DT.

Palavras-chave: Deficiência de Tiamina. Culturas Organotípicas de Hipocampo. BDNF.

ABSTRACT

Thiamine deficiency (TD) can lead to the loss of neurons in specific regions of the brain, generating a broad spectrum of diseases. One of the areas affected by this vitamin deficiency is the hippocampus, a region of the brain involved in cognitive processes such as learning and memory. Results of studies using animal models to evaluate the effects of TD on the hippocampus are contradictory, indicating several consequences, such as: only biochemical dysfunctions or neurodegeneration or deficit in the process of neuroregeneration. The organotypic hippocampal culture of hippocampus (OHC) is an adequate model to contribute to the solution of these apparent contradictions. Ex vivo tissue culture, maintaining the cytoarchitecture and the relationship between the different cell types, is one of the advantages of this model that allows certain types of manipulations that would be unfeasible in the experimental animal model. In the present study, we carried out (i) the standardization of the process of obtaining OHC, (ii) the establishment of OHC as a model for the study of TD, and (iii) the study of the effects of TD on levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) by neurons and oligodendrocytes. The contribution of neurons and/or oligodendrocytes to the effects of TD on the production of BDNF is another issue that is still unclear. This neurotrophic factor has, among others, a role in the maintenance of existing neurons, in the growth and differentiation of new neurons and synapses. In the establishment of OHC for the study of TD, the exposure of the cultures to the Neurobasal medium without thiamine (TDNM) for 4, 7 and 10 days was determined. A significant decrease was observed in hippocampal areas such as dentate gyrus (DG, $p=0.006$) and CA1-CA3 region ($p=0.004$) in cultures exposed to TDN medium. However, an increase in total slice size ($p=0.030$) was observed, probably due to glial proliferation in order to protect the neuronal population. A significant decrease in the number of neurons was observed after exposure to TDN medium on the seventh day, in the DG ($p=0.0007$), in the CA1-CA3 region ($p=0.0002$) and in the total tissue ($p=0.0002$). On the tenth day of exposure a process of compensatory neurobiological reactions seems to occur, possibly generating stimulation of the neurogenesis as a compensatory effect contrary to the insult. The number of oligodendrocytes did not change after exposure to TD, but there was a loss of correlation between the area and the oligodendrocyte density in the CA1-CA3 region, indicating a greater susceptibility of this region to the effects of TD compared to DG. The data obtained show for the first time an increase in the neuronal production of BDNF on the tenth day in the deficient group, in the DG ($p=0.001$), in the CA1-CA3 region ($p=0.006$) and in the total tissue ($p=0.030$). After recovery from the deficiency, we observed a positive correlation between the number of neurons producing BDNF and the neuronal density in the deficient group ($r=0.77$; $p=0.010$), indicating that the production of BDNF seems to be oriented to re-population after the insult. Thus, this work represents the first study to establish OHC as a model for the study of the effects of TD, showing a significant loss of neurons in the hippocampus and an increase in production of BDNF as a possible compensatory effect of neurodegenerative biochemical changes induced by TD.

Key words: Thiamine Deficiency. Organotypic hippocampal cultures. BDNF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1. Esquema do metabolismo da tiamina (Vitamina B1) no cérebro.

Fig. 2. Desenho mostrando a localização do hipocampo no cérebro de um roedor e a estrutura do hipocampo.

Fig. 3. Desenhos esquemáticos de três técnicas para a obtenção de culturas organotípicas.

Fig. 4. (a) Foto do cérebro obtido de um rato neonato, indicando o limite da região referente à estrutura hipocámpal e (b) Foto do “*tissue chopper*” utilizado para obtenção das fatias para a preparação da cultura organotípica.

Fig. 5. (a) Imagem de um inserto Millicell para cultura organotípica (b) Foto de uma placa de seis poços, mostrando as membranas distribuídas com 6 fatias.

Fig. 6. Esquemas dos desenhos experimentais de três experimentos (E1, E2 e E3) para a determinação do melhor tempo de suplementação com soro durante o período de estabilização das COH.

Fig. 7. Estrutura química da substância 5-bromo-2'-deoxiuridina

Fig. 8. Esquema ilustrando o desenho experimental da incorporação com BrdU

Fig. 9. (a) Delineamento experimental utilizado para os experimentos em condições de DT. (b) Imagem representativa de uma fatia do hipocampo mantida em cultura por 21 dias mostrando os neurônios (verde) e o núcleo de todas as células (azul). As linhas pontilhadas representam o GD, CA1-CA3 e o tecido total.

Fig. 10. Estrutura da substância iodeto de propídio.

Fig. 11. Dados correspondentes à densidade de neurônios por mm² (Média ±SD), após incubação das COH por diferentes períodos de tempos em meio com soro equino (MCS) seguidos por incubação em meio sem soro (MSS).

Fig. 12. Montagem de uma imagem representativa mostrando os três canais e a sobreposição de uma dupla marcação das fatias de hipocampo com NeuN (vermelho), BrdU (verde) e DAPI (azul).

Fig. 13. Dados quantitativos da diferenciação de neurônios após incubação em MCS por 7 dias (T7), seguidos de um período de mais 7 dias (T14) em MSS.

Fig. 14. Dados da avaliação da estabilidade da cultura através do número de neurônios (Média ± SD) por mm² nas fatias do hipocampo.

Fig. 15. Dados da avaliação da estabilidade da cultura através do número de neurônios (Media ± SD) nos tempos de incubação T18, T21 e T24 em diferentes condições.

Fig. 16. Imagens das fatias obtidas após incubação com MCS+MSS, painel (a) e com MCS+N-B27, painel (b).

Fig. 17. Imagem representativa de uma fatia do hipocampo mantida em cultura por 7 dias em meio com tiamina (CT).

Fig. 18. Tamanho das áreas (Média ± SD) do GD (a) e CA1-CA3 (b), expressos em mm², após 4, 7 e 10 dias (D=dias na abcissa) de exposição em meio sem tiamina ou com tiamina.

Fig. 19. Área total do tecido (Média ± SD) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente em tiamina ou não (Controle)

Fig. 20. Dados da análise quantitativa (Média ± SD) da densidade de neurônios em duas sub-regiões hipocámpais: (a) no GD e, (b) na região CA1-CA3 (b) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente (ou não) de tiamina.

Fig. 21. Análise quantitativa da densidade de neurônios (Média ± SD) para o tecido total, após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente ou não de tiamina.

Fig. 22. Imagem representativa de uma COH incubada por 4, 7 ou 10 dias em meio com tiamina (CT) ou meio sem tiamina (ST), mostrando todas as células (DAPI) e os neurônios (NeuN⁺).

Fig. 23. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios e o tamanho da sub-região GD para as condições sem e com tiamina após 4, 7 ou 10 dias de tratamento.

Fig. 24. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios e o tamanho da sub-região CA1-CA3 para as condições sem e com tiamina após 4, 7 ou 10 dias de tratamento.

Fig. 25. Imagem representativa de uma COH incubada por 7 dias em meio com tiamina (CT), mostrando os neurônios marcados com anti-NeuN, a incorporação de IP e o núcleo de todas as células marcadas com DAPI.

Fig. 26. Análise quantitativa do número de neurônios (Média ± SD) na região GD (a) e incorporação de IP em neurônios na mesma região (b) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente ou não de tiamina.

Fig. 27. Análise quantitativa da densidade de neurônios (Média ± SD) na região CA1-CA3 (a) e incorporação de IP em neurônios na mesma região (b) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente ou não de tiamina

Fig. 28. Análise quantitativa da densidade de neurônios (Média ± SD) para o tecido total (a) e incorporação de IP em neurônios, também no tecido total, (b) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente ou não de tiamina.

Fig. 29. Análise quantitativa (Média ± SD) do número de neurônios duplamente marcados (NeuN⁺/IP⁺), expressos em 1. Porcentagem em relação ao número total de neurônios (NeuN) (painéis a, b, c) e 2. Número de neurônios duplamente marcados corrigidos pelo Fator de Ajuste da diferença na densidade de neurônios por mm² (NeuN) observada entre as duas condições CT e ST (painéis e, f, g) para 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente ou não de tiamina.

Fig. 30. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios/mm² e a porcentagem de células duplamente marcadas (NeuN⁺/IP⁺) no GD (a, c) e na região CA1-CA3 (b, d) para as condições sem tiamina e com tiamina, e para os valores do grupo ST corrigidos pelo Fator (e, f).

Fig. 31. Análise quantitativa entre tamanho das áreas (em mm²) para GD (a) e CA1-CA3 (b) e número de neurônios por mm² para GD (c) e CA1-CA3 (d). As medidas foram feitas após 10 dias de deficiência e 7 dias de recuperação ou 17 dias no meio com tiamina.

Fig. 32. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios e o tamanho das sub-regiões GD + CA1-CA3 associadas, nas condições com tiamina e sem tiamina, seguidos de mais 7 dias (até o 17° dia, 17D) em condição com tiamina.

Fig. 33. Dados (Média ± SD) do tamanho das áreas para o GD (a) e CA1-CA3 (b) e densidade de neurônios no GD (c) e CA1-CA3 (d) após 4, 7 e 10 dias em duas condições, com tiamina e sem tiamina, seguidos de mais 7 dias (até o 17° dia, 17D) em condição com tiamina.

Fig. 34. Dados (Média ± SD) do número de oligodendrócitos no GD (a), na sub-região CA1-CA3 (b) e no tecido total (c) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente ou não de tiamina.

Fig. 35. Gráficos de dispersão da relação entre o número de oligodendrócitos/mm² e o tamanho do GD (a, c), e o tamanho da sub-região CA1-CA3 (painéis b, d) para as condições sem tiamina e com tiamina

Fig. 36. Imagens representativas utilizadas para obter os dados quantitativos. (a) tecido exposto por 7 dias de cultura em meio normal, (b) tecido exposto por 7 dias em meio de cultura sem tiamina, mostrando marcação para neurônio, marcação para BDNF e núcleo de todas as células.

Fig. 37. Média \pm SD da densidade de células NeuN⁺/BDNF⁺ na região GD (painel a) e CA1-CA3 (painel b) para as condições com tiamina e sem tiamina nos tempos de incubação 4, 7 e 10 dias.

Fig. 38. Média \pm SD da densidade de células NeuN⁺/BDNF⁺ no tecido total (fatia do hipocampo) para as condições com tiamina e sem tiamina nos tempos de incubação 4, 7 e 10 dias.

Fig. 39. Média \pm SD da porcentagem de células NeuN⁺/BDNF⁺ nas sub-regiões do GD (painel a) e CA1-CA3 (painel b) para as condições com tiamina e sem tiamina nos tempos de incubação 4, 7 e 10 dias.

Fig. 40. Média \pm SD da porcentagem de células NeuN⁺/BDNF⁺ no tecido total na condição com tiamina e sem tiamina nos tempos de incubação de 4, 7 e 10 dias.

Fig. 41. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios totais/mm² e a porcentagem de células BDNF⁺/NeuN⁺ no GD (a, c), e na sub-região CA1-CA3 (b, d) nas condições sem tiamina e com tiamina.

Fig. 42. Número de células BDNF⁺/NeuN⁺ no GD (painel a) e na sub-região CA1-CA3 (painel b) para as condições com tiamina e sem tiamina após 7 dias de recuperação.

Fig. 43. Porcentagem de células BDNF⁺/NeuN⁺ em relação ao número total de neurônios (=100%) no GD (painel a) e na sub-região CA1-CA3 (painel b) para as condições com tiamina e sem tiamina após 7 dias de recuperação.

Fig. 44. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios/mm² e a porcentagem de células NeuN⁺/BDNF⁺ no GD+CA1-CA3, nas condições com tiamina por 17 dias (painel a) e meio sem tiamina por 10 dias, seguidos por 7 dias de recuperação em meio com tiamina (painel b).

Fig. 45. Imagem representativa de uma dupla marcação com marcação de todos os núcleos, marcação de anti-GalC (oligodendrócitos), marcação de anti-BDNF e a somatória de todas as imagens.

Fig. 46. Média \pm SD da densidade de células GalC⁺/BDNF⁺ na região do GD (a), CA1-CA3 (b) e tecido total (c) nas condições com tiamina e sem tiamina nos tempos de incubação de 4, 7 e 10 dias.

Fig. 47. Média \pm SD da porcentagem de células GalC⁺/BDNF⁺ na sub-região do GD (a), CA1-CA3 (b) e tecido total (c) para as condições com e sem tiamina nos tempos de incubação de 4, 7 e 10 dias.

Fig. 48. Gráficos de dispersão entre o número de oligodendrócitos/mm² e a de células GalC⁺/BDNF⁺ em relação ao número total de oligodendrócitos (=100%) no GD (a, c), e na sub-região CA1-CA3 (b, d) nas condições com e sem tiamina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos experimentos de imunofluorescência analisados no microscópio confocal, indicando os respectivos marcadores.

Tabela 2: Resumo Geral de Parte dos Resultados

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analys of variance</i> (Análise de Variância)
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CA	<i>Cornu Ammoni</i>
COH	Culturas Organotípicas de Hipocampo
CPF	Córtex Pré-Frontal
Cy3	Cianina 3
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> (4',6-Diamino-2-Fenilindol)
DT	Deficiência de Tiamina
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GD	Giro Denteado
IP	Iodeto de propídio
MCS	Meio MEM suplementado com soro equino
MEM	<i>Minnimum Essential Medium</i> (Meio essencial mínimo)
MSS	Meio MEM sem soro equino
N-B27	<i>Meio neurobasal suplementado com B27</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida)
NGF	<i>Nerve growth fator</i> (fator de crescimento nervoso)
NST	Meio Neurobasal Sem Tiamina
NT-3	Neurotrofina 3
OPC	<i>Oligodendrocyte Progenitor Cells</i> (células progenitoras de oligodendrócitos)
p75NTR	<i>Neurotrophin Receptor P75</i> (Receptor de Neurotrofina p75)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
RM	<i>Repeated measures</i> (Medidas Repetidas)
SBH	Solução Balanceada de Hanks
SD	<i>Standard deviation</i> (Desvio padrão)
ThTr-1 e ThTr-2	<i>Thiamine transporter 1, 2</i> (Transportador de tiamina 1 e 2)
SNC	Sistema Nervoso Central
SWK	Síndrome de Wernike-Korsakoff
T	Tiamina
TDP, TPP	Tiamina Difosfato, Tiamina Pirofosfato
TMP	Tiamina Monofosfato
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i> (Receptor de Tirosina Cinase B)
TTP	Tiamina Trifosfato

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
1.1.	Considerações Iniciais - Questões Centrais	13
1.2.	Deficiência de Tiamina como modelo para o estudo de processos neurodegenerativos	15
1.3.	Hipocampo e deficiência de tiamina	17
1.4.	Cultura organotípica de hipocampo	19
1.5.	Culturas Organotípicas e neurodegeneração	22
1.6.	Fator neurotrófico derivado do cérebro	24
1.7.	Justificativas	26
1.8.	Objetivos	28
2.	Materiais e métodos	29
2.1.	Aspectos Éticos	29
2.2.	Local de Realização	29
2.3.	Animais	29
2.4.	Obtenção das culturas organotípicas de fatias de hipocampo	29
2.5.	Determinação das condições de suplementação com soro equino	32
2.6.	Produção das COH em condição deficiente em tiamina	35
2.7.	Imunomarcagem das culturas organotípicas	36
2.8.	Marcação com iodeto de propídio	37
2.9.	Contagem de células e dupla marcação visualizada e analisada em microscópio confocal	37
2.10.	Análises Estatísticas	38
	Parte 1: Padronização das condições ótimas para produção e manutenção de culturas organotípicas de hipocampo	40
3.	Resultados	41
3.1.	Determinação das condições de suplementação com soro equino	41
3.2.	Estabilidade da cultura ao longo do tempo	43
4.	Discussão	48
	Parte 2: Estabelecimento das Culturas Organotípicas do Hipocampo como modelo para o estudo da Deficiência de Tiamina	52
5.	Resultados	53

5.1.	Efeitos da deficiência de tiamina sobre parâmetros hipocampais.....	53
2.3	Viabilidade celular, avaliada medindo a incorporação de iodeto de propídio.....	59
5.2.	Recuperação do episódio de DT	65
5.3.	Efeito de um episódio de dt sobre o número de oligodendrócitos	68
6.	Discussão	70
Parte 3: Determinação da produção de BDNF durante e após um episódio de deficiência de tiamina em modelo de Cultura Organotípica de Hipocampo.....		
7.	Resultados	81
7.1.	Efeito da DT sobre os níveis de BDNF em neurônios	81
7.2.	Recuperação dos efeitos da DT sobre a produção de BDNF em neurônios.....	86
7.3.	Efeito da DT sobre os níveis de BDNF em oligodendrócitos	88
8.	Discussão	92
9.	Considerações Finais	96
10.	Conclusões.....	101
11.	Referências	102
Anexo A.....		128
Anexo B.....		130

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS - QUESTÕES CENTRAIS

A principal linha de pesquisa da nossa equipe, no Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LANEC, UFMG), é investigar os mecanismos moleculares subjacentes ao processo de neurodegeneração relacionados com a deficiência de tiamina (DT) e associado às alterações nos processos de aprendizagem e memória. Nos estudos que compõem essa linha têm-se como objetivos centrais, não apenas compreender os mecanismos moleculares do processo de neurodegeneração induzido pela DT, como também entender aspectos dos fundamentos neurobiológicos do aprendizado e memória. Sabe-se que muitas características das etapas que resultam na morte neuronal causada por diferentes fatores etiológicos são comuns em diferentes doenças neurodegenerativas, fazendo do modelo da DT um importante instrumento na investigação dos processos bioquímicos subjacentes à neurodegeneração (D. Liu *et al.*, 2017).

Para verificar as relações entre disfunções neurobiológicas e aspectos comportamentais, principalmente aqueles relacionados aos distúrbios cognitivos, nosso grupo de pesquisa tem estudado a DT em modelos experimentais, utilizando roedores, através da administração de uma dieta alimentar deficiente desta vitamina, associada ou não ao consumo de etanol, ou associada ao inibidor (piritiamina) da enzima responsável pela produção da forma ativa da tiamina. Esse modelo tem sido bastante útil nos estudos de mecanismos relacionados à neurodegeneração e das bases neurobiológicas de aspectos comportamentais, e tem gerado contribuições bastante interessantes para o entendimento dos fenômenos da neurodegeneração e suas consequências (Bueno *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2006; de Freitas-Silva *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2006; Pires *et al.*, 2001, 2005; Resende *et al.*, 2012; Vigil *et al.*, 2010).

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo (Carvalho *et al.*, 2006; de Fátima Oliveira-Silva *et al.*, 2014; de Freitas Silva *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2006; Pires *et al.*, 2005) e outros autores (Pitkin & Savage, 2004; Vedder *et al.*, 2015; Vedder & Savage, 2017) foi observado que a DT produz déficits nos processos de aprendizado e memória espacial mostrando um possível efeito da deficiência no hipocampo, região do cérebro responsável por processos cognitivos relacionados à navegação espacial. Por outro lado, as evidências dos efeitos da DT no hipocampo são contraditórias, sendo que diferentes artigos da literatura descrevem apenas disfunções bioquímicas, outros neurodegeneração e, ainda outros, deficiências nos processos de neuroregeneração. Um dos componentes moleculares que tem sido associado a esses fenômenos de neurodegeneração e neurogênese são os fatores neurotróficos (Zuccato & Cattaneo, 2009). Recentemente, foi observado por nosso grupo e outros que, após um episódio de DT, os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, de acordo com o termo em inglês: *Brain Derived Neurotrophic*

Factor) também se encontram diminuídos (Sena *et al.*, *in press*; Vedder *et al.*, 2015). O BDNF é uma proteína, membro de uma família de neurotrofinas, envolvida em processos tais como plasticidade e memória, produzido por várias células do Sistema Nervoso Central (SNC), como neurônios e oligodendrócitos. É sabido que o BDNF produzido por cada tipo celular tem papéis biológicos diferentes. Ainda não se sabe como a DT afeta a produção de BDNF e esse conhecimento é importante no entendimento do papel desta neurotrofina no processo de neurodegeneração induzido pela falta desta vitamina. Assim, propusemos determinar o efeito da DT na produção de BDNF nos neurônios e nos oligodendrócitos no hipocampo durante e após a deficiência de tiamina. A escolha do hipocampo como região alvo foi devido ao conhecimento prévio do papel do hipocampo em funções cognitivas espaciais (Geva-Sagiv *et al.*, 2015; Lisman *et al.*, 2017) e o seu envolvimento em disfunções comportamentais normalmente encontradas em diferentes doenças neurodegenerativas (Anderson *et al.*, 1995; Cherubini & Miles, 2015; Churchyard & Lees, 1997; Frisoni *et al.*, 2008; Tucsek *et al.*, 2014), independente das etiologias, incluindo a síndrome de Wernicke causada pela DT.

Com a finalidade de testar a hipótese de que a DT altera os níveis de BDNF em células do SNC afetando de forma distinta os neurônios e oligodendrócitos do hipocampo, deparamos com a seguinte questão: qual modelo seria mais adequado para testar essa hipótese? Os modelos *in vivo* possibilitam avaliações de aspectos comportamentais, mas apresentam como desvantagens o grande número de animais necessário e limitações para detecção de mecanismos moleculares específicos durante as diferentes fases do episódio de DT. O modelo de cultura organotípica de hipocampo (COH) pode suprir algumas dessas desvantagens, já que permite o estudo de mecanismos bioquímicos e a suas cinéticas, assim como preserva as interconexões do tecido, permitindo avaliar processos de transmissão sináptica, entre outros que envolvem mais de um tipo celular. Além disto, permite o uso de amostras menores, possibilitando uma diminuição drástica no número de animais experimentais em comparação com outros modelos. Ademais, possibilita a realização de estudos pareados já que várias fatias de tecido podem ser obtidas a partir de um único animal, e elas podem ser expostas a diversas condições ou diferentes tempos de exposição a um insulto, como a DT. Assim, optamos por usar esse modelo para estudar os efeitos da DT sobre diferentes parâmetros morfológicos e bioquímicos no hipocampo. Para alcançar esses objetivos, o presente trabalho foi dividido em três partes: (i) padronização e implantação das COH, (ii) avaliação da viabilidade em usar o modelo da COH para a análise de modificações morfológicas e bioquímicas produzidas pela DT e (iii) estudo da produção de BDNF por neurônios e oligodendrócitos durante e após um episódio de DT usando COH.

O estabelecimento das COH para o estudo da DT abre novas perspectivas de estudos no campo das neurociências, que visam a análise de diferentes parâmetros fisiológicos, morfológicos e eletrofisiológicos, dentre outros, que poderão ter implicações no entendimento de diferentes aspectos afetados nos processos neurodegenerativos e que, posteriormente, podem ser testados em modelos *in vivo*.

1.2. DEFICIÊNCIA DE TIAMINA COMO MODELO PARA O ESTUDO DE PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS

A tiamina, também conhecida como vitamina B1, é uma vitamina fundamental no funcionamento do metabolismo energético celular, atuando como cofator de múltiplas enzimas na via glicolítica (Lonsdale, 2006) e na síntese de neurotransmissores e ácidos nucleicos (Singleton & Martin, 2001). Na sua forma livre, a vitamina B1 é composta por um anel tiazol e um grupo pirimidina, que formam uma estrutura de dois anéis contendo enxofre e unidos por um grupo metileno (Said, 2011).

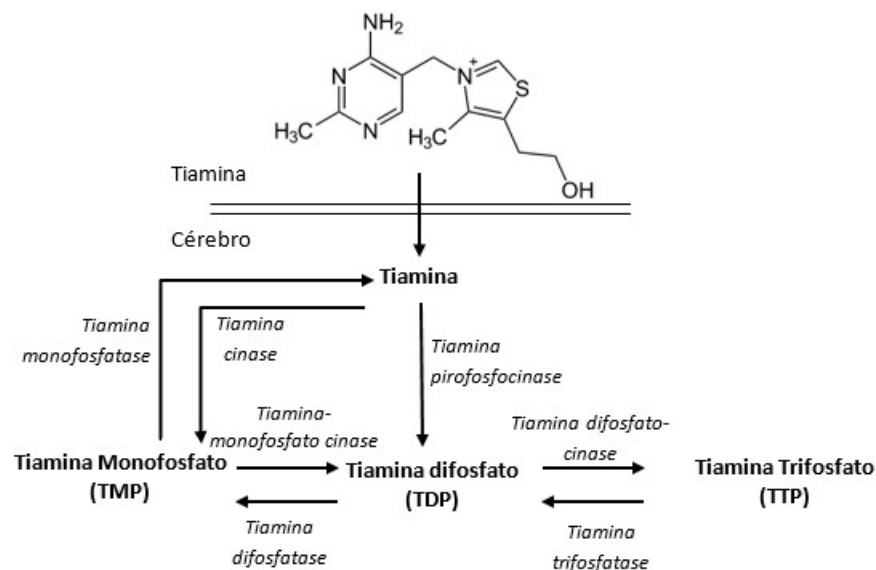


Fig. 1. Esquema do metabolismo da tiamina (Vitamina B1) no cérebro (Adaptado de Gibson & Zhang, 2002).

Após ser ingerida, a tiamina (T) chega aos tecidos, onde é transportada para o interior das células através dos transportadores específicos: transportador de tiamina 1 e 2 (ThTr-1 e ThTr-2) (P. R. Martin *et al.*, 2003; Mayr *et al.*, 2011). Na célula, é fosforilada (Fig. 1) dando origem a três formas: tiamina monofosfato (TMP), tiamina pirofosfato (TPP, também chamada de tiamina difosfato TDP) e tiamina trifosfato (TTP). De acordo com Bettendorff *et al.* (1993), a fosforilação da T em TMP é um pré-requisito para que seja transportada através das membranas das organelas, principalmente nos casos de proliferação neuronal (Bettendorff *et al.*, 1993). Além disso, a TMP é um substrato para gerar a TPP, forma ativa que atua como cofator das seguintes enzimas do metabolismo de carboidratos: alfa-cetoglutarato desidrogenase, transcetolase e piruvato desidrogenase. A transcetolase é uma enzima chave na via das pentoses fosfato que produz, entre outras, duas moléculas importantes: ribose-5-fostato, essencial para a formação de ácidos nucleicos, e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH), que aporta os equivalentes de redução necessários para as vias anabólicas, incluindo a reposição das concentrações de glutatona reduzida, antioxidante envolvido nas defesas contra o estresse oxidativo (Portari *et al.*, 2008; Singleton & Martin, 2001). A TTP é originada a

partir da fosforilação da TPP e constitui 5-10% da concentração de tiamina no corpo (Bettendorff *et al.*, 1993; Nakagawasai, 2005).

A DT pode ocorrer pela diminuição na absorção ou na ingestão de tiamina, e pode levar à morte neuronal em áreas vulneráveis do cérebro, gerando um espectro de doenças neurológicas (Sechi & Serra, 2007). Pode-se manifestar na desnutrição associada ao alcoolismo crônico e em uma série de espectros clínicos (Harper, 2009; Sechi & Serra, 2007). Até 80% dos alcoolistas crônicos sofrem de DT devido à ingestão inadequada de nutrientes, redução da absorção da tiamina no intestino e deficiência na utilização da vitamina absorvida, devido aos efeitos inibitórios do etanol sobre cinases responsáveis pela produção das formas fosforiladas (Hoyumpa, 1980; Tallaksen *et al.*, 1992). A DT envolve prejuízos no metabolismo oxidativo, podendo causar perda neuronal (Gangolf *et al.*, 2010), colapso mitocondrial e apoptose celular (Singleton & Martin, 2001). Em seres humanos, a DT pode resultar em sintomas tais como, ataxia, distúrbios oculomotores, confusão e, se não for tratada, pode levar à perda da memória e confabulação, produzindo a síndrome denominada Wernicke-Korsakoff (SWK) (Navarro *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2005). Nos pacientes com SWK são observadas lesões cerebrais que afetam, predominantemente, o tálamo, corpos mamilares, região periaquedutal, assoalho do quarto ventrículo, hipotálamo, vermis cerebelar, hipocampo, ponte, córtex pré-frontal (CPF) e cerebelo (Sullivan & Pfefferbaum, 2009; Torvik, 2009).

Apesar que a DT representa a causa subjacente para a manifestação de sintomas característicos da SWK, a falta de tiamina leva a consequências, como alterações em funções cerebrais e danos estruturais, que são também observadas em outras doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla, dentre outras (Jhala *et al.*, 2014; D. Liu *et al.*, 2017). Análises *post-mortem* de amostras de tecido cerebral de seres humanos que tiveram diagnóstico de enfermidades diferentes demonstram que os processos dependentes de tiamina estão alterados em várias doenças, principalmente naquelas relacionadas com o envelhecimento, como as neurodegenerativas e, especialmente, a doença de Alzheimer (Karuppagounder & Gibson, 2009). Segundo Jhala & Hazell (2010), os prejuízos no metabolismo oxidativo devido à diminuição da atividade das enzimas dependentes de tiamina levam a uma cascata de eventos multifatoriais que incluem alteração do estado energético, estresse oxidativo, deposição de proteínas amiloides, diminuição da utilização de glicose e inflamação (Jhala & Hazell, 2011). Em muitos pacientes com diferentes tipos de doenças neurodegenerativas, tem-se observado uma diminuição nos processos regulados por enzimas dependentes de tiamina e, muitas vezes, os sintomas e as fisiopatologias das doenças estão relacionadas com o declínio na atividade dessas enzimas (Gibson & Zhang, 2002). Além disto, a DT gera a ativação de micróglia, astrócitos e células endoteliais (Ke *et al.*, 2006) e produz alterações no metabolismo da glicose (Chen & Zhong, 2013), características que são também encontradas em outras doenças neurodegenerativas. Desse modo, tem sido sugerido que os metabólitos derivados da tiamina poderiam ser utilizados como biomarcadores na detecção precoce dessas doenças, e que a

administração de tiamina pode ter um potencial terapêutico para os pacientes (D. Liu *et al.*, 2017). É interessante notar que as disfunções comportamentais e as alterações bioquímicas nos processos dependentes de tiamina, em diferentes áreas do cérebro, encontradas em doenças neurodegenerativas em humanos foram observadas também em modelos animais, como os roedores, utilizados para o estudo dessas doenças (Karuppagounder & Gibson, 2009). Embora as disfunções bioquímicas subjacentes podem ser diferentes para cada enfermidade, a DT contribui com a patogênese de muitas doenças neurodegenerativas em relação ao distúrbio energético resultante e, portanto, é um modelo bastante interessante e adequado para o estudo dos mecanismos de neurodegeneração.

1.3. ESTRUTURA DO HIPOCAMPO

O hipocampo faz parte de um sistema de estruturas cerebrais anatomicamente relacionadas no lobo temporal medial. Recebe aferências de um grande número de áreas neocorticais através do córtex entorrinal e se projeta através do fórnix para outras estruturas, como os corpos mamilares do hipotálamo (Machado, 2002). Está envolvido na consolidação da memória de curto para longo prazo e na formação de memória espacial aloctrônica (que não depende do ponto de vista do sujeito), permitindo a navegação guiada por associações e mapeamento de coordenadas estabelecidas por referências presentes no ambiente. O hipocampo é composto por duas sub-regiões inter-relacionadas: o giro denteado (GD) e o *Cornu Ammonis* (CA). Esse último é dividido anatômica e funcionalmente em diferentes subestruturas denominadas CA1, CA2, CA3 e CA4. As regiões CA1 e CA3 têm um papel específico em processos de memória (De Michele, 2016), sendo que a região CA3 é susceptível a danos produzidos por convulsões e neurodegeneração (Cherubini & Miles, 2015). CA2 é uma pequena região localizada entre CA1 e CA3, similar em composição celular à CA3. CA4 também é chamada de hilo, e é considerada parte do GD. A região CA3 envia projeções para CA1 e CA2, conhecidas como colaterais de Schaffer. As sub-regiões e principais vias do hipocampo estão apresentadas em um desenho na Fig. 2. O giro denteado parece ser responsável pela dimensão temporal da memória, formação de novas memórias episódicas e a exploração de novos ambientes, entre outras funções (Amaral *et al.*, 2007). Por possuir uma camada de células progenitoras, é uma das regiões do cérebro dotada de capacidade neurogênica que se mantém funcional na idade adulta (Eriksson *et al.*, 1998).

Como apresentado na Fig. 2, o córtex entorrinal projeta para o GD e CA3 através da via perfurante. As informações do GD são transmitidas para CA3 através das fibras musgosas. Os axônios das células piramidais da sub-região CA3 enviam sinais para os dendritos das células piramidais da região CA1 através das colaterais de Schaffer. Finalmente, CA1 projeta seus axônios para o subículo que conecta com as camadas mais profundas do córtex entorrinal (Sparks, 2012).

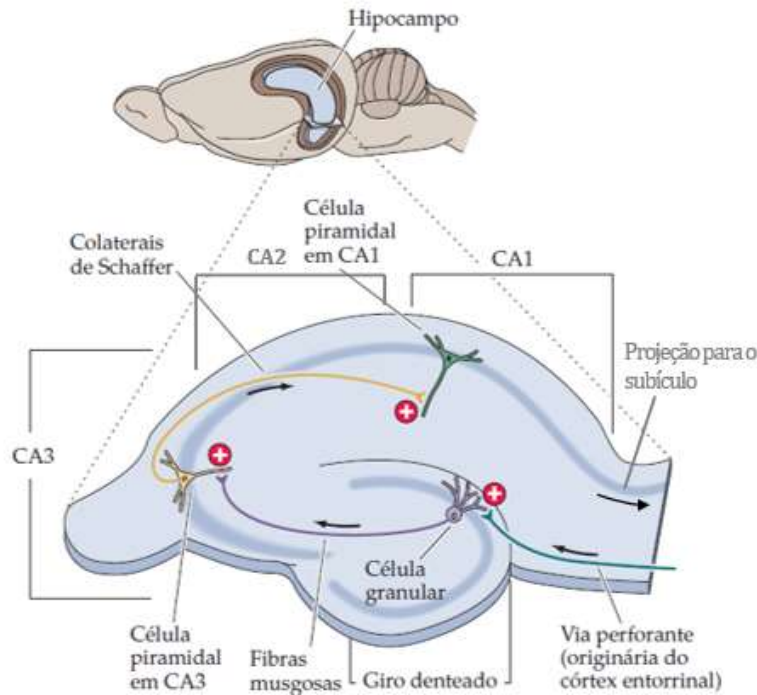


Fig. 2. Desenho mostrando a localização do hipocampo no cérebro de um roedor (parte superior da figura) e a estrutura do hipocampo indicando sub-regiões e principais vias (parte inferior). Adaptado de Purves *et al.*, 2010.

1.3.1. O EFEITO DA DT NO HIPOCAMPO E NOS DIFERENTES TIPOS CELULARES

As lesões no hipocampo em humanos, primatas não humanos e roedores impedem a realização de tarefas de memória espacial. Existem evidências de que as regiões hipocampais são importantes na formação de um mapa cognitivo espacial do ambiente, registrando informações aloclétricas do espaço, ou seja, independente do ponto de vista do sujeito. Foi observado, tanto em humanos (Cohen & Squire, 1981) como em modelos experimentais em roedores (Langlais & Savage, 1995; Pires *et al.*, 2005), que a DT produz déficits no aprendizado espacial e na formação de memórias. No entanto, nos diversos trabalhos realizados (citados abaixo), existem controvérsias que ainda não foram esclarecidas sobre se o hipocampo sofre somente disfunções bioquímicas, ou se também apresenta lesões neurodegenerativas, após um episódio de DT. Langlais e Savage (1995), entre outros autores, destacam a presença de alterações neuropatológicas e bioquímicas, mas não encontraram evidências de perda neuronal no hipocampo. Dentro das modificações bioquímicas observadas, encontram-se mudanças na síntese e liberação de neurotransmissores, como diminuição da produção de serotonina e de acetilcolina (Nakagawasai, 2005; Pires *et al.*, 2001, 2005; Roland *et al.*, 2008; Savage, 2003; Savage & Guarino, 2010) e um desbalanceamento na liberação de GABA e glutamato (Carvalho *et al.*, 2006; Sena, 2019). Outras modificações observadas são, por exemplo, a diminuição da função enzimática da transcetolase (Y. Zhao *et al.*, 2009), perda das fibras colinérgicas que inervam a região (Nakagawasai *et al.*, 2000; Ryan P. Vetreno *et al.*, 2012), mudanças nos níveis de sinapsina I e fosfosinapsina I, envolvidas na liberação de neurotransmissores, dentre outras funções (Resende *et al.*,

2012). Já outros autores observaram lesões hipocampais proeminentes, p. ex. neurônios danificados e perda neuronal, perda de volume da região e edema (Irle & Markowitsch, 1983; Sullivan & Pfefferbaum, 2009; Walker *et al.*, 1980). Em outros estudos, além da perda de neurônios, foi observado que a DT causa uma perda no número de espinhas dendríticas nos neurônios remanescentes do giro dentado do hipocampo (Inaba *et al.*, 2016). Zhao *et al.* (2008) observaram que o declínio no aprendizado induzido pela DT parece estar relacionado com a perda da capacidade neurogênica no giro dentado, a perda de neurônios colinérgicos e a diminuição dos neurônios maduros (N. Zhao *et al.*, 2008).

Também é de interesse conhecer o efeito da DT em outros tipos celulares não neuronais presentes no hipocampo, como por exemplo oligodendrócitos, já que a deficiência desta vitamina produz uma diminuição na síntese de ácidos graxos, componente importante da mielina que é produzida por esse tipo de célula (Butterworth *et al.*, 1993). Foi observado em modelos animais de DT (Collins, 1967; Robertson *et al.*, 1968; Tellez & Terry, 1968) e modelos de alcoolismo (Saito *et al.*, 2002) a destruição da bainha de mielina em diferentes regiões do cérebro. Portanto, uma das possíveis causas da patofisiologia da síndrome causada pela DT pode ser disfunções na transmissão sináptica decorrente de uma perda da mielinização dos axônios no hipocampo (Dhir *et al.*, 2019). Embora não foram encontradas diferenças nas populações oligodendrocitárias após um episódio de DT no hipocampo (Ryan Peter Vetreno, 2011), outros autores observaram disfunções bioquímicas nos oligodendrócitos na medula, refletindo em inchaço da bainha de mielina (Langlais & Zhang, 1993). Portanto, é de interesse o estudo dos efeitos da DT nesse tipo celular a fim de elucidar os mecanismos que levam à manifestação dos fenômenos neurológicos observados em estado de deficiência.

1.4. CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO

Preparações de fatias de diferentes tecidos de um organismo podem ser mantidas em cultura por várias semanas e até meses. Para a sobrevivência do tecido, é necessária a presença de um substrato estável, meio de cultura para nutrição, oxigenação suficiente e temperatura de incubação de 37°C. Sob estas condições, as células nervosas continuam se diferenciando e desenvolvem uma organização tecidual similar à observada *in vivo* (B. Gähwiler, 1997). Esse procedimento é denominado cultura organotípica ou cultura *ex vivo*.

Em 1947, Mary Jane Hogue (1883-1962) produziu pela primeira vez uma cultura organotípica de tecido nervoso, especificamente de medula humana, para o estudo dos efeitos citopatogênicos do vírus da poliomielite (Zottoli & Seyfarth, 2018). Posteriormente, foram desenvolvidas culturas organotípicas de hipófise de rato (Bousquet & Meunier, 1962) e cerebelo de camundongo (Wolf, 1970), e foram realizados os primeiros estudos eletrofisiológicos (Crain, 1966; Crain & Bornstein, 1972). A técnica para a realização das culturas organotípicas também foi se aprimorando. Originalmente, usava-se uma câmara de cultura para grandes quantidades de tecido, que possuía tubos a fim de permitir o intercâmbio gasoso entre o tecido e o

meio (Fig. 3, a) (Boyd, 1971). Alguns anos mais tarde, Gähwiler desenvolveu a técnica conhecida como “tubo giratório”, que consiste em um tubo a baixa rotação (dez rotações por hora), com o tecido embebido num coágulo de plasma coberto pelo meio de cultura na metade do ciclo e descoberto na outra metade (Fig. 3, b), passando por períodos sucessivos de alimentação e aeração (Gähwiler, 1981a, 1981b). Esse método permitia a cultura de fragmentos menores de tecido que permaneciam viáveis por mais tempo, porém, não se conseguia preservar a citoarquitetura da região de interesse. Stoppini *et al.* (1991) otimizaram esta técnica ao descobrir que as fatias podiam ser cultivadas sobre uma membrana semipermeável, garantindo assim o intercâmbio gasoso pela superfície exposta do tecido e nutrição através de capilaridade na parte inferior do tecido (Stoppini *et al.*, 1991). Essa técnica permitiu a realização de co-culturas com outros tecidos ou a escolha de quais substâncias podem difundir do meio à fatia através da modificação do tamanho do poro da membrana (Fig. 3, c), impulsionando a utilização das culturas organotípicas como modelo para diferentes estudos do tecido nervoso.

As culturas organotípicas têm várias vantagens em relação a outros métodos, como estudo *in vivo* ou cultura celular. Em primeiro lugar, permitem a manutenção das interconexões celulares e da estrutura tridimensional do tecido. Em segundo lugar, a diferença de uma cultura celular *in vitro*, é que todos os tipos celulares desse tecido estão representados na cultura organotípica, permitindo estudar também as inter-relações entre os diferentes tipos de células. Finalmente, o número de animais necessário para realizar um estudo é menor que em experimentos *in vivo*, assim como também existe uma redução na variabilidade individual, já que várias fatias são obtidas de um mesmo animal, permitindo a realização de estudos pareados. Porém, certamente, variáveis comportamentais do indivíduo não podem ser analisadas nas culturas. Os animais utilizados para a produção das culturas são geralmente embriões ou neonatos e, raramente, animais adultos. Os neonatos são os mais utilizados por várias razões: a citoarquitetura do tecido já está estabelecida na maior parte das regiões do SNC, o cérebro é maior em comparação com embriões e, portanto, é mais fácil de dissecar e, finalmente, as células nervosas sobrevivem mais facilmente à explantação que em animais adultos (B. Gähwiler, 1997). Tem sido observado que, quanto mais jovem o animal, melhor será a permeabilidade dos tecidos aos gases e nutrientes, observando-se uma sobrevivência maior das culturas (Humpel, 2015).

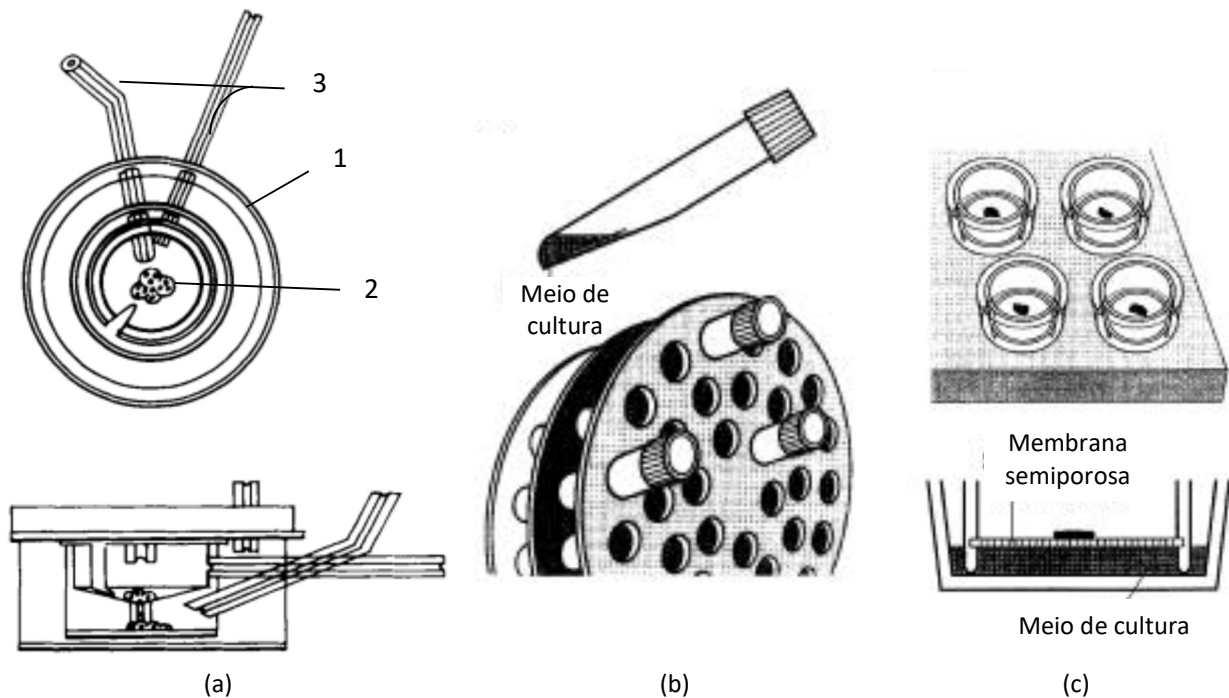


Fig. 3. Desenhos esquemáticos de três técnicas (painéis a, b e c) para a obtenção de culturas organotípica. (a) Crescimento em câmara (1) com o tecido (2) no centro da câmara e tubos (3) para intercâmbio gasoso; (b) "tubo giratório" que permite períodos de aeração e nutrição subsequentes e; (c) cultura em membrana, que permite que o intercâmbio gasoso e a nutrição aconteçam simultaneamente. Extraído e adaptado de Boyd, 1971 (a) e Gähwiler, 1997 (b,c).

Como mencionado, as culturas organotípicas podem ser produzidas a partir de vários tecidos diferentes. No presente trabalho, focaremos na produção de culturas organotípicas derivadas de fatias do hipocampo. O hipocampo possui células progenitoras, que conferem a plasticidade necessária para resistir ao trauma mecânico que ocorre quando os processos neurais são cortados, e ajudam na estabilidade do tecido *ex vivo* a longo prazo. Na preparação das culturas organotípicas de hipocampo (COH) de animais neonatos, o tecido é dissecado e fatiado. Nesse processo, as fibras aferentes são cortadas, mas como não é observado geralmente um grande rearranjo sináptico, pode-se considerar que as características elétricas do tecido são muito similares as do animal *in vivo* (B. Gähwiler, 1997). Todos os tipos celulares, nervosos e gliais, sobrevivem e crescem na preparação das COH, e as populações destes tipos celulares são representativas das observadas *in vivo* (Bahr, 1995). As células piramidais do hipocampo mantêm as suas características basais e apicais, possuem árvores dendríticas com numerosas espinhas (Gähwiler, 1984), têm transmissão sináptica normal e têm formas de plasticidade sináptica de curto e longo prazo (Debanne *et al.*, 1994). Em experimentos realizados com COH, foi observado que o grau de comunicação entre as células nervosas aumenta ao longo do tempo de cultura, sendo provavelmente a mesma evolução observada em modelos *in vivo* devido ao crescimento dos animais e a maturação do sistema nervoso (Debanne *et al.*, 1995). Também, foi observado que, ao longo do tempo na cultura, os neurônios da região CA1 continuam se desenvolvendo e adquirindo morfologias dendríticas similares aos neurônios CA1 de animais adultos (Chapleau *et al.*, 2008).

Deste modo, as culturas organotípicas representam um modelo tridimensional representativo e anatomicamente intacto do tecido *in vivo* e, portanto, são uma boa ferramenta para a observação do comportamento celular em diferentes condições, graças à possibilidade da realização de estudos bioquímicos, farmacológicos, eletrofisiológicos e morfológicos, dentre outros.

1.5. CULTURAS ORGANOTÍPICAS E NEURODEGENERAÇÃO

As culturas organotípicas têm sido usadas para o estudo de processos que podem levar à morte celular em diferentes modelos de neurodegeneração. As principais vantagens deste modelo, como foi discutido anteriormente, são a preservação da estrutura tridimensional e a representatividade anatômica das regiões das quais derivam (C. L. Croft *et al.*, 2019), assim como a manutenção de todos os tipos celulares característicos do tecido nas proporções observadas *in vivo*, neurais e não neurais. Essa característica é importante já que muitas doenças neurodegenerativas não envolvem unicamente mudanças bioquímicas em neurônios ou neurodegeneração, mas também apresentam alterações em outros tipos celulares. Além disso, como as células e sinapses nas culturas organotípicas ao longo do tempo seguem uma dinâmica similar às observadas no cérebro em desenvolvimento *in vivo*, a conectividade, função neural e propriedades elétricas são retidas e o fenótipo das sinapses maduras nas culturas é comparável ao de um cérebro adulto.

O modelo de cultura organotípica em roedores já tem sido utilizado para estudar processos neurodegenerativos como os presentes na doença de Alzheimer (Calderó *et al.*, 2010; Cara L. Croft & Noble, 2018; Frozza *et al.*, 2009; Suh *et al.*, 2008), na esclerose amiotrófica lateral (Corse *et al.*, 1999; Sugai *et al.*, 2004), na doença de Parkinson (Ben *et al.*, 2019; Stahl *et al.*, 2011; Ucar & Humpel, 2019), ou os provocados como consequência de uma isquemia (Cho *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2016; Rieger *et al.*, 2017), dentre outros. Até o presente, poucos estudos de DT têm sido conduzidos utilizando culturas organotípicas, e todos eles foram realizados em culturas de cerebelo. Yonezawa e Iwanami (1966) cultivaram fatias de cerebelo de rato em meio contendo pirritiamina em diferentes concentrações a fim de induzir DT, já que essa substância é um inibidor da fosforilação da TMP à sua forma ativa (TPP) por ser substrato da pirofosfoquinase (J. Liu *et al.*, 2008). Esses autores observaram mudanças morfológicas no tecido, do tipo necróticas, a partir dos dias 2-3 de exposição na presença de concentrações altas de pirritiamina ($10^{-3} - 10^{-4}$ M), e dos dias 10-14 com concentrações mais baixas, de $10^{-7} - 10^{-8}$ M (Yonezawa & Iwanami, 1966). Uma maior quantidade de estudos tem sido feita utilizando cultura organotípica e exposição a etanol, tanto no cerebelo quanto no hipocampo ou no cérebro inteiro de roedores. Como foi discutido anteriormente, o etanol é inibidor de cinases responsáveis pela fosforilação da tiamina e, portanto, impede a conversão da tiamina a sua forma ativa. Assim, a exposição ao etanol também pode produzir DT. Mulholland *et al.* (2005) observaram que, no tratamento de fatias de cerebelo de rato com pirritiamina durante 11 dias, houve um aumento da morte celular quando comparado com culturas organotípicas tratadas unicamente com etanol. As culturas tratadas

concomitantemente com etanol e pirritiamina sofreram uma perda celular ainda maior (Mulholland *et al.*, 2005). Prendergast *et al.* (2004) observaram que a exposição de COH de rato a etanol durante 11 dias não produziu neurotoxicidade, avaliada por iodeto de propídio (IP, que é um marcador de morte celular), em nenhuma região cerebral, mas após um dia de retirar o etanol do meio foi observado neurotoxicidade na região CA1 do hipocampo, produzida pela propagação de potenciais de ação polisinápticos e pela excitação de sistemas glutamatérgicos em todo o tecido (Prendergast *et al.*, 2004). Crews *et al.* (2004) observaram, usando COH produzidas em rato, que a exposição por 10 dias a etanol não produz evidência de neurotoxicidade, avaliada também por incorporação de IP, mas observaram perda de marcadores neuronais e astrocitários, assim como uma redução de 50% na divisão celular em todo o tecido (Crews *et al.*, 2004).

As COH podem ser um importante instrumento na elucidação das modificações bioquímicas induzidas pela DT, porém tem que ser considerado que os animais utilizados para a produção destas culturas são animais neonatais, de aproximadamente 7 dias de idade, os quais apresentam um perfil neurobiológico diferente dos animais adultos. Já foi observado que a DT em ratos fêmeas durante a gestação produz retardamento do crescimento (Roecklein *et al.*, 1985), diminuição do peso cerebral, alterações na mielinogênese (Bâ, 2008; Trostler *et al.*, 1977) e mudanças nos parâmetros neuroquímicos no SNC nos animais após o nascimento (Butterworth, 1978). Em animais neonatos foi observado uma perda no número de neurônios piramidais e uma diminuição do núcleo dos neurônios remanescentes na região CA3 (Bâ *et al.*, 1999) e na região CA1, assim como também déficits no crescimento dendrítico e axonal, e na mielinogênese (Bâ *et al.*, 2005). Além disto, foi encontrado uma perda da morfologia das células da região CA3 e um aumento dos núcleos pró-apoptóticos, caracterizados por conter cromatina condensada (Bâ, 2008, 2017). Bâ *et al.* (2005) concluíram que a diminuição observada no número de neurônios na deficiência pós-natal pode-se dever à diminuição da disponibilidade de fatores tróficos devido às disfunções no desenvolvimento de axônios e sinapses. Em crianças, foi observado uma grande variedade de sintomas, desde confusão mental, déficits de memória, distúrbios de sono, encefalopatia severa, falha cardíaca congestiva e atrofia muscular, podendo culminar com a morte (Dhir *et al.*, 2019). Assim, concluímos que a DT afeta o hipocampo em modelos pré, peri e pós-natais e, portanto, o modelo de COH usando animais neonatais é adequado para o estudo dos efeitos da DT.

Uma revisão cuidadosa da literatura mostra que, até o presente momento, não existe estudo dos efeitos da DT utilizando o modelo de cultura organotípica com fatias de hipocampo. No entanto, estudos realizados expondo COH e também animais neonatais ao etanol sugerem que a COH pode ser um modelo promissor para estudos de processos de neurodegeneração induzidos pela DT. Portanto, o modelo padronizado a partir do presente trabalho pode ajudar na elucidação de mecanismos envolvidos nos fenômenos da neurodegeneração ou da neurogênese induzidos pela DT. Dados obtidos utilizando COH em condições de DT podem, posteriormente, servirem de base para o desenho de experimentos *in vivo*, com o intuito de se

avaliar as relações entre alterações em parâmetros neurobiológicos e disfunções comportamentais, como os déficits cognitivos, causados pela deficiência desta vitamina.

1.6. FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é parte de uma família de fatores neurotróficos associados ao crescimento e manutenção funcional do sistema nervoso. Especificamente, essa neurotrofina parece estar associada ao desenvolvimento neuronal e glial, à neuroproteção e modulação de curta e longa duração das interações sinápticas, que são essenciais para a cognição, como por exemplo, a memória (Kowiański *et al.*, 2018). O BDNF possui uma distribuição ampla no SNC, mas a sua concentração parece ser maior no hipocampo, especialmente nas fibras musgosas das células granulares presentes no giro dentado (Conner *et al.*, 1997). A produção de BDNF parece fortalecer as sinapses excitatórias glutamatérgicas e enfraquecer as inibitórias (Kang & Schuman, 1995). A grande quantidade de papéis funcionais diferentes do BDNF pode ser explicada pelo padrão específico da síntese desta neurotrofina, que se compõe de várias isoformas intermediárias biologicamente ativas que interagem com diferentes tipos de receptores e desencadeiam vias de sinalização diferentes (Kowiański *et al.*, 2018).

A síntese e maturação do BDNF é um processo que ocorre em várias etapas. A proteína é sintetizada e enovelada no retículo endoplasmático na forma de um precursor, o pré-pró-BDNF. Quando é translocada ao aparelho de Golgi, a região “pré” é clivada, resultando na formação do pró-BDNF (B. Lu, 2003). Esse precursor pode ser clivado para atingir a sua forma madura (m-BDNF), tanto dentro da célula quanto no meio extracelular. Portanto, a célula pode secretar m-BDNF e pró-BDNF, que permite um controle da atividade enzimática envolvida na geração de isoformas de BDNF, mas também explica os papéis diferentes da molécula de BDNF nos processos fisiológicos (Kowiański *et al.*, 2018). As concentrações de m-BDNF e pró-BDNF secretado podem variar dependendo do estágio do desenvolvimento e da região do cérebro. No período pós-natal é possível encontrar uma maior concentração de pró-BDNF, enquanto m-BDNF é majoritário no adulto (Yang *et al.*, 2014). Assim, a primeira molécula, pró-BDNF, pode ser considerada como uma substância moduladora das funções cerebrais especialmente durante fases do desenvolvimento, enquanto a segunda, m-BDNF, também parece estar envolvida com processos de modulação, mas que ocorrem durante a idade adulta, como neuroproteção e plasticidade sináptica. Também, em neurônios é possível observar um aumento na liberação das duas isoformas da molécula de BDNF após uma despolarização da membrana celular (Mowla *et al.*, 2001). Cada isoforma de BDNF parece gerar efeitos característicos através da interação com um receptor distinto, produzindo a ativação de cascatas de sinalização diferentes, com efeitos biológicos distintos. O pró-BDNF interage preferencialmente com o receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), que requer a formação de complexos na membrana celular, formados por diferentes tipos de precursores de neurotrofinas, como o fator de crescimento nervoso (NGF,

pelas siglas em inglês) e a neurotrofina 3 (NT-3) e, também, adaptadores de sinalização. Esses eventos representam o primeiro passo para iniciar a sinalização celular (Chao & Hempstead, 1995). As mudanças na composição desses complexos são responsáveis pelo amplo espectro de funções geradas pela ativação do receptor p75, que podem ir desde sobrevivência neuronal, inibição do crescimento e até morte por apoptose (Teng *et al.*, 2005). O m-BDNF liga com afinidade no receptor de tirosina cinase B (TrkB), iniciando a dimerização de unidades do receptor, autofosforilação dos resíduos de tirosina com consequente ativação do receptor. O receptor fosforilado ativa diversas proteínas que, por sua vez, iniciam cascatas de sinalização (Gonzalez *et al.*, 2016; Huang & Reichardt, 2003; Minichiello, 2009) com diversos efeitos biológicos. Esses efeitos estão relacionados, principalmente, com a neurogênese e a plasticidade, a saber: atividade anti-apoptótica, modulação da plasticidade sináptica, regulação de síntese de proteínas e desenvolvimento do citoesqueleto, aumento do crescimento dendrítico, estimulação de síntese de actina e microtúbulos e crescimento de neuritos (Kowiański *et al.*, 2018).

Originalmente, os neurônios foram considerados como as principais células encarregadas da produção e da resposta ao BDNF, já que essa neurotrofina gera efeitos de longo prazo nesse tipo celular, como neuroproteção, sobrevivência e mudanças morfológicas em axônios e dendritos, e é essencial para a liberação de neurotransmissores e plasticidade sináptica (Numakawa *et al.*, 2010). Porém, outros experimentos indicaram que muitos tipos celulares no cérebro produzem e secretam BDNF. A micróglia, ativada ou não, *in vivo* e *in vitro*, expressa e responde ao BDNF, assim como modifica as populações neuronais próximas (Elkabes *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2009). Os astrócitos liberam BDNF a fim de estender a sobrevivência e a função dos neurônios (Ullian *et al.*, 2001) e aumentam a produção de BDNF em resposta a um insulto, principalmente no hipocampo e no prosencéfalo basal (Arendt *et al.*, 1995; Qu *et al.*, 2010), provavelmente um efeito compensatório que favorece a sobrevivência e funcionamento das áreas danificadas, promovendo sua regeneração (Du & Dreyfus, 2002). Os oligodendrócitos também produzem BDNF, e parecem ter um papel trófico que afeta o desenvolvimento, a sobrevivência e o funcionamento dos neurônios, assim como a sua manutenção (Bagayogo & Dreyfus, 2009; Dai *et al.*, 2003). A ausência de BDNF durante o desenvolvimento do SNC interfere na maturação dos oligodendrócitos, na formação da bainha de mielina e na extensão dos axônios (Estrada *et al.*, 2014). A bainha de mielina está envolvida na transmissão do impulso elétrico, com consequente papel na cognição, como no aprendizado e memória (Fields, 2008). Portanto, o BDNF secretado pelos oligodendrócitos tem um papel importante na função cognitiva. Como citado, um dos objetivos do presente trabalho foi investigar o efeito da DT em oligodendrócitos e também mencionamos que a DT causa deficiências na síntese da bainha de mielina. Além disto, sabe-se que o BDNF produzido por oligodendrócitos está envolvido na produção dessa bainha. Foi mostrado por nosso grupo (Sena, 2019) e outros (Ryan Peter Vetreno, 2011) que a DT tem um efeito sobre os níveis de BDNF no hipocampo, mas não foi estudado ainda se existe um efeito diferencial sobre o BDNF produzido por diferentes tipos celulares. O

uso da COH representa um modelo adequado para avaliar a existência ou não de uma consequência distinta da DT, ou seja, um efeito que depende do tipo celular.

As doenças que afetam a síntese ou secreção de BDNF podem resultar em disfunções das cascatas de sinalização, levando à manifestação de processos neuropatológicos. Vários estudos têm mostrado evidências de relações do BDNF com condições patológicas, como depressão (Brunoni *et al.*, 2008; Dwivedi, 2009), esquizofrenia (Xiu *et al.*, 2009), doenças como Alzheimer, Parkinson, (Zajac *et al.*, 2010; Zuccato & Cattaneo, 2009) e demências (Arancio & Chao, 2007). Estudos realizados pelo nosso grupo e outros autores demonstram a existência de uma relação entre as concentrações de BDNF e a DT (Vedder *et al.*, 2015; Vedder & Savage, 2017; Sena, 2019). Vedder *et al.* (2015) observaram que um episódio de DT em ratos, com ou sem a administração concomitante de etanol, produziu uma diminuição nos níveis de BDNF no CPF e no hipocampo, que parece estar relacionada com déficits observados na memória espacial e flexibilidade cognitiva desses animais (Vedder *et al.*, 2015). Posteriormente, estudos realizados pelo mesmo grupo mostraram que um episódio de DT em ratos gera uma queda na magnitude dos valores de potenciação a longo prazo e facilitação por pulso pareado (medidas da plasticidade hipocampal), e que esses parâmetros voltam aos mesmos valores do controle quando é administrado BDNF exógeno (Vedder & Savage, 2017). Portanto, a DT parece diminuir os processos plásticos no hipocampo, contribuindo para a manifestação de comportamentos relacionados com disfunções hipocampais, sendo que o BDNF parece reverter esses processos. Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que camundongos submetidos à um episódio de DT apresentam uma diminuição nos níveis de BDNF, e que esses níveis são restabelecidos quando o animal é submetido à um desafio cognitivo (Sena, 2019). Um fato a ser destacado é que uma das consequências da diminuição do BDNF pode ser a ativação dos denominados “receptores dependentes” (*Dependence Receptor*) que intermediam processos de morte celular (Goldschneider & Mehlen, 2010). Em resumo, o BDNF possui um papel na modulação da plasticidade e adaptação neural no hipocampo que parecem ser comprometidos na DT, mas podem ser recuperados mediante administração exógena, ou através de treinamentos cognitivos. No entanto, as bases moleculares desses efeitos continuam obscuras. Até o presente momento não existe na literatura evidências esclarecendo se os efeitos da DT são sobre a produção de BDNF proveniente de neurônios ou de oligodendrócitos ou ambos.

1.7. JUSTIFICATIVAS

- Não existe ainda um consenso na literatura sobre qual o tipo de dano ou os mecanismos moleculares associados às disfunções produzida no hipocampo durante e após um episódio de DT. O conhecimento dos mecanismos envolvidos na morte celular nesta região cerebral é importante, pois disfunções e lesões no hipocampo são observadas em várias doenças neurodegenerativas. Além disto, existem evidências que disfunções no hipocampo estão associadas a déficits cognitivos manifestados por pacientes com diagnósticos

de diferentes tipos de doenças neurodegenerativas, não apenas relacionadas à DT – como a Síndrome de Wernicke-Korsakoff – mas com outras do tipo das doenças de Alzheimer e de Parkinson.

- Diferentes tipos de modelo de DT têm se mostrado adequados para o estudo das bases neurobiológicas de processos neurodegenerativos. No entanto, até o presente, poucos estudos de DT têm sido conduzidos utilizando culturas organotípicas, e todos eles foram realizados em culturas de cerebelo. Não existem estudos das consequências da DT sobre parâmetros bioquímicos, morfológicos e imunológicos utilizando cultura organotípica de hipocampo.

- Os modelos *in vivo* permitem um estudo de déficits cognitivos induzidos pela DT e suas relações com alterações neurobiológicas detectadas *post mortem*. Por outro lado, em esses estudos fica mais difícil acompanhar as etapas do mecanismo molecular em uma região cerebral específica durante as diferentes fases do episódio de DT. Os estudos *in vitro* são importantes no intuito de analisar o que acontece com determinada população celular quando submetida a um processo de DT, mas não permitem analisar as inter-relações entre diversos tipos celulares. A cultura organotípica permite o isolamento do tecido de interesse e a preservação da sua citoarquitetura, assim como a manutenção de todos os tipos celulares e as suas interconexões e, portanto, pode ajudar a desvendar algumas das modificações bioquímicas em células neuronais e da glia, contribuindo para o entendimento das inter-relações entre os diferentes tipos celulares e seus distintos papéis durante um processo de neurodegeneração induzido pela DT.

- Os estudos dos efeitos na DT utilizando o modelo de COH podem contribuir para esclarecer a ocorrência ou não de um processo de morte celular envolvido na fisiopatologia da DT no hipocampo, como também a dinâmica desse processo em fases distintas do processo. Ou seja, permitem conhecer a cinética de diferentes processos afetados pela DT. O desenvolvimento de uma curva de tempo dos efeitos da DT é importante para a compreensão dos mecanismos associados ao processo de neurodegeneração.

- Uma grande vantagem do modelo de COH é que os desenhos experimentais permitem o uso de um número menor de animais necessários para testar hipóteses de interesse na área de neurociências, tanto no campo de mecanismos moleculares neurobiológicos (bioquímicos e morfológicos) como neurofarmacológicos e neuroeletrofisiológicos.

- Considerando o papel do BDNF como fator neurotrófico de diferentes células de sub-regiões do hipocampo é importante a sua análise, já que é uma medida da neuroplasticidade e da capacidade neuroregenerativa do tecido e, em animais, é uma medida da sua capacidade cognitiva. As COH podem servir como modelo preditivo de fatores que podem afetar a capacidade cognitiva mediante a análise deste e outros parâmetros afetados pela exposição à DT. Assim, dados obtidos no modelo de COH podem permitir,

posteriormente, o desenho de experimentos *in vivo* a fim de avaliar aspectos cognitivos e testar as hipóteses levantadas a partir de estudos utilizando COH.

Até onde sabemos, o modelo de COH não tem sido usado em laboratórios da UFMG e a sua implantação permitirá a ampliação de estudos sobre os efeitos da DT e outras condições de interesse no campo das neurociências moleculares, não apenas no LANE, mas também em outros laboratórios de neuroquímica, neuromorfologia, neurofarmacologia e neurofisiologia. As perspectivas do presente trabalho incluem a avaliação das mudanças durante e após um episódio de DT na produção e liberação de neurotransmissores e mediadores bioquímicos, nos potenciais de ação e em fenômenos eletrofisiológicos associados à formação de memórias, como LTP e LTD e, além disto, o estudo do envolvimento de tipos celulares, neuronais e não neuronais, no mecanismo de ação da DT em diferentes estágios do processo.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. OBJETIVO GERAL

Implantação e padronização de culturas organotípica de fatias de hipocampo como modelo para o estudo dos efeitos da DT em etapas distintas do processo, avaliando a viabilidade de diferentes tipos celulares e a produção de fator neurotrófico.

1.8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estabelecer o protocolo para obtenção e manutenção das culturas organotípicas de hipocampo de ratos neonatais.
- 2- Determinar o melhor tempo para estabilização do tecido, verificando o tempo de incubação adequado com soro a fim de diminuir a proliferação de células gliais e favorecer a diferenciação neuronal.
- 3- Padronizar as condições ótimas para estabelecer a DT em modelo de cultura organotípica de hipocampo.
- 4- Avaliar, em diferentes sub-regiões do hipocampo usando COH, os efeitos da DT durante e após um episódio de deficiência, sobre:
 - a. Parâmetros morfológicos e sobre o número de neurônios e oligodendrócitos;
 - b. Morte celular, de forma qualitativa e quantitativa;
 - c. Produção de BDNF nas populações de neurônios e oligodendrócitos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto referente ao presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, número de protocolo: 314/2016, conforme a declaração apresentada (Anexo A). Todos os experimentos envolvendo cuidados e o uso dos animais foram realizados de acordo com as normas *do National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1985)*.

2.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO

O estudo foi realizado no Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LANEC) da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo que as etapas iniciais para estabelecimento das COH foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Neurogenômica do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, sob coordenação do Dr. Roney Santos Coimbra.

2.3. ANIMAIS

Foram utilizados um total de 72 ratos Wistar neonatos de sete dias de idade, obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG). O número médio de animais por experimento foi de aproximadamente seis ($n=6$) e, para cada experimento, o valor específico do “n” está informado abaixo. Os animais foram mantidos no biotério em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum* durante todo o experimento.

2.4. OBTENÇÃO DAS CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE FATIAS DE HIPOCAMPO

A preparação das culturas organotípicas foi realizada em condições rigorosas de assepsia, dentro de uma capela de fluxo laminar desinfetada com álcool 70% e exposta a luz UV por 15 minutos. Durante a eutanásia de cada animal, os ratos restantes foram mantidos em um ambiente separado, junto com a mãe, para evitar o estresse da separação antes do procedimento. Todo o material e as bancadas foram desinfetados usando sabão neutro e álcool 5% entre um animal e outro. A eutanásia foi feita por decapitação sem anestesia, seguindo as normas internacionais citadas acima do *National Research Council (1985)*.

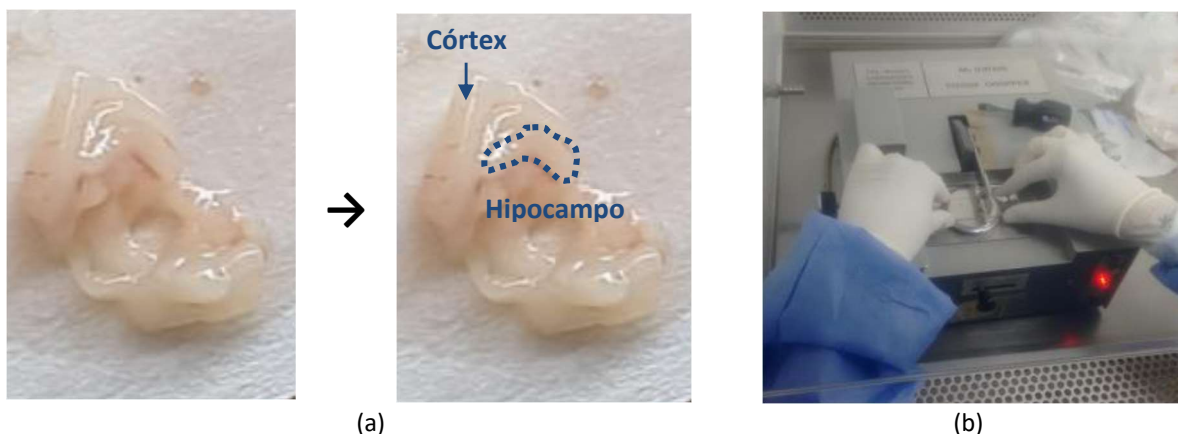


Fig. 4. (a) Foto do cérebro obtido de um rato neonato, indicando em linha pontilhada azul o limite (detalhe no texto) da região dissecada referente à estrutura hipocampal. (b) Foto do “tissue chopper” utilizado para obtenção das fatias de 400 μm de espessura para a preparação da cultura organotípica.

Após a decapitação, o cérebro foi removido e os dois hipocampos foram dissecados (Fig. 4, a) seguindo o protocolo descrito por Gogolla *et al.* (2006). Brevemente, a remoção do cérebro seguiu as seguintes etapas: 1. foi removido o couro cabeludo fazendo uma incisão com tesouras através da linha média da cabeça, começando no pescoço e acabando na linha dos olhos, 2. a pele foi descolada e removida para a região caudal do crânio; 3. as tesouras foram inseridas cuidadosamente no *forâmen magnum* e a calota craniana foi cortada seguindo a linha média do crânio até chegar no nível dos olhos; 4. foi realizada uma incisão entre as duas órbitas pegando o septo nasal; 5. com o auxílio de pinças finas, a calota craniana foi removida, expondo o neocórtex cerebral; 6. introduzindo uma espátula entre o crânio e o encéfalo, este foi removido e colocado em **Meio de Preparação** gelado (vide composição abaixo). Após a remoção do cérebro do crânio, o bulbo olfatório foi removido do encéfalo usando um bisturi, e os dois hemisférios foram separados através de um corte da fissura inter-hemisférica. Assim, a região medial foi exposta em cada hemisfério e, usando uma espátula, foi possível separar o córtex hipocampal do neocórtex, removendo todas as estruturas sub-corticais e o tronco encefálico, e expondo e separando o hipocampo das estruturas adjacentes. Para isso, foi usada uma pequena tesoura de ponta curvada para cortar as conexões do hipocampo com a fimbria e com o córtex entorrinal, e a estrutura foi separada do restante do cérebro usando um leve jato de **Meio de Preparação** gelado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Após a disseção dos dois hipocampos, um de cada hemisfério, esses foram transferidos para um *tissue chopper* (Fig. 4, b; McIlwain *Tissue Chopper* modelo MCT/2, Brinkmann Instruments©, Westbury, NY, USA) e fatias coronais de 400 μm de espessura foram obtidas. Durante todo o procedimento, exceto no momento de dissecar e fatiar os hipocampos no *tissue chopper*, o cérebro e as regiões dissecadas foram mantidos em **Meio de Preparação** gelado composto por 75% de *Minimum Essential Medium* (MEM, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) suplementado com antibiótico (50 mg/L de sulfato de gentamicina), antimicótico (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Anfotericina B), 2 mM de L-glutamina e 25 mM de HEPES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,

EUA) e 25% de solução balanceada de Hanks (SBH, Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil). As fatias obtidas foram transferidas para uma placa de Petri contendo este Meio de Preparação e, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram separadas e escolhidas usando os seguintes critérios: integridade e topografia preservadas (Fourie *et al.*, 2014; Gogolla *et al.*, 2006). Posteriormente, as fatias selecionadas foram transferidas para insertos próprios para culturas organotípicas (Fig. 5, a) com tamanho do poro de 0,4 μm (Millicell Standing insert, Cód. PICMORG50, Millipore®, Billerica, MA, USA). Cada inserto foi posicionado dentro do poço de uma placa com 6 poços (Fig. 5, b) e nutrido por baixo com **Meio de Cultura** composto por 50% de MEM, 25% SBH, 25% soro equino (Bionutrientes Ltda, Barueri, SP, Brasil). Após a obtenção das culturas, a placa foi colocada numa estufa com 5% de CO_2 a 37°C. As culturas foram mantidas na estufa com CO_2 durante todo os experimentos. Em intervalos de 2-3 dias, 50% do meio de incubação de cada poço era trocado para permitir a renovação dos nutrientes e, ao mesmo tempo, manter a metade do meio para não remover os fatores neurotróficos e de crescimento produzidos pelos neurônios e outros tipos celulares. Alternativamente e, como será explicado na seção dos Resultados, o meio foi trocado após uma semana para 75% de meio MEM e 25% de SBH, ou para meio Neurobasal (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) suplementado com B27 (Termofisher Scientific, NY, USA). Os componentes dos meios de cultura utilizados e do B27 podem ser consultados no Anexo B. Antes de cada troca de meio, 10 μL de amostra foram retirados e colocados numa placa de Agar Müller Hinton (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para monitorar e confirmar a ausência de crescimento de bactérias ou fungos.



Fig. 5. (a) Imagem de um inserto Millicell para cultura organotípica. (b) Foto de uma placa de seis poços, mostrando as membranas distribuídas com 6 fatias provenientes de 6 animais em cada uma. Os animais são identificados a partir da posição superior e seguindo o sentido horário.

O dia de preparação das culturas é denominado como tempo 0 (T0) ao longo do presente texto. Os dias que se seguem durante o período de incubação e realização dos experimentos foram referidos em relação a este tempo T0 (*i.e.*, T1 se refere ao primeiro e T2 ao segundo dia após a preparação das culturas e assim sucessivamente). A disposição das fatias sobre as membranas seguiu sempre o mesmo

critério, a fim de se manter a localização das fatias provenientes de um mesmo animal sempre na mesma posição em relação às outras, em todos os poços. Em cada membrana foram colocadas 6 fatias, cada uma obtida de um animal diferente. Ou seja, em cada poço/membrana foram colocadas seis fatias provenientes de seis animais (uma fatia por cada animal). Portanto, todos os animais foram representados em todas as membranas pertencentes a um mesmo experimento, sendo que as fatias produzidas a partir do mesmo animal encontram-se na mesma posição em todas as membranas. Por exemplo, o animal número 1 está localizado na posição correspondente às 12h num relógio, e os animais subsequentes seguem uma disposição no sentido horário, mantendo um distanciamento similar entre elas. A fatia do animal 6 foi colocada no centro da membrana. Podem obter-se até 10-12 fatias de hipocampo por animal, permitindo uma grande diminuição do número de animais necessário por experimento.

2.5. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SUPLEMENTAÇÃO COM SORO EQUINO

Após a obtenção das fatias e transferência para o inserto, as culturas organotípicas devem atravessar um período de recuperação do tecido, diferenciação de novas células e recuperação dos circuitos neurais que foram cortados durante o processo de fatiamento do hipocampo. Esse período é conhecido como **tempo de estabilização**, e a sua duração está bem estabelecida na literatura, sendo de 14-21 dias (Bronzuoli *et al.*, 2018; Sadgrove *et al.*, 2006). Já o tempo de suplementação com soro equino durante esse período é muito variável nos diferentes trabalhos, variando de três dias (Gerlach *et al.*, 2016) até por mais de seis semanas (Stoppini *et al.*, 1991).

Embora o soro equino seja necessário durante parte do tempo de estabilização, já que possui fatores e nutrientes que favorecem a recuperação da fatia após o corte, a presença dele aumenta a proliferação astrocitária e a ativação da micróglia (Czapiga & Colton, 1999). Por outro lado, o soro parece diminuir a capacidade neurogênica das células progenitoras do giro denteado (Raineteau *et al.*, 2004). Dependendo do objetivo do experimento, a manutenção das fatias em soro equino não é o ideal, pois o mesmo possui tiamina na sua composição e, portanto, os experimentos envolvendo DT não poderiam ser conduzidos na presença deste. Assim, os primeiros experimentos realizados foram destinados a determinar o tempo ótimo de suplementação de soro equino na etapa de estabilização.

2.5.1. TEMPO DE SUPLEMENTAÇÃO COM SORO

A fim de determinar o tempo ideal de suplementação com soro durante o período de estabilização das culturas organotípicas, foi avaliado o número de neurônios presente em cada fatia como parâmetro da estabilidade do tecido. Foi utilizado meio suplementado com soro equino (MCS; 50%

MEM, 25% SBH e 25% soro equino), e meio sem soro (MSS; 75% MEM e 25% SBH). O delineamento experimental foi o seguinte (Fig. 6):

- Experimento 1 (E1): de T0 até T7 em incubação com MCS, e de T8 até T24 com MSS,
- Experimento 2 (E2): de T0 até T14 em incubação com MCS e de T15 até T24 com MSS,
- Experimento 3 (E3): utilizando MCS durante os 24 dias de incubação.

Em cada um dos experimentos, as fatias foram fixadas e imunomarcadas com anti-NeuN e DAPI (como será explicado mais adiante) nos tempos T18, T21 e T24, e fotografadas usando o microscópio Nikon Eclipse Ti com um aumento de 10X. Nas análises das fotos obtidas nesta parte do trabalho, foi realizada a contagem do número de neurônios/mm² utilizando o tecido total.

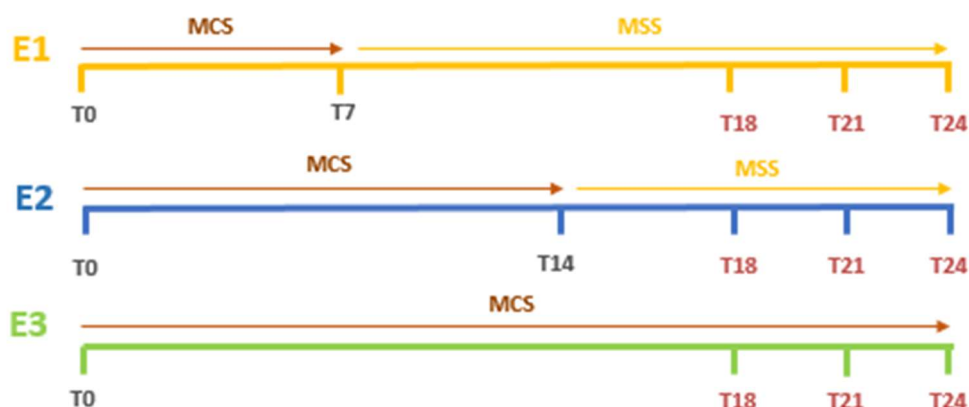


Fig. 6. Esquemas dos desenhos experimentais de três experimentos (E1, E2 e E3) para a determinação do melhor tempo de suplementação com soro durante o período de estabilização das COH. T0 equivale ao dia de início do processo de preparação das COH.

2.5.2. MARCAÇÃO COM 5-BROMO-2'-DEOXIURIDINA (BRDU) PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NOVOS NEURÔNIOS

A 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) é um análogo da timidina (Fig. 7) amplamente usado para a identificação de padrões de divisão celular, já que é incorporado ao DNA durante a fase S da divisão celular (Cavaliere *et al.*, 2016; Leuner *et al.*, 2009). Utiliza-se, então, um anticorpo anti-BrdU para identificar as células que se dividiram e incorporaram essa substância.

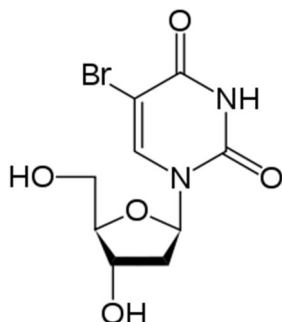


Fig. 7. Estrutura química da substância 5-bromo-2'-deoxiuridina

Foi utilizado o método descrito por Raineteau *et al.* (2004). Brevemente, utilizaram-se duas membranas com fatias provenientes de 6 animais representados em cada uma delas (Fig. 8). A primeira membrana foi cultivada durante sete dias (T0-T7) em MCS, e foi utilizado um pulso de BrdU (Invitrogen™, Life Technologies®, Califórnia, USA) por 2 dias (T2-T4), com uma concentração de 3 µg/mL. No T7, a membrana foi fixada e imunomarcada com anticorpo anti-BrdU conjugado com FITC (1:100, MA1-12686, Invitrogen™) e anti-NeuN conjugado com Cy3 (1:100, MAB377C3, Merck®). O procedimento de imunofluorescência utilizado é similar ao que será descrito posteriormente (Inciso 2.7), modificado com o acréscimo de um tratamento com HCl 1 M (Merck S.A., Cotia, SP, Brasil) por 30 minutos na temperatura ambiente, colocando 1 mL por cima e 1 mL por baixo da membrana a fim de desnaturar o DNA, entre as etapas de permeabilização com Tween 0,05% e o bloqueio com BSA 20%. Um passo opcional é a neutralização com tampão borato 0,1 M (pH=8,5) por meia hora. A segunda membrana foi cultivada por 7 dias em MCS (T0-T7) e, posteriormente, o meio foi trocado por MSC, que foi mantido do 8° ao 14° dia (T8-T14). O pulso de BrdU foi aplicado de T9 até T11. No T14, a membrana foi fixada e marcada com os mesmos anticorpos descritos anteriormente no procedimento para a primeira membrana.

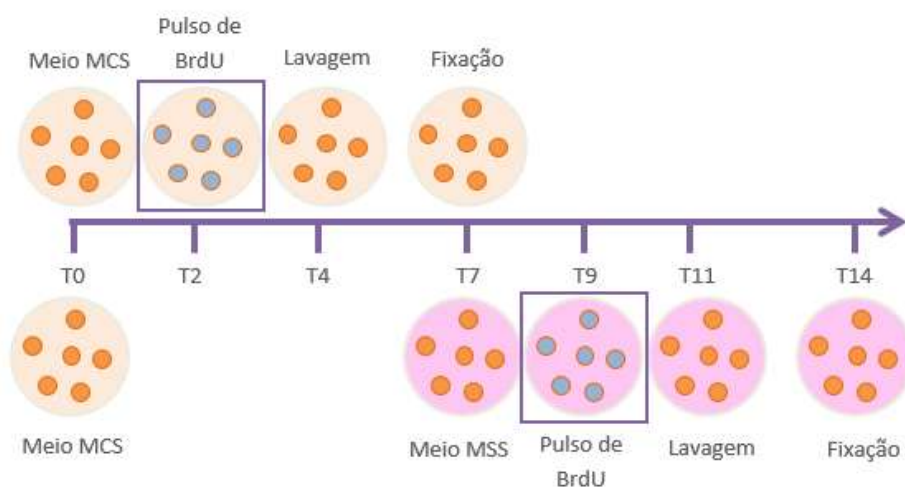


Fig. 8. Esquema ilustrando o desenho experimental da incorporação com BrdU

Após esses procedimentos, as membranas foram fotografadas utilizando um microscópio confocal e analisadas usando o programa ImageJ, como detalhado adiante. Nesta parte do trabalho, foi quantificado o número de neurônios por mm^2 de cada fatia para cada tratamento, e o número de neurônios que incorporaram BrdU por mm^2 (Tabela 1). Em todos os casos, as medições foram realizadas utilizando o tecido total de cada fatia.

2.6. PRODUÇÃO DAS COH EM CONDIÇÃO DEFICIENTE EM TIAMINA

Para conduzir os experimentos em condições de DT, após o período de estabilização, 3 membranas foram incubadas com meio Neurobasal (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) **sem tiamina** suplementado com B27 (**grupo ST**) e 3 outras com meio Neurobasal **normal, com tiamina**, também suplementado com B27 (**grupo CT**). Para isso, o meio de cultura anterior foi removido e os poços foram lavados 3 vezes durante 5 minutos cada vez com meio Neurobasal sem tiamina (grupo ST) ou com tiamina (grupo CT). Após a última lavagem foi colocado 980 μL de meio Neurobasal fresco e suplementado com 20 μL de B27 50X (Fisher Scientific®, Califórnia, USA). As membranas foram expostas por 4, 7 ou 10 dias e, em cada um desses tempos duas membranas (uma CT e outra ST) foram fixadas, imunomarcadas com os anticorpos correspondentes e DAPI e, finalmente, fotografadas. Em cada membrana, 6 animais são representados, sendo os mesmos 6 animais em cada membrana (experimento pareado). Esse modelo repetiu-se para todos os experimentos realizados de exposição a DT (Fig. 9, a).

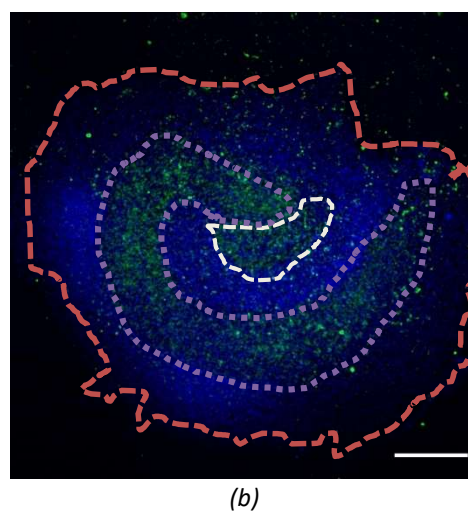
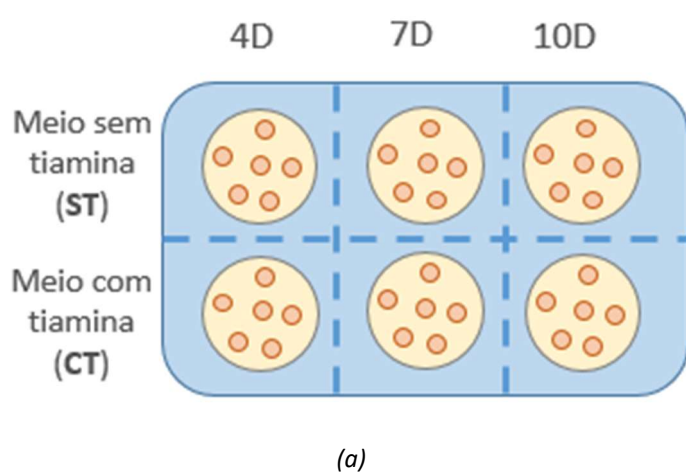


Fig. 9. (a) Delineamento experimental utilizado para os experimentos em condições de DT. Os termos 4D, 7D e 10D representam três tempos de incubação, em dias (D); (b) Imagem representativa de uma fatia do hipocampo mantida em cultura por 21 dias. Em verde estão representados os neurônios marcados com anti-NeuN e, em azul, o núcleo de todas as células marcadas com DAPI. As linhas pontilhadas representam as diferentes áreas analisadas: GD (em branco), CA1-CA3 (em amarelo) e o tecido total (em vermelho). A linha horizontal branca representa 500 μm .

Após a obtenção das fotos no microscópio confocal, o tecido foi dividido em três áreas diferentes, a saber: a sub-região correspondente ao giro denteado (GD), a sub-região CA1-CA3 e o tecido total. As análises subsequentes foram realizadas considerando essas três áreas (Fig. 9, b).

2.7. IMUNOMARCAÇÃO DAS CULTURAS ORGANOTÍPICAS

Para realizar imunomarcção das culturas organotípicas, após o período de incubação especificado em cada experimento, o meio de cultura foi removido e mantido a -80°C para futuras análises bioquímicas. Posteriormente, as membranas foram fixadas adicionando-se 2 mL (1 mL por cima e 1 mL por baixo da membrana) de paraformaldeído 4% gelado (Merck®, Cotia SP, Brasil), diluído em PBS 1X. Após 5 minutos, a membrana foi lavada rapidamente com PBS gelado e tratada com 20% metanol (Êxodo científica, Hortolândia, SP) diluído com água bidestilada a 4°C (1 mL por cima e 1 mL por baixo da membrana), por outros 5 minutos. Em seguida, o inserto foi lavado com PBS gelado e foi tratado com 0,005% Tween® 20 (Sigma Aldrich®, Missouri, USA) diluído com água bidestilada, a fim de permeabilizar o tecido, por 12-18 horas a 4°C . Posteriormente, a membrana foi retirada, lavada com PBS e colocada numa solução 20% de BSA (*Bovine Serum Albumine*, Fisher BioReagents®, New Jersey, USA) em PBS por 4 horas à temperatura ambiente (ou até 3 dias a 4°C) a fim de bloquear possíveis sítios de ligação inespecíficos para o anticorpo. Após este tratamento, a membrana foi lavada rapidamente com PBS a 4°C , retirada do seu suporte plástico usando um bisturi e tratada com 70 μL de solução contendo os anticorpos primários correspondentes em 10% BSA durante 4 horas à temperatura ambiente (ou 12 horas a 4°C). As membranas foram lavadas com BSA 5% e foi repetido o procedimento com os anticorpos secundários. Após uma nova lavagem, a membrana foi tratada com 4',6-Diamino-2-Fenilindol (DAPI, Biolegend®, San Diego, CA, USA) por 30 minutos, antes de lavar e realizar a montagem das lâminas usando Prolong™ (Invitrogen™, Life Technologies®, Califórnia, USA). Os anticorpos primários utilizados foram anti-NeuN (1:100, Cód. MAB377, Merck®) para marcar neurônio ou anti-galactocerebrósido (1:100, MAB342, Merck®) para marcar oligodendrócitos junto com o anticorpo secundário *anti-mouse* IgG – FITC *antibody* (1:32, F9137, Sigma Aldrich®) para os dois primários, e anti-BDNF (1:100, SAB2108004, Sigma Aldrich®) junto com *Mouse anti-rabbit* IgG- CFL 594 (1:100, sc-516250, Santa Cruz Biotechnology, Inc) como secundário (Ver Tabela 1). As membranas assim obtidas foram posteriormente fotografadas e analisadas, a fim de realizar a contagem de células marcadas com cada anticorpo, utilizando um microscópio confocal, como explicado abaixo.

Nem sempre todas as fatias dos animais de todas as membranas (6 animais por membrana) puderam ser consideradas na análise dos dados. Isto porque em alguns casos a morfologia do hipocampo era perdida durante o processamento ou, às vezes, não houve uma boa marcação com anticorpos fluorescentes e esses animais eram então descartados e não incluídos nas análises

quantitativas. Por isso, o número dos animais utilizados (tamanho da amostra) em cada experimento foi variado e encontra-se informado na legenda de cada gráfico.

2.8. MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDIO

Foi utilizado o método de incorporação de iodeto de propídio (IP) a fim de determinar a presença de neurodegeneração nas culturas. IP (Fig. 10) é um agente intercalante entre pares de bases que não consegue atravessar a membrana plasmática intacta de uma célula viva, mas consegue atravessá-la se ela estiver danificada, como acontece em células não viáveis ou em processo de degeneração. Uma vez dentro da célula, o IP se une à fita dupla de DNA, se intercalando entre os pares de bases e emite fluorescência a 617 nm. O IP consegue entrar dentro das células em processo necrótico, mas é excluído das apoptóticas e, portanto, permite distinguir entre esses dois tipos de morte celular (Crowley *et al.*, 2016). Porém, o IP pode atravessar a membrana de células apoptóticas tardias.

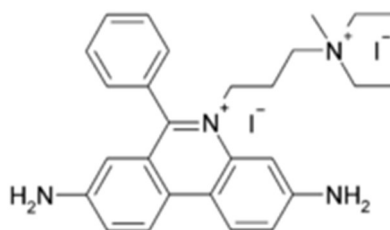


Fig. 10. Estrutura da substância iodeto de propídio que atua através da intercalação entre pares de bases de DNA.

A marcação com IP foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Brana *et al.*, (2002). Brevemente, as culturas foram incubadas com 5 µg/ml IP (S7109, Millipore-Merck) por 1 h na estufa CO₂. Após este tempo, o meio de cultura foi retirado, as membranas lavadas com PBS e fixadas para continuar o processo de imunofluorescência com o anticorpo anti-NeuN (1:100, Cód. MAB377, Merck®) como explicado anteriormente (Inciso 2.7). Após a imunofluorescência, as membranas foram fotografadas e analisadas usando um microscópio confocal, como explicado abaixo, a fim de determinar o número de neurônios que incorporaram IP (Tabela 1).

2.9. CONTAGEM DE CÉLULAS E DUPLA MARCAÇÃO VISUALIZADA E ANALISADA EM MICROSCÓPIO CONFOCAL

Todas as lâminas obtidas nos procedimentos anteriormente explicados (marcação com IP, marcação com BrdU ou imunofluorescência com diversos anticorpos) foram fotografadas e analisadas usando microscópio confocal a fim de realizar a contagem de células em cada um dos respectivos canais. Foi usado um microscópio confocal Nikon Eclipse Ti equipado com lasers de comprimentos de

ondas de 405, 488 e 561 nm. O aumento utilizado para a obtenção das fotos foi de 4X. Alternativamente, foi utilizado o microscópio Zeiss LSM 880, equipado com lasers de comprimentos de ondas de 405, 458, 488 e 514, HeNe1 de 543 nm e HeNe2 de 633 nm usando um aumento de 10X. Posteriormente, as imagens foram convertidas ao formato *.tiff e analisadas usando o programa ImageJ (NIH, Maryland, USA). O hipocampo foi subdividido nas regiões GD e CA1-CA3, e as áreas de cada sub-região foram selecionadas usando a ferramenta “Free Hand”. As imagens foram convertidas a 8 bits e foi subtraído o *background*. Para realizar a contagem das células (neurônios ou oligodendrócitos), foi escolhido o canal (FITC ou Cy3, dependendo do experimento) do fluoróforo pertencente à marcação de cada tipo celular no programa ImageJ e as imagens foram convertidas a binária usando *Threshold* no método *Moments*. Para contar as partículas detectadas na imagem, foi selecionado *Analyze particles*, escolhendo como critério as partículas com pelo menos 10 μm^2 de área (máximo em infinito), para evitar que o ruído da marcação fosse contado como uma partícula. O tecido foi analisado usando cada uma das áreas correspondentes ao GD, às sub-regiões CA1-CA3 e à área total do tecido, e o número de partículas positivas foi dividido pelos valores de cada área (número de células por mm^2). Se no experimento houvesse uma segunda marcação, o protocolo continua com a contagem de células que apresentam marcação nos dois canais. Para isso, uma vez determinado o número de células presentes, foi utilizada esta contagem como máscara para analisar a imagem no canal da segunda marcação, contando unicamente as células que apresentam dupla marcação. Ou seja, foi realizada a contagem das células que apresentavam marcação tanto verde como vermelha concomitantemente. Novamente, o valor obtido de células duplamente marcadas foi dividido pela área, obtendo a densidade celular em cada uma das regiões.

Tabela 1: Resumo dos experimentos de imunofluorescência analisados no microscópio confocal

Experimento	Canal FITC	Canal Cy3
Estabelecimento das condições ótimas para a manutenção da COH	----	Anti-NeuN
Diferenciação de célula progenitora para neurônio	Anti-BrdU	Anti-NeuN
Obtenção das condições necessárias para o estabelecimento das COH como modelo para o estudo da DT	----	Anti-NeuN
Número de neurônios e efeito degenerativo após episódio de DT	Anti-NeuN	IP
Níveis de BDNF por neurônios após episódio de DT	Anti-NeuN	Anti-BDNF
Níveis de BDNF por oligodendrócitos após episódio de DT	Anti-GalC	Anti-BDNF

Assim, foi obtida a densidade de células (neurônios ou oligodendrócitos) presentes em cada fatia, assim como a densidade destas células que apresentam dupla marcação (caso haja uma segunda

marcação) usando diferentes combinações dos anticorpos (anti-NeuN, anti-GalC, anti-BDNF) ou dos tratamentos (BrdU, IP) segundo a pergunta formulada em cada caso (Tabela 1).

2.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados encontram-se expressos como média \pm desvio padrão (indicados com a abreviatura do termo em inglês, SD: *Standard Deviation*). A distribuição de todos os dados obtidos foi avaliada usando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

No caso de comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* para amostras pareadas no caso de grupos não independentes (p. ex. na análise da incorporação de BrdU em neurônios). No caso de grupos não independentes que não passaram o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, realizamos o teste de Wilcoxon para amostras pareadas (p.ex. no caso da análise da porcentagem de células NeuN⁺/BrdU⁺).

Para comparações ao longo do tempo usando experimentos independentes, foi utilizado o teste *One-Way* ANOVA seguido do pós-teste de Sidak (p.ex. na análise da estabilidade do tecido ao longo do tempo) e foi usado *One-Way* ANOVA com efeitos mistos para medidas repetidas (*RM*, do termo em inglês: *Repeated Measures*) para amostras pareadas (análise dos mesmos animais em todos os tempos) como por exemplo, na análise da estabilidade da cultura no meio Neurobasal.

Two-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Sidak, foram usadas no caso de experimentos independentes (p. ex. na contagem de neurônios nas diferentes regiões nas mesmas condições), usando alternativamente o pós-teste Tukey no caso da análise da suplementação com soro equino, na primeira parte do trabalho. *RM Two-Way* ANOVA com efeitos mistos seguido pelo pós-teste de Sidak foi utilizado no caso de amostras pareadas, mas sem todos os valores disponíveis para cada fatia (p. ex. na análise do tamanho das diferentes regiões do tecido nas culturas incubadas na presença ou não de tiamina).

Todas as análises de correlação linear entre dois parâmetros para amostras com tamanho relativamente pequeno (entre 5 e 18 animais) foram realizadas usando o Teste de Pearsons, e as comparações entre coeficientes de correlações foram feitas através da ferramenta COCOR (Diedenhofen & Musch, 2015) aplicando-se o teste de Hitner (2003).

PARTE 1

Padronização das condições ótimas para produção e manutenção de culturas organotípicas de hipocampo

3. RESULTADOS

Conforme mencionado na seção de Métodos, para os experimentos realizados nesta primeira parte, não foram utilizadas as delimitações das regiões conforme explicado anteriormente (GD, CA1-CA3 e tecido total), ou seja, todas as análises foram realizadas no tecido total.

3.1. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SUPLEMENTAÇÃO COM SORO EQUINO

3.1.1. TEMPO DE SUPLEMENTAÇÃO COM SORO

O resultado obtido nos três experimentos descritos em Métodos encontra-se na Fig. 11. O desenho experimental pode encontrar-se na Fig. 6, na seção de Materiais e Métodos. Neste gráfico, pode-se observar que a contagem do número de neurônios no E1 (com suplementação de soro durante uma única semana) teve o número de neurônios mais estável a longo prazo e a menor variabilidade individual.

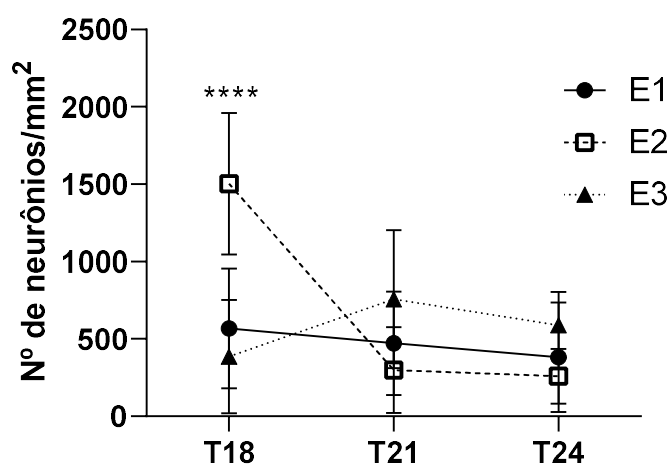


Fig. 11. Dados correspondentes à densidade de neurônios por mm^2 (Média \pm SD), após incubação das COH por diferentes período de tempos em meio com soro equino (MCS) seguidos por incubação em meio sem soro (MSS) perfazendo um tempo de incubação total de 24 dias. E1, E2 e E3 = Experimentos, sendo E1=7 dias no MCS + 17 dias no MSS; E2=14 dias no MCS + 10 dias MSS; E3=24 dias no MCS. Os tempos T18, T21 e T24, na abcissa, correspondem aos tempos nos quais as contagens foram realizadas para os três experimentos.

**** $p < 0,0001$. COH: Cultura Organotípica do Hipocampo.

Two-Way ANOVA, com pós-teste de Tukey, mostrou efeito do tempo ($F_{(2,57)}=8,09$; $p=0,001$) e interação significativa entre os efeitos do tratamento e do tempo ($F_{(4,57)}=8,70$; $p < 0,0001$), mas não foi observado efeito do tratamento (tempo de exposição ao soro) ($F_{(2,57)}=2,35$; $p < 0,104$). O pós-teste mostrou que no ponto T18, a densidade neuronal em E2 é diferente da de E1 ($p < 0,0001$) e de E3

($p < 0,0001$). Após 18 dias de incubação (T18), no E2 a cultura está há 4 dias sendo incubada sem soro, e se observa um aumento da densidade do número de neurônios, que estabiliza no T21 (7 dias após a remoção do soro equino), portanto 7 dias após a retirada do soro parecem ser suficientes para que o tecido atinja a estabilidade. A condição experimental na qual a COH mostrou menor variabilidade nos tempos avaliados (T18, T21 e T24) e mais estabilidade no número de neurônios foi a condição usada em E1: 7 dias no MCS, seguidos de 17 dias no MSS.

3.1.2. PRODUÇÃO DE NOVOS NEURÔNIOS NA PRESENÇA OU NÃO DE SORO EQUINO

Foi observado em outros trabalhos que o soro tem um efeito neurosupressor e pode diminuir a neurogênese (Raineteau *et al.*, 2004). Portanto, o objetivo deste experimento foi avaliar se existia uma diferença na taxa de diferenciação de neurônios no meio suplementado com soro equino em comparação com o meio sem soro. Foi realizada a contagem de células possuindo dupla marcação, ou seja, neurônios que incorporaram BrdU (Fig. 12). Como o neurônio é uma célula incapaz de se dividir, ela deve provir da diferenciação de uma célula progenitora, a qual é capaz de atravessar um processo de divisão celular. Portanto, as células duplamente marcadas, NeuN⁺/BrdU⁺, representam neurônios recentemente diferenciados.

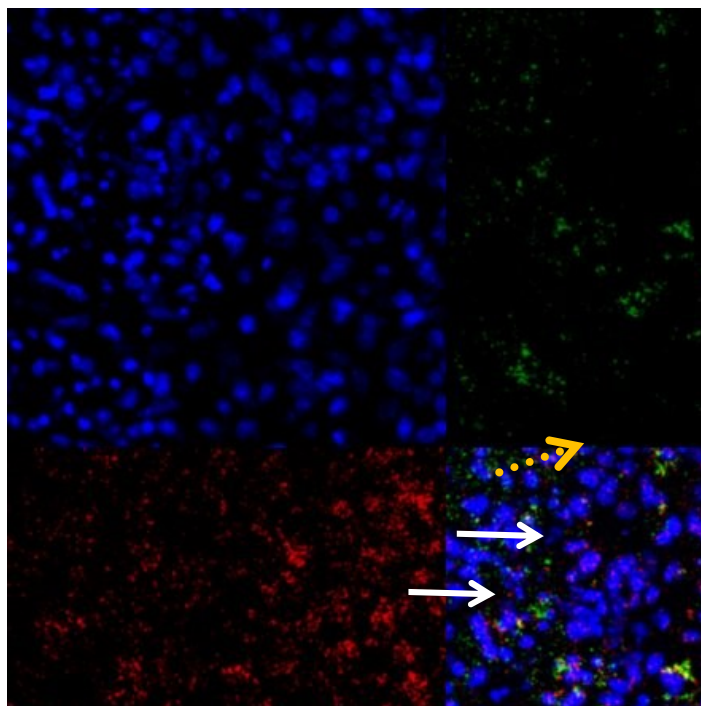


Fig. 12. Imagem representativa mostrando acima à esquerda a marcação com DAPI (núcleo de todas as células, azul), acima à direita a marcação com BrdU (verde), embaixo à esquerda a marcação com NeuN (vermelho) e embaixo à direita a tripla marcação. As células NeuN⁺ são neurônios (em vermelho, seta amarela com linha pontilhada) e as células NeuN⁺/BrdU⁺ são novos neurônios recentemente produzidos a partir de células progenitoras (setas brancas). A barra horizontal branca representa 200 μ m.

Para este experimento, como explicado na seção de Materiais e Métodos (Inciso 2.5.2), duas membranas foram incubadas por sete dias usando meio MEM suplementado com soro equino (MCS). Durante este tempo, uma membrana recebeu o pulso de BrdU e posteriormente foi fixada e imunomarcada e analisada. A outra membrana foi incubada por mais 7 dias com meio de cultura sem soro equino (MSS). Durante este tempo, recebeu o pulso de BrdU e posteriormente foi fixada, imunomarcada e analisada. Usando teste t para amostras pareadas, encontramos um aumento significativo ($t=3,93$; $p=0,011$) na densidade de neurônios após uma semana da retirada do soro (Fig. 13, a). Usando o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas, observamos um aumento significativo da porcentagem de células NeuN⁺/BrdU⁺ ($W=21$; $p=0,031$) e podemos verificar que a porcentagem original de células marcadas com BrdU é praticamente zero (Fig. 13, b). Assim, podemos supor que a presença do soro é inibidora da neurogênese, e que após a sua remoção, os processos de diferenciação são reativados.

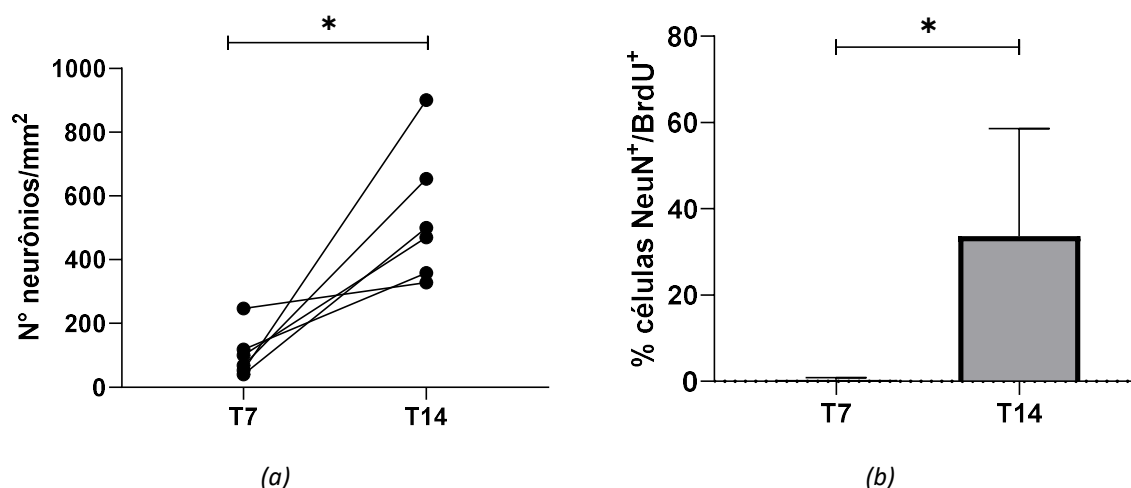


Fig. 13. Dados quantitativos da diferenciação de neurônios após incubação em MCS por 7 dias (T7), seguidos de um período de mais 7 dias (T14) em MSS; (a) número de neurônios por mm² para cada animal no T7 e no T14; (b) porcentagem de células recém diferenciadas (NeuN⁺/BrdU⁺) em T7 e T14. A linha vertical sobre a barra em (b) representa o desvio padrão. * $p<0,05$; $n=6$ para cada tratamento. MCS: Meio Com Soro e MSS: Meio Sem Soro.

3.2. ESTABILIDADE DA CULTURA AO LONGO DO TEMPO

Nos incisos anteriores, foi determinado que 7 dias é o tempo necessário após a retirada do soro para a estabilização da contagem de neurônios na cultura. Também foi confirmado que a manutenção do soro equino durante todo período de incubação inibe a diferenciação das células progenitoras em neurônios e parece favorecer a formação da cicatriz glial, estimulando a proliferação de células não neuronais. Baseados nestes achados, determinamos um tempo ótimo de **14 dias para estabilização da cultura, sendo os primeiros 7 dias na presença do soro equino e os últimos 7 na ausência deste.**

Como os experimentos para se estudar os efeitos da DT teriam uma duração de 10 dias após o período de estabilização (ver Discussão, Parte 2), decidimos estudar a estabilidade da cultura, usando o número de neurônios por mm^2 como parâmetro, por um período total de 24 dias. Desses 24 dias, 14 são correspondentes à estabilização da COH e 10 correspondentes ao tempo necessário para os experimentos posteriores, planejados para estudar os efeitos da DT. Assim, foi realizado um experimento usando 5 membranas, com 6 animais por membrana, incubadas durante 7 dias com MCS e 17 dias com MSS. Ao longo do experimento, após diferentes períodos (Tempos: T7, T14, T18, T21 e T24), uma membrana foi retirada, fixada e imunomarcada com anticorpo anti-NeuN e DAPI. No final do experimento, as membranas foram fotografadas usando um microscópio confocal e foi realizada a contagem de neurônios em cada fatia. Os dados obtidos encontram-se na Fig. 14.

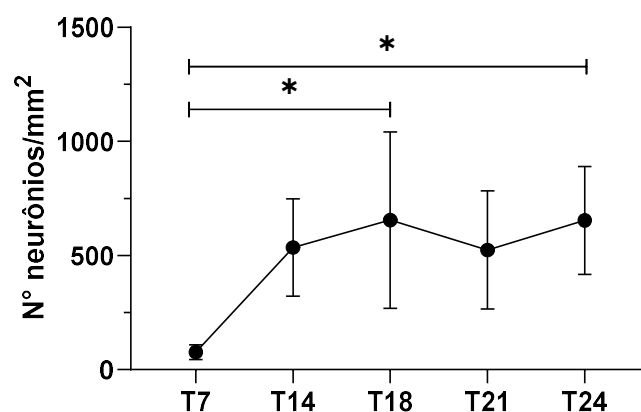


Fig. 14. Dados da avaliação da estabilidade da cultura através da média \pm SD do número de neurônios por mm^2 nas fatias do hipocampo, após 7 dias de incubação com MCS seguidos de 7, 11, 14 e 17 dias em MSS. $n=6$ para cada tratamento, $*p<0,05$. MCS: Meio Com Soro e MSS: Meio Sem Soro.

One-Way Anova mostrou que existe efeito significativo do fator tempo ($F_{(4,24)}=4,51$; $p=0,007$). Posteriormente, o pós-teste de Sidak permitiu identificar que a diferença está no número de neurônios entre T7 e T18 ($p=0,011$) e T24 ($p=0,011$). Interessante destacar que não houve diferença entre os tempos T14, T18, T21 e T24, o que permite inferir que após 7 dias de retirada do soro, a cultura se mantém estável por, pelo menos, 17 dias. **Assim, concluímos que um período de 14 dias de estabilização, sendo os primeiros 7 dias com suplementação com soro e os seguintes 7 dias sem soro, é tempo suficiente para a condução de experimentos por mais 10 dias, sem perda da estabilidade nem envelhecimento das COH.**

No entanto, apesar destas condições serem adequadas para manter a estabilidade e o número de neurônios, ao longo dos experimentos observou-se uma dificuldade na visualização, no microscópio confocal, das estruturas características das sub-regiões do hipocampo, como o GD e as sub-regiões CA1-CA3. Ou seja, mesmo que perdas eventuais de neurônios não fossem significativas, poderiam ser

suficientes para afetar uma boa visualização das sub-regiões. Além disso, a presença de glutamato e outras substâncias excitatórias no meio MEM (ver composição do meio no Anexo B) seria um impedimento na realização de experimentos posteriores com objetivos de se estudar as consequências de determinados insultos, como os efeitos da DT sobre os níveis de neurotransmissores. Vários autores utilizam meio MEM suplementado com soro equino durante um período do tempo de estabilização e, posteriormente, esse meio é trocado para Meio Neurobasal suplementado com B27 (N-B27) (Bernardino, 2005; Gerlach *et al.*, 2016; Noraberg *et al.*, 1999; Tyler & Pozzo-Miller, 2001). O uso do N-B27 resulta numa menor taxa de morte de células granulares no GD e permite uma quantificação mais consistente ao longo do tempo (Sadgrove *et al.*, 2006) e, além disto, existe evidências de que a etapa de suplementação com soro N-B27 permite a sobrevivência e crescimento a longo prazo dos neurônios (Bernardino, 2005; Muller *et al.*, 2001). Portanto, consideramos interessante também estudar a estabilidade das culturas após a troca do MCS para N-B27. Assim, foi realizado um experimento com 3 membranas contendo os mesmos animais representados em cada uma (experimento pareado) e foi analisado o número de neurônios em cada fatia como parâmetro da estabilidade das culturas. Em cada tempo (T18, T21 e T24) uma membrana foi fixada, imunomarcada com anti-NeuN (neurônios) e DAPI (núcleos de todas as células) e fotografada no microscópio confocal e, posteriormente, quantificada.

RM One-Way ANOVA com efeitos mistos não mostrou efeito significativo dos tempos ($F_{(1,7;7,7)}=0,43$; $p=0,636$), demonstrando que o número de neurônios se mantém constante ao longo do tempo na incubação com N-B27 (Fig. 15, a). Foi observado uma variabilidade individual menor no caso das culturas incubadas no N-B27, portanto quisemos determinar se existia uma diferença entre os dois tratamentos, a saber: 7 dias com MCS e 17 dias com MSS, ou 7 dias com MCS e 17 dias com N-B27 (Fig. 15, b). Para isso, analisamos a estabilidade das culturas nos dois tratamentos nos tempos T18, T21 e T24. *Two-Way ANOVA* não mostrou efeito do tratamento ($F_{(1,28)}=3,94$; $p=0,057$), e nem interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(2,28)}=0,2603$; $p=0,773$), indicando que os dois tratamentos são equivalentes em termos de efeito sobre o número de neurônios.

(a)

(b)

Fig. 15. Dados da avaliação da estabilidade da cultura através do número de neurônios (Media \pm SD) nos tempos T18, T21 e T24 nas culturas incubadas com (a) MCS por 7 dias e N-B27 por 11, 14 e 17 dias (círculo cheio) e em (b) os dados apresentados no painel (a) junto com os dados obtidos na condição das culturas incubadas com MCS por uma semana e MSS por 11, 14 e 17 dias (círculo vazio). $n=6$ para todos os tempos e tratamentos, exceto para T18, na condição N-B27, no qual o valor de $n=5$. MCS: Meio Com Soro, MSS: Meio Sem Soro, N-B27: Meio Neurobasal suplementado com B-27

No entanto, apesar que não observamos diferença entre os dois meios na estabilidade das culturas, considerando os dados obtidos por outros autores em relação a preservação da estrutura do GD, como mencionados acima, optamos por manter as condições de incubação da primeira semana usando MCS, mas na segunda semana de estabilização passamos a usar o meio N-B27,

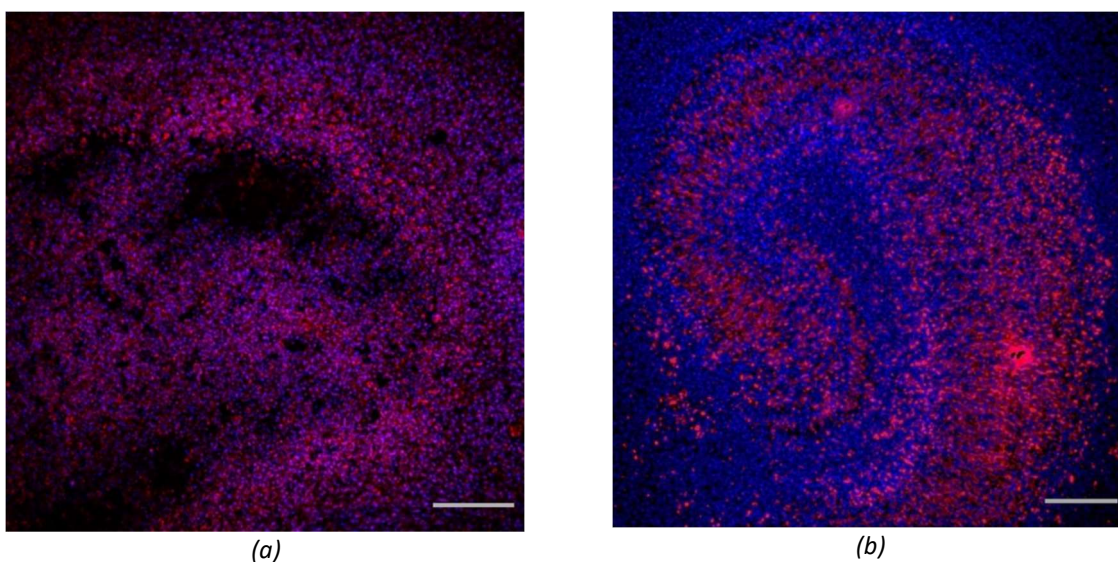


Fig. 16. Imagens obtidas após incubação com MCS+MSS, painel (a) e com MCS+N-B27, painel (b). Em vermelho estão representados os neurônios (marcados com anti-NeuN) e em azul, o DAPI, que marca o núcleo de todos os tipos celulares. As linhas horizontais cinza representam 200 μ m.

As vantagens de incubar as COH com meio N-B27 foram evidentes durante o processo de análise das fotos no microscópio confocal (Fig. 16, b), já que as estruturas que antes eram difíceis de visualizar (GD, CA1-CA3) foram facilmente identificadas em todas as fatias analisadas. Além disso, como foi relatado, a ausência de neurotransmissores excitatórios na composição deste médio abre um leque de possibilidades para futuras análises bioquímicas de liberação de neurotransmissores pelo tecido como resposta a diferentes estímulos ou insultos. E, finalmente, a variabilidade individual observada no tratamento com meio MEM foi reduzida usando o meio N-B27, aumentando a reprodutibilidade do método e diminuindo a possibilidade de eventuais diferenças serem mascaradas devido ao desvio padrão (maior variabilidade) das amostras.

4. DISCUSSÃO

Os objetivos desta parte do trabalho foram alcançados, considerando que foi estabelecido um sistema controlado para conservação da citoarquitetura das COH e reprodutível nas fases de disseção das fatias e estabelecimento das condições ótimas de manutenção da cultura. Esse último passo foi crítico, já que o tempo de suplementação com soro altera notoriamente as características das fatias ao longo do tempo, conforme discutido a seguir.

Nas culturas organotípicas, é utilizado preferencialmente soro equino como suplemento do meio, já que possui uma maior concentração de proteínas e menor de oligoelementos que soros obtidos de outros animais. Essa condição é amplamente utilizada para culturas de neurônios porque provê hormônios, fatores de crescimento e outras substâncias benéficas para o crescimento e a sobrevivência das células, e possui concentrações menores de glutamato, neurotransmissor excitatório que pode resultar tóxico em grandes quantidades (Ye & Sontheimer, 1998). Foi demonstrado por vários autores que o soro é necessário nas primeiras etapas de estabilização da cultura para promover a recuperação do trauma mecânico no processo de obtenção das fatias e melhorar a sobrevivência dos diferentes tipos celulares (Bernardino, 2005; Muller *et al.*, 2001). Porém, a inclusão de soro a longo prazo parece ter vários efeitos secundários não desejados. Por uma parte, parece alterar a morfologia e as propriedades funcionais de células como astrócitos e micróglia (Coltman & Ide, 1996; Fujita *et al.*, 1996), e contribui com a ativação e a migração da micróglia para fora da área da fatia, formando a cicatriz glial (Czapiga & Colton, 1999). Também, foi observado por outros autores que o soro diminui a capacidade neurogênica das células progenitoras (Raineteau *et al.*, 2004), e que a incubação com soro por longos períodos pode levar à perda da morfologia de algumas estruturas devido à migração inespecífica das células da camada granular do GD (Kamada *et al.*, 2004; Sadgrove *et al.*, 2006). Além disto, a presença de soro no meio de cultura afeta a resposta celular ao BDNF, modificando as ações desta e outras neurotrofinas no tecido (Chapleau *et al.*, 2008; Morrison & Mason, 1998), além de possuir outros fatores tróficos na sua composição. Harris *et al.* (2003) mostraram, usando COH, que a presença do soro produz uma maior neurotoxicidade em culturas submetidas a um insulto, comparadas com culturas incubadas em um meio livre de soro (Harris *et al.*, 2003). Este grupo usou a neurotoxicidade produzida pela abstinência de etanol em culturas expostas por 10 dias a meio contendo essa substância. Além destas desvantagens, o soro também não é um componente extracelular normal no parênquima do cérebro e não tem uma concentração definida de componentes, portanto não pode ser utilizado no decorrer dos experimentos, já que acrescentaria variáveis desconhecidas. Como também já foi discutido, o soro possui tiamina na sua composição, tornando inviável a sua utilização durante experimentos desenhados para se estudar a DT.

Para resolver as questões mencionadas acima, decidimos incubar as fatias durante tempos variáveis em meio suplementado com soro (delineamentos experimentais E1, E2 e E3, Fig. 6 e 10) com o intuito de determinarmos um tempo de incubação ótimo na presença de soro. Analisamos a estabilidade das culturas nos tempos T18, T21 e T24 por serem tempos adequados para o desenvolvimento de experimentos subsequentes, como se encontra detalhado na seção “Discussão” da Parte 2. Observamos no E2 que, após 4 dias da retirada do soro (T18), as culturas apresentam um aumento na proliferação neuronal e, 7 dias após a retirada do soro (T21) as COH se estabilizam em relação à densidade de neurônios, atingindo um valor similar ao obtido nos outros dois experimentos (E1, com soro apenas nos primeiros 7 dias e E3, com soro por 24 dias). Nos experimentos E1 e E3 não avaliamos a densidade de neurônios após 4 dias sem soro (ou seja, no T11 e T28), portanto não podemos afirmar que esse fenômeno de aumento do número de neurônios a partir do 4º dia sem soro acontece ou não nas condições E1 e E3. Porém, considerando o resultado do E2 e a observação que na curva obtida no experimento E1 (incubação na presença de soro, MCS, apenas nos primeiros 7 dias, portanto no primeiro tempo medido, T18, a cultura estaria há 11 dias sem soro) o número de neurônios é constante ao longo do tempo, podemos concluir que 7 dias após a retirada do soro são suficientes para a estabilização da cultura. No caso do experimento E3, que foi incubado por 24 dias na presença de soro equino, observa-se também uma densidade estável de neurônios, embora a variabilidade individual seja maior. Essa estabilidade em relação à densidade de neurônios verificada depois de 24 dias de incubação em meio com soro, não significa uma estabilidade em relação à outros parâmetros, como por exemplo, migração de neurônios para outras camadas, como observado por outros autores (Kamada *et al.*, 2004; Sadgrove *et al.*, 2006) ou alterações nas propriedades funcionais de células como astrócitos e micróglia (Fujita *et al.*, 1996). Neste caso, não se observaria uma mudança na densidade de neurônios, mas sim uma alteração da estrutura das sub-regiões. Para determinar se essas mudanças existiram no E3, deveríamos realizar um estudo morfológico das fatias. Porém, como será detalhado mais adiante, a incubação em meio MEM produziu a perda da estrutura típica do hipocampo, dificultando essas observações.

Com os dados obtidos nesta primeira parte do trabalho chegamos à conclusão de que 7 dias sem soro após 7 dias na presença de soro são períodos de incubação suficientes para se atingir a estabilidade da cultura em relação à densidade de neurônios. O incremento observado no número de neurônios após 4 dias de incubação em meio sem soro, depois de uma semana com soro, pode ser a consequência da restauração da neurogenicidade nas culturas, que após um maior período de incubação na presença de meio sem soro, poderia gradativamente ir se re-estabilizando (Raineteau *et al.*, 2004). Também, já foi observado que a presença do soro em culturas primárias de neurônios, favorece a proliferação de glia que possa estar contaminando as amostras (Brewer *et al.*, 1993).

Usando culturas de células progenitoras, foi observado que o soro, em concentrações maiores que 20%, impede a proliferação e diferenciação destas células (Fedoroff & Hall, 1979). Assim, o passo seguinte foi o estudo da produção de novos neurônios a partir de células progenitoras, avaliado pela incorporação de BrdU.

A neurogênese é um processo importante a ser estudado já que, quando acontece no GD, parece ter relação com o aprendizado dependente do hipocampo e a modulação das emoções e ansiedade (Leuner *et al.*, 2006; Revest *et al.*, 2009; Sahay & Hen, 2007). Foi observado que danos no GD durante o desenvolvimento do cérebro têm efeitos profundos na capacidade de neuroregeneração e no aprendizado dependente do hipocampo nos anos subsequentes (Sadgrove *et al.*, 2006). As culturas organotípicas parecem ter capacidades de neuroregeneração por períodos prolongados (Kamada *et al.*, 2004; H. Lee *et al.*, 2012), oferecendo um microambiente adequado, com elementos neurais e não neurais necessários para o processo de diferenciação. Portanto, este sistema permite o estudo de proliferação celular e diferenciação de neurônios jovens sob condições experimentais seletivas. Como mencionado, a incorporação de BrdU permite a avaliação destes processos de diferenciação neural, já que os neurônios não possuem a capacidade de se dividir, e devem ser gerados a partir de células progenitoras. Assim, uma célula que incorporou BrdU mas apresenta também marcadores próprios de neurônios é um neurônio jovem recém diferenciado. No presente trabalho, não foi observada incorporação de BrdU em neurônios na primeira semana incubando as fatias com meio suplementado com soro equino, e na segunda semana, após a retirada do soro, foi observada a incorporação desta substância em neurônios. Deste modo, podemos concluir que, na presença de soro equino, a diferenciação de células progenitoras está inibida, enquanto que, ao retirar o soro, a produção de neurônios é recuperada. Esses resultados são consistentes com as observações feitas por Raineteau *et al.* (2004), que notaram um desenvolvimento normal do GD em condições de incubação livres de soro, com neurogênese espontânea e distribuição de neurônios jovens similares ao observado *in vivo*, mas uma rápida e completa inibição da incorporação de BrdU quando o soro é acrescentado na cultura. Esses autores sugerem que fatores (como esteroides) presentes no soro parecem prevenir a diferenciação das células progenitoras, mas que a atividade dessas células pode ser totalmente restaurada quando se transferem as culturas para um meio livre de soro. Os autores observaram a ausência de células NeuN⁺/BrdU⁺ em culturas suplementadas com soro equino, devido à supressão da diferenciação destas células progenitoras, como também foi observado no presente trabalho. Portanto, os dados obtidos aqui estão de acordo com os resultados obtidos por Raineteau *et al.* (2004), indicando que **ocorre um aumento da diferenciação de células progenitoras com produção de novos neurônios, ao se substituir, após uma semana, o meio de cultura contendo soro por um meio sem soro.**

Foi observado, em outros trabalhos, que a presença de soro aumenta a proliferação astrocitária e a ativação da micróglia (Czapiga & Colton, 1999). Sabe-se também que o soro pode favorecer a diferenciação de células precursoras em astrócitos (Landis *et al.*, 1990), em detrimento da diferenciação em neurônios. O processo de fatiar o hipocampo produz uma lesão grande no tecido e, após a preparação das fatias, observa-se uma ativação e migração da micróglia e astrócitos para a superfície do tecido formando-se uma cicatriz glial (Grabiec *et al.*, 2017). Essa ativação pode inibir a formação de novos neuritos e impedir a reconexão dos circuitos neuronais cortados (Bovolenta *et al.*, 1992). No trabalho de Egert *et al.*, (1998) também foi observado, usando culturas organotípicas, um aumento da população de astróglia nas margens do tecido quando incubadas com meio contendo 25% de soro equino por até 4 semanas. Futuros experimentos deverão ser realizados a fim de avaliar se o processo de crescimento glial ocorre nas COH e se sete dias de exposição ao soro equino são suficientes para promover a recuperação do tecido sem aumentar consideravelmente o tamanho da cicatriz glial.

A utilização de uma semana de estabilização em meio de cultura MEM suplementado com soro e a substituição do meio MEM por meio Neurobasal (meio livre de soro, N-B27) por mais uma semana está em concordância com vários trabalhos prévios realizados usando culturas organotípicas (Chapleau *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2015; Muller *et al.*, 2001). Foi observado por Sadgrove *et al.* (2006) que o meio Neurobasal permite uma quantificação neuronal mais consistente ao longo do tempo. Esse resultado também foi obtido no presente trabalho, quando foram comparadas as culturas incubadas por 14 dias em meio MCS+MSS e as culturas incubadas por um mesmo período em MCS+N-B27. Nesta última condição, o desvio padrão das amostras foi menor que na primeira, evidenciando uma menor variabilidade no número de neurônios por fatia e, portanto, diminuindo a possibilidade de mascarar resultados devido à variabilidade individual. O suplemento B27 é a condição mínima para manter os neurônios saudáveis na cultura por longos períodos. Em um dos experimentos realizados foram incubadas as culturas com meio Neurobasal sem suplemento B27 e foi observada uma queda no número de neurônios desses tecidos, provavelmente devido à morte celular (dados não mostrados). Assim, fez-se necessário incluir esse suplemento nas condições de incubação.

Portanto e, a partir dos experimentos realizados nesta etapa do trabalho, foi determinado que o tempo de estabilização necessário para a recuperação das culturas e estabelecimento de novas conexões entre os neurônios é de 14 dias, sendo os sete primeiros em meio MCS e os sete últimos em N-B27.

PARTE 2

Estabelecimento das Culturas Organotípicas do Hipocampo como modelo para o estudo da Deficiência de Tiamina

5. RESULTADOS

5.1. EFEITOS DA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA SOBRE PARÂMETROS HIPOCAMPAIS

O objetivo dos experimentos realizados nesta parte do trabalho foi estabelecer um modelo de DT em COH e determinar se um episódio de DT induz modificações estruturais no hipocampo. Na parte 1, foi determinado que um tempo de 14 dias é necessário para a recuperação e estabilização da fatia e, portanto, todas as culturas passaram por esses 14 dias de estabilização (os primeiros 7 em meio MCS e os 7 restantes em meio N-B27) antes da realização dos experimentos (exposição a N-B27 contendo ou não tiamina).

5.1.1. TAMANHOS DAS SUBÁREAS DO GD E CA1-CA3 E DA ÁREA TOTAL DO HIPOCAMPO

Foram medidas as áreas do **GD**, **CA1-CA3** e a **área total** do tecido em vários experimentos. Uma imagem representativa de 7 dias de exposição ao meio com tiamina (CT), após os 14 dias de estabilização conforme estabelecido na primeira parte do trabalho, pode ser vista na Fig. 17. Na imagem estão delimitadas as sub-regiões que serão analisadas no decorrer do presente trabalho, a saber: GD, CA1-CA3 e tecido total.

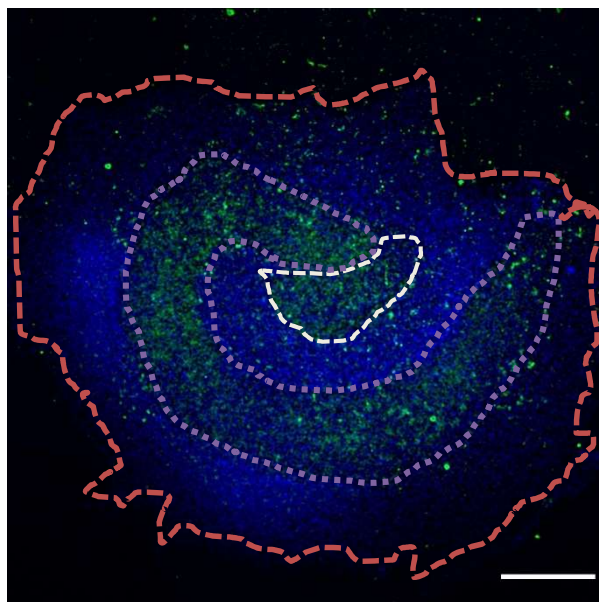


Fig. 17. Imagem representativa de uma fatia do hipocampo mantida em cultura por 7 dias em meio com tiamina (CT). Em verde estão representados os neurônios marcados com anti-NeuN e, em azul, o núcleo de todas as células marcadas com DAPI. As linhas pontilhadas representam as diferentes áreas analisadas: GD (em branco), CA1-CA3 (em amarelo) e o tecido total (em vermelho). A linha horizontal branca representa 500 µm.

A Fig. 18 mostra o efeito de um episódio de DT com três durações diferentes (4, 7 e 10 dias) sobre a área das sub-regiões do hipocampo. *RM Two-Way ANOVA* com efeitos mistos (experimento pareado)

mostrou efeito significativo do tratamento, diminuindo de forma significativa, tanto as estruturas correspondentes ao **GD** ($F_{(1,17)}=9,88$; $p=0,006$), quanto a sub-região **CA1-CA3** ($F_{(1,17)}=5,18$; $p=0,036$). Não houve efeito do tempo (GD: $F_{(2,34)}=2,76$; $p=0,078$; CA1-CA3: $F_{(2,34)}=2,38$; $p=0,107$) e nem interação entre tratamento e tempo (GD: $F_{(2,28)}=0,88$; $p=0,426$, CA1-CA3: $F_{(2,28)}=1,88$; $p=0,172$). O pós-teste de Sidak mostrou que com 4 dias (T4) de exposição à DT, a área do **GD** na condição sem tiamina (ST), é significativamente menor ($p=0,023$) quando comparada com o grupo CT, com tiamina. O pós-teste da área de **CA1-CA3** mostrou uma diferença significativa entre CT e ST no sétimo dia (T7) de exposição à meio sem tiamina ($p=0,038$).

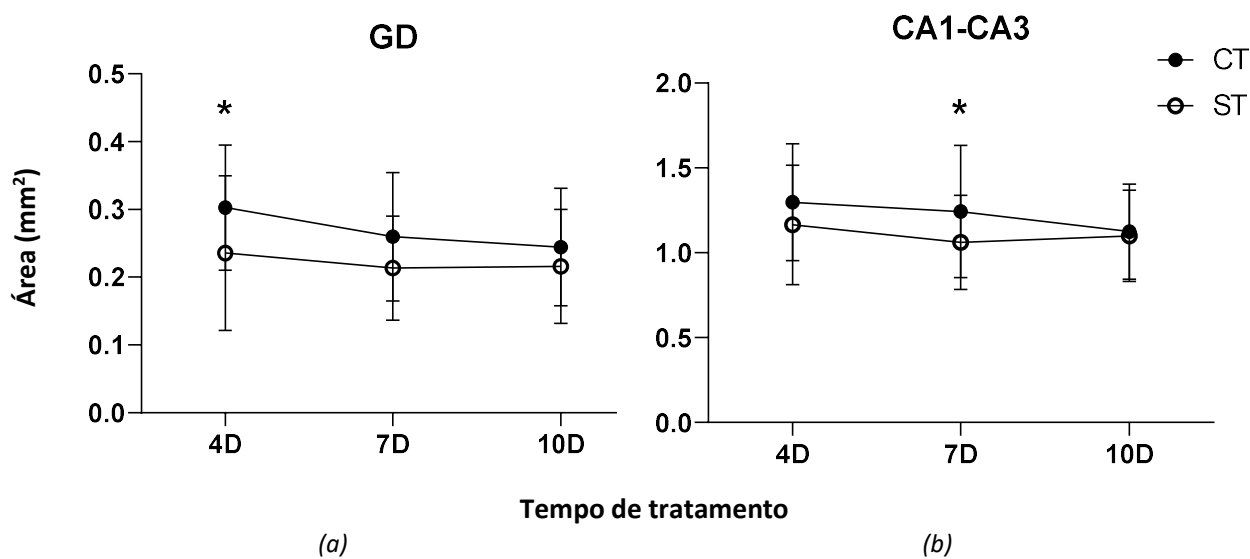


Fig. 18. Tamanho das áreas (Média \pm SD) do GD (a) e CA1-CA3 (b), expressos em mm², após 4, 7 e 10 dias (D=dias na abcissa) de exposição em meio sem tiamina (ST, círculo vazio) ou com tiamina (CT, círculo cheio). n=18; * $p<0,05$.

Após a análise de variância da **área total do tecido** (Fig. 19), foi observado um efeito significativo do tratamento (DT), ($F_{(1,11)}=6,54$; $p=0,027$), mas não do tempo ($F_{(1,6;17,4)} = 2,57$; $p=0,114$) e nem interação entre os dois fatores, tratamento e tempo ($F_{(1,9;15,5)} = 0,33$; $p=0,719$). Assim, foi encontrado um efeito do tratamento (DT) referente à um aumento da área total da fatia no grupo ST. O pós-teste de Sidak não mostrou diferença entre as duas condições em nenhum dos três tempos de exposição.

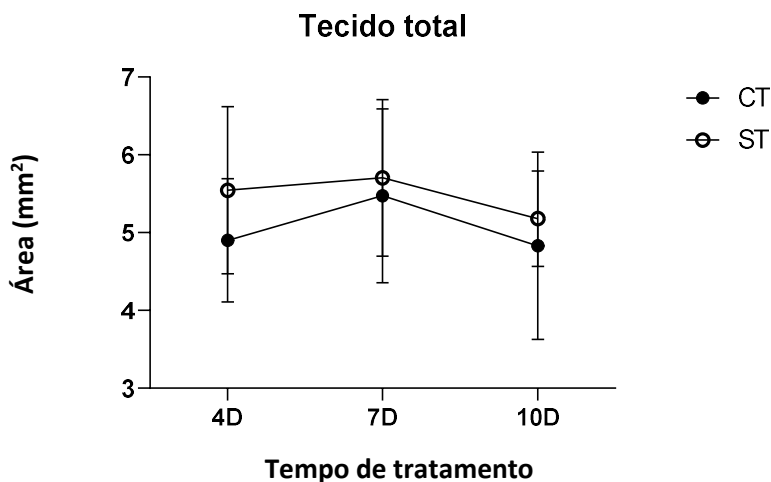


Fig. 19. Área total do tecido (Média \pm SD) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente em tiamina (ST, círculo vazio) ou não (CT, círculo cheio). $n=12$.

5.1.2. DENSIDADE DE NEURÔNIOS NAS DIFERENTES SUB-REGIÕES HIPOCAMPAIS.

A redução no tamanho do GD e de CA1-CA3 pode ser resultado de um processo de neurodegeneração, portanto, o passo seguinte foi realizar a contagem do número de neurônios para cada uma dessas estruturas.

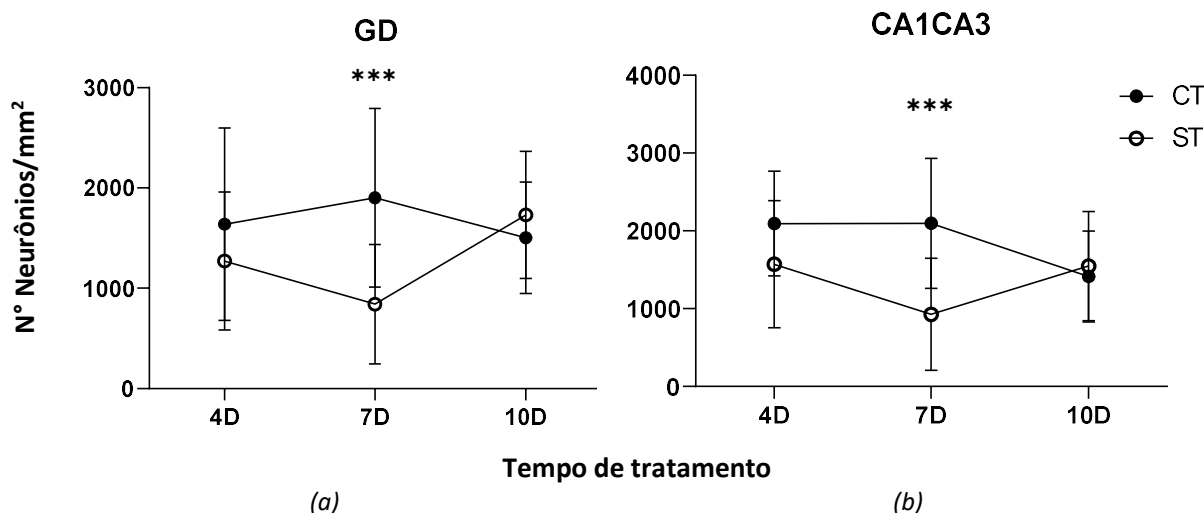


Fig. 20. Dados da análise quantitativa (Média \pm SD) da densidade de neurônios em duas sub-regiões hipocâmpais: (a) no GD e, (b) na região CA1-CA3 (b) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente (ST, círculo vazio) ou não (CT, círculo cheio) de tiamina. *** $p<0,001$; $n=18$ para cada tratamento.

Para o número de neurônios no **GD** (Fig. 20, a), *Two-Way* ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento ($F_{(1,84)}=6,67$; $p=0,012$) e interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{(2,84)}=5,77$; $p=0,0045$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,84)}=0,89$; $p=0,416$). Após realizar o pós-teste de Sidak, observamos que, no dia 7, DT diminuiu de forma significativa o número de neurônios ($p=0,0007$) no GD. Para a região **CA1-CA3**, *Two-Way* ANOVA também mostrou um efeito significativo do tratamento (DT), ($F_{(1,83)}=11,38$; $p=0,0011$) sobre o número de neurônios (Fig. 20, b) e interação significativa entre

os fatores DT e tempo ($F_{(2,83)}=6,06$; $p=0,004$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,84)}=0,89$; $p=0,416$). O pós-teste mostrou uma diferença significativa ($p=0,0002$) entre CT e ST também no dia 7. Interessante que todos os dias são estatisticamente similares para o controle, ou seja, não há diferença na contagem de neurônios nos três tempos analisados para as culturas incubadas na presença de tiamina. No caso da cultura incubada em ausência de tiamina, observa-se uma diferença entre o dia 7 e o dia 10 de incubação ($p=0,005$).

5.1.3. DENSIDADE DE NEURÔNIOS NO HIPOCAMPO.

Para o número de neurônios no **tecido total** (Fig. 21), houve efeito significativo do tratamento ($F_{(1,83)}=12,13$; $p=0,001$) e efeito de interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{(2,83)}=6,13$; $p=0,003$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,83)}=1,16$; $p=0,320$). O pós-teste de Sidak mostrou diferença significativa ($p=0,0002$) no dia 7 entre o controle (CT) e o deficiente em tiamina (ST).

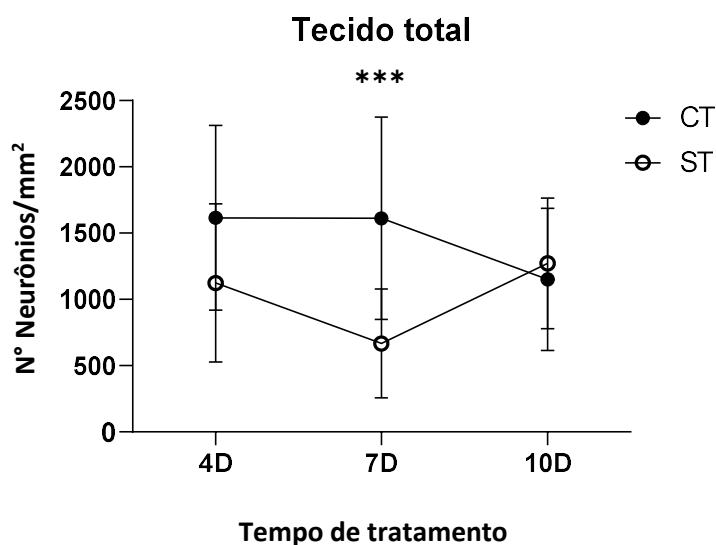


Fig. 21. Análise quantitativa da densidade de neurônios (Média \pm SD) para o tecido total, após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente (ST, círculo vazio) ou não (CT, círculo cheio) de tiamina.

*** $p<0,001$; $n=12$.

Na Fig. 22, podemos ver imagens representativas de membranas cultivadas durante 4, 7 ou 10 dias em meio com tiamina (CT) ou sem (ST). Em verde estão representados os neurônios e, em azul, o núcleo de todos os tipos celulares. Estas imagens foram quantificadas a fim de obter os dados apresentados anteriormente, nas Fig. 20 e 21.

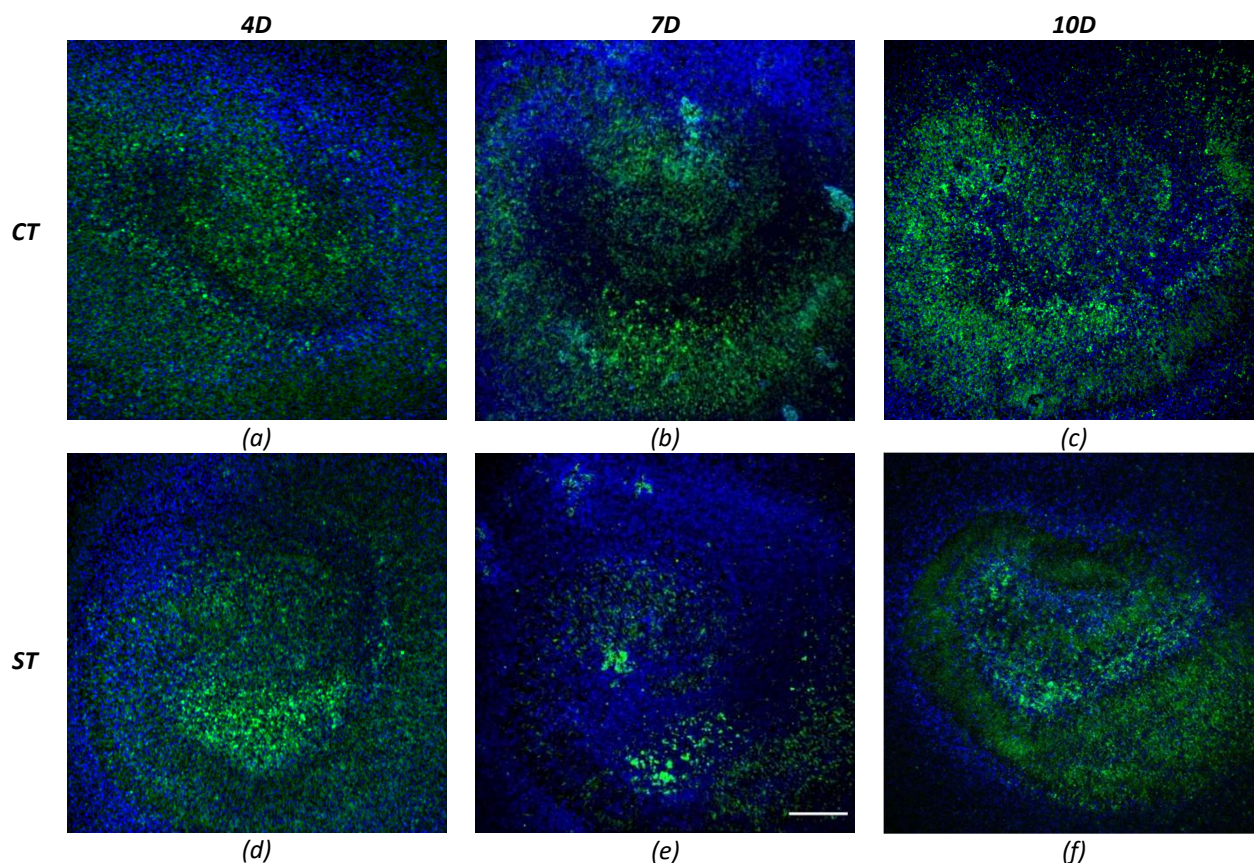


Fig. 22. Imagem representativa de uma cultura incubada por 4 (a, d), 7 (b, e) ou 10 (c, f) dias em meio com tiamina (CT; a, b, c) ou meio sem tiamina (ST; d, e, f). Em verde estão representados os neurônios marcados com anti-NeuN e, em azul, o núcleo de todas as células marcadas com DAPI. A linha horizontal branca na imagem (e) representa 200 μm .

5.1.4. RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS ÁREA VERSUS NÚMERO DE NEURÔNIOS

Usando o teste de Pearsons, decidimos avaliar se existia correlação significativa entre o número de neurônios e o tamanho da sub-região hipocampal. Os dados obtidos durante a incubação para o grupo CT e o grupo ST, referentes aos três tempos (4, 7 e 10 dias = 4D, 7D e 10D, respectivamente) foram analisados separadamente para cada um dos três dias e para cada sub-região (GD e CA1-CA3). Para a sub-região GD, observamos um comportamento semelhante quando se compara os grupos CT e ST (Fig. 23). Não encontramos correlação significativa entre o número de neurônios e o tamanho da sub-região, em nenhum dos três tempos de incubação e em nenhuma das duas condições, DT e CT (grupo CT: 4D, $p=0,062$; 7D, $p=0,205$, 10D, $p=0,225$; grupo ST: 4D, $p=0,062$; 7D, $p=0,261$; 10D, $p=0,270$).

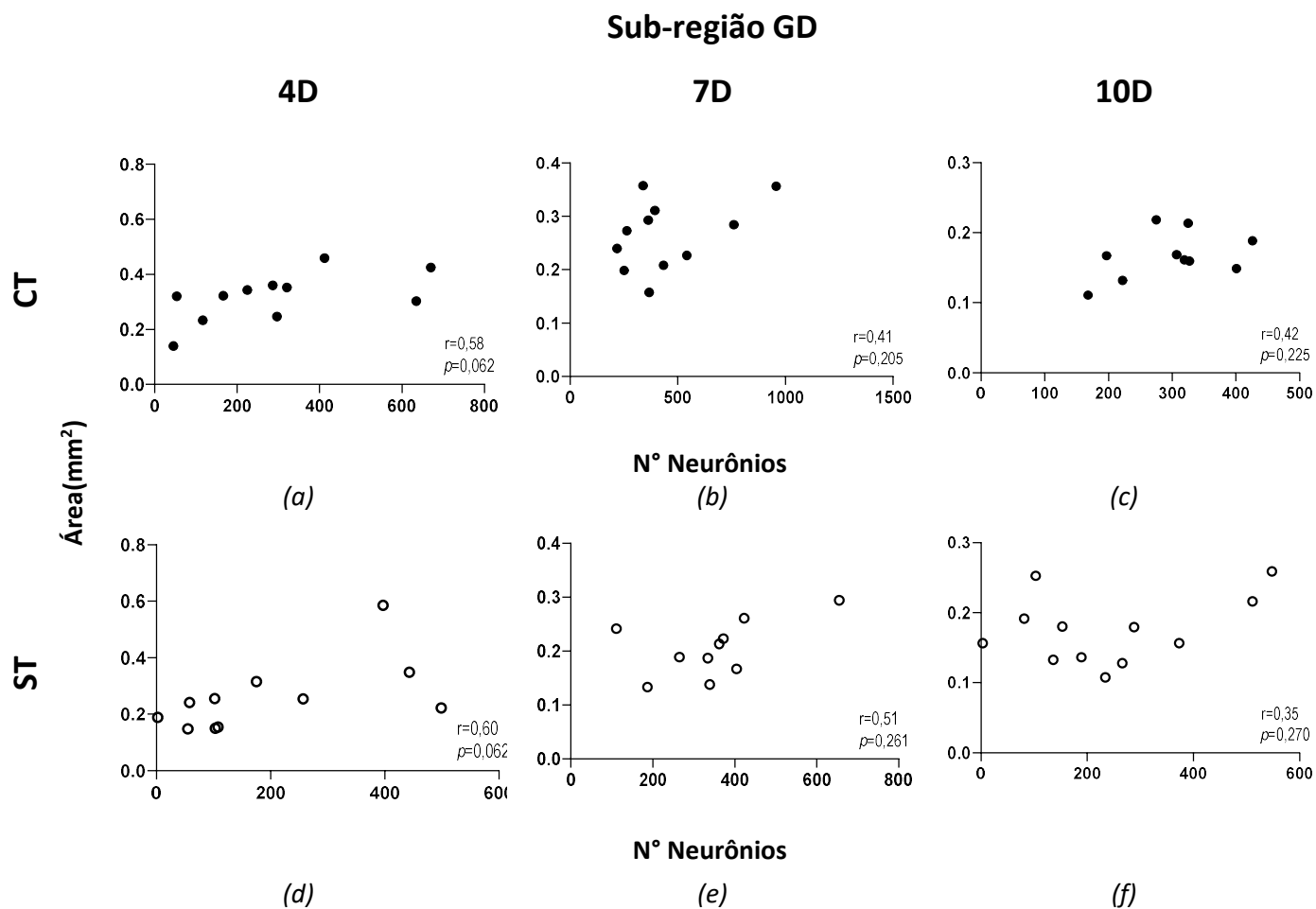


Fig. 23. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios e o tamanho da sub-região GD para a condição CT (círculo cheio; a, b, c) e para a condição ST (círculo vazio, d, e, f). $n=12$ animais para cada tratamento. Cada ponto representa uma COH.

Em relação à sub-região CA1-CA3 (Fig. 24), na condição controle, ou seja, na presença de tiamina, encontramos uma correlação significativa no décimo dia ($r=0,61$; $p=0,046$), mas não nos outros dois dias (4D: $p=0,145$; 7D: $p=0,83$). No grupo deficiente, ST, encontramos uma correlação positiva no quarto dia ($r=0,68$; $p=0,042$) e no décimo dia da deficiência ($r=0,69$; $p=0,014$). O valor positivo do r indica que quanto maior o número de neurônios maior a área.

Sub-região CA1-CA3

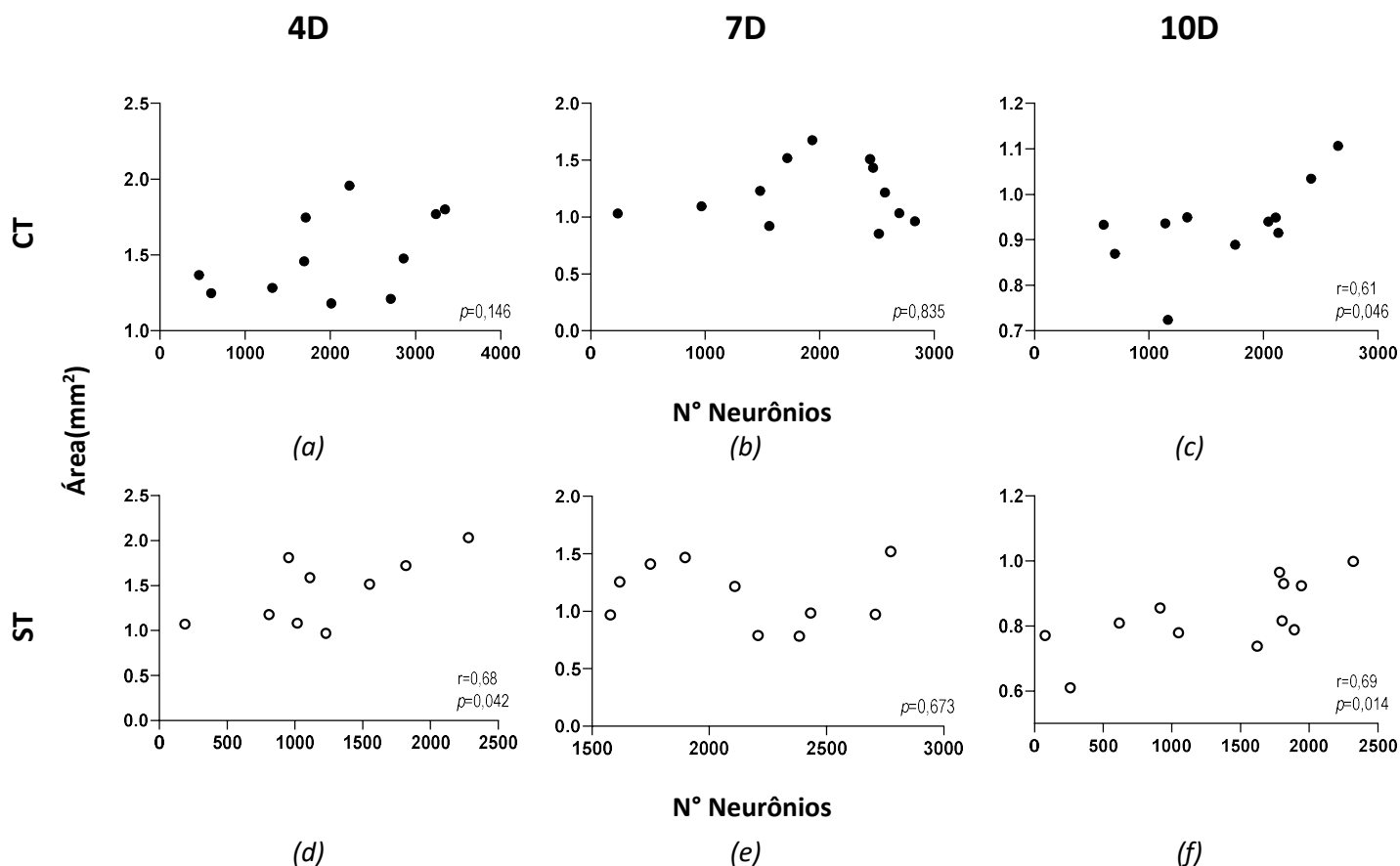


Fig. 24. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios e o tamanho da região CA1-CA3 para a condição CT (círculo cheio; a, b, c) e para a condição ST (círculo vazio, d, e, f). $n=12$ animais para cada tratamento. Cada ponto representa uma COH.

2.3 VIABILIDADE CELULAR, AVALIADA MEDINDO A INCORPORAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDIO

Após encontrar uma redução no número de neurônios e nas áreas das diferentes regiões do hipocampo induzidas pela exposição das culturas à deficiência de tiamina, decidimos avaliar a incorporação de IP através da membrana dos neurônios. Usamos o delineamento experimental apresentado na Fig. 8 e foi realizada a incubação com IP por uma hora e a imunomarcagem usando anticorpo anti-NeuN, como explicado na seção de Materiais e Métodos. Um exemplo das imagens obtidas pode ser visto na Fig. 25, com a marcação correspondente aos neurônios em verde, o IP em vermelho e o DAPI, que marca o núcleo de todos os tipos celulares, em azul.

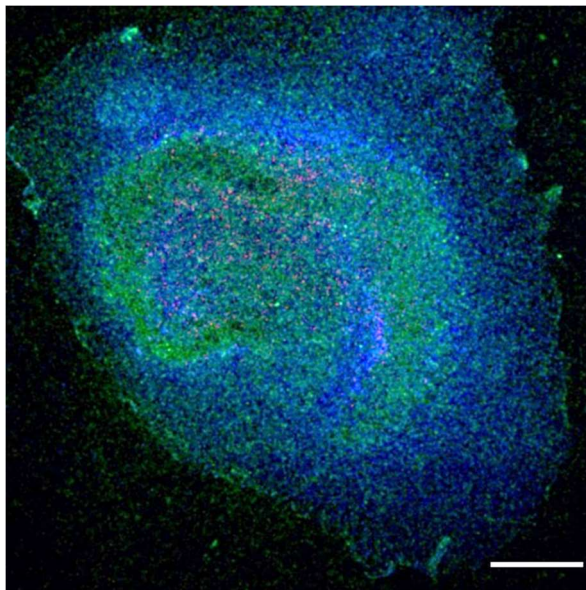


Fig. 25. Imagem representativa de uma cultura incubada por 7 dias em meio com tiamina (CT). Em verde estão representados os neurônios marcados com anti-NeuN, em vermelho, a incorporação de IP e, em azul, o núcleo de todas as células marcadas com DAPI. A linha horizontal branca na imagem (b) representa 500 μm .

No **GD**, *Two-Way* ANOVA mostrou para os dados obtidos na contagem do número de neurônios (neste experimento as fatias utilizadas não pertenciam aos mesmos animais em todas as membranas), um efeito significativo do tratamento ($F_{(1,23)}=13,22$; $p=0,001$) e efeito significativo de interação entre os dois fatores ($F_{(2,23)}=4,99$; $p=0,016$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,23)}=0,06$; $p=0,945$). O pós-teste de Sidak mostrou efeito significativo no sétimo dia, 7D, ($p=0,0006$) entre CT e ST (Fig. 26, a). Já na análise da incorporação de IP por neurônios (células duplamente marcadas), não houve efeito significativo de nenhum dos fatores, tratamento ($F_{(1, 23)}= 1,02$; $p=0,323$), tempo ($F_{(2, 23)}= 0,49$; $p=0,619$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(2,23)}=2,18$; $p=0,135$) (Fig. 26, b).

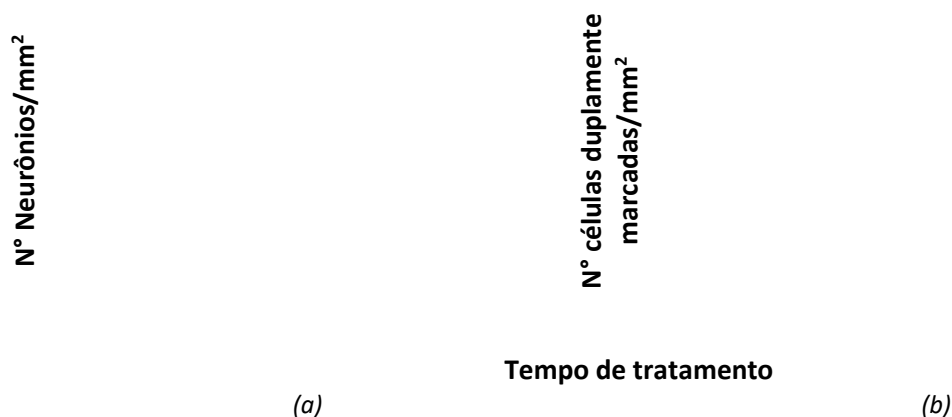


Fig. 26. Dados da análise quantitativa do número de neurônios (Média \pm SD) na região GD (a) e incorporação de IP em neurônios na mesma região (b) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente (ST, bola vazia) ou não (CT, círculo cheio) de tiamina. *** $p<0,001$; $n=6$ para cada condição e cada tempo. Os dados, número de neurônios (a) e número de células duplamente marcadas (b), estão expressos por mm^2 .

Na região **CA1-CA3**, em relação ao número de neurônios, ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento ($F_{(1,24)}=22,25$; $p<0,0001$) e da interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{(2,24)}=5,17$; $p=0,014$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,24)}=1,98$; $p=0,160$). O pós-teste de Sidak detectou diferença significativa ($p<0,0001$) entre CT e ST no sétimo dia de tratamento (Fig. 27, a). A contagem de células duplamente marcadas mostrou um efeito significativo do tratamento ($F_{(1,23)}=6,24$; $p=0,020$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,23)}=0,16$; $p=0,852$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(2,23)}=1,86$; $p=0,178$). O pós-teste de Sidak mostrou um maior número de células duplamente marcadas ($p=0,023$) no grupo CT no dia 7 (Fig. 27, b).

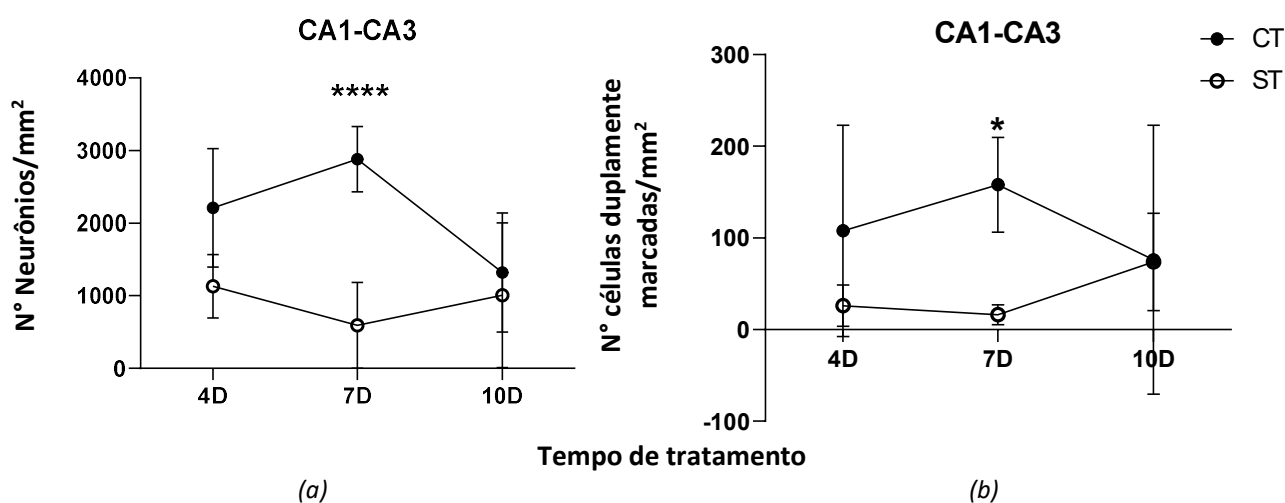


Fig. 27. Dados da análise quantitativa da densidade de neurônios (Média ± SD) na região CA1-CA3 (a) e incorporação de IP em neurônios na mesma região (b) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente (ST, círculo vazio) ou não (CT, círculo cheio) de tiamina. **** $p<0,001$, * $p<0,05$; $n=6$ para cada tempo e condição do meio (ST e CT). Os dados, número de neurônios (a) e número de células duplamente marcadas (b), estão expressos por mm^2 .

Finalmente, ao analisar a densidade de neurônios no **tecido total** (Fig. 28, a), a análise de variância mostrou um efeito significativo do tratamento ($F_{(1,24)}=17,95$; $p=0,0003$) e efeito significativo na interação entre os dois fatores tratamento e tempo ($F_{(2,24)}=7,90$; $p=0,002$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,24)}=0,67$; $p=0,521$). O pós-teste de Sidak mostrou uma diminuição no número de neurônios no grupo ST em comparação com o grupo CT no quarto dia ($p=0,040$) e no sétimo dia ($p<0,0001$) de tratamento. Para o número de células duplamente marcadas, *Two-Way* ANOVA também apontou um efeito do tratamento ($F_{(1,24)}=7,06$; $p=0,014$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,24)}=0,56$; $p=0,580$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(2,24)}=2,36$; $p=0,116$). O pós-teste de Sidak indicou uma maior quantidade de células duplamente marcadas na condição CT, quando comparado com a condição ST (Fig. 28, b) no sétimo dia de exposição ao meio sem tiamina ($p=0,011$).

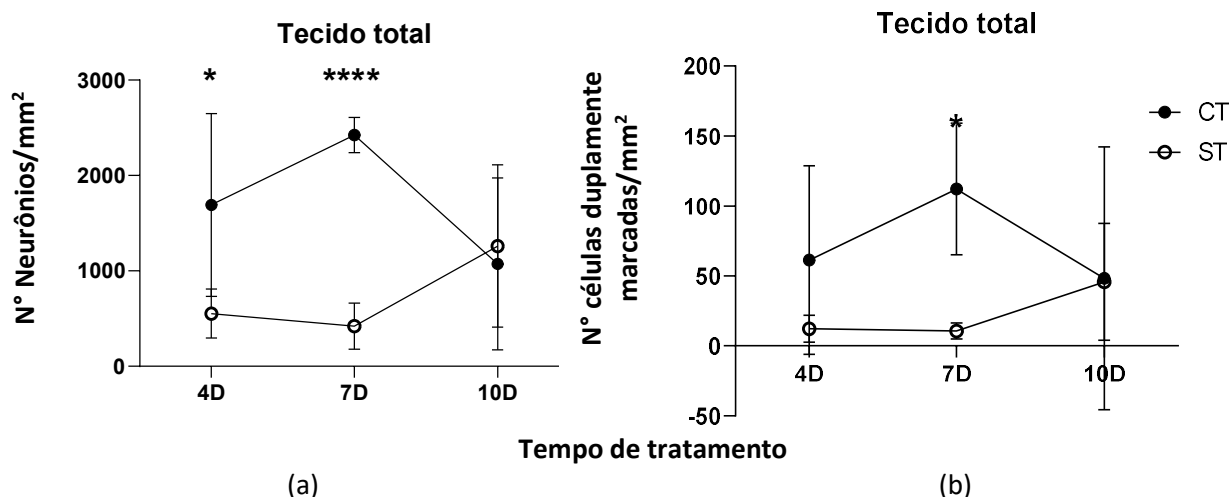


Fig. 28. Dados da análise quantitativa da densidade de neurônios (Média \pm SD) para o tecido total (a) e incorporação de IP em neurônios, também no tecido total, (b) após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente (ST, círculo vazio) ou não (CT, círculo cheio) de tiamina. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$; $n = 6$ para cada tempo e tratamento (ST e CT). Os dados, número de neurônios (a) e número de células duplamente marcadas (b), estão expressos por mm².

Esses resultados parecem contraditórios, já que ocorre uma maior incorporação de IP na condição CT, indicando uma aparente maior neurodegeneração na condição com tiamina. Devemos considerar que na condição CT existe uma maior densidade de neurônios, mais especificamente no dia 7. Sabendo-se que, mesmo em condições fisiológicas, ocorre um equilíbrio dinâmico entre perda (neurodegeneração) e formação de novos neurônios (neurogênese), tendo-se um número maior de neurônios por mm², a probabilidade de haver neurônios que tenham incorporado IP aumenta. Portanto, com a finalidade de expressar os dados de uma forma mais adequada, dois recursos matemáticos diferentes foram utilizados: **1.** Porcentagem de neurônios duplamente marcados em relação ao total de neurônios de cada sub-região, considerado como 100%. Expressando os resultados desta forma, uma reanálise dos dados não detecta efeito significativo do tratamento [GD: $F_{(1,23)} = 0,47$; $p = 0,500$; CA1-CA3: ($F_{(1,23)} = 1,39$; $p = 0,251$); Tecido Total: ($F_{(1,24)} = 0,51$; $p = 0,482$)], nem do tempo [GD: $F_{(2,23)} = 0,14$; $p = 0,868$; CA1-CA3: ($F_{(2,23)} = 0,44$; $p = 0,650$); Tecido Total: ($F_{(2,24)} = 0,94$; $p = 0,406$)] e nem interação entre esses dois fatores [(GD: $F_{(2,23)} = 0,77$; $p = 0,473$; CA1-CA3: ($F_{(2,23)} = 0,21$; $p = 0,808$); Tecido Total: ($F_{(2,24)} = 0,71$; $p = 0,503$)] em nenhuma das sub-regiões e nem no tecido total (Fig. 29, a, b, c); **2.** Ajuste dos dados através da utilização de um fator para corrigir a diferença de densidade de neurônios por mm² que foi observada entre as duas condições. Por exemplo, no tempo referente ao 7º dia (D7) na sub-região GD e para o animal 1:

$$\text{Fator} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de neurônios/mm}^2 \text{ na condição CT}}{\text{N}^\circ \text{ de neurônios/mm}^2 \text{ na condição ST}} = 10,07.$$

Posteriormente, os dados obtidos na contagem de células com dupla marcação para o animal 1 na sub-região GD e no tratamento ST foram multiplicados por 10,07, e os dados assim normalizados foram submetidos à ANOVA. Expressando os resultados desta forma, uma reanálise dos dados novamente não detecta efeito significativo do tratamento [GD: ($F_{(1,21)}=0,14$; $p=0,713$); CA1-CA3: ($F_{(1,21)}=1,91$; $p=0,182$); Tecido Total: ($F_{(1,21)}=0,85$; $p=0,366$)], do tempo [GD: ($F_{(2,21)}=0,05$; $p=0,954$); CA1-CA3: ($F_{(2,21)}=1,12$; $p=0,344$); Tecido Total: ($F_{(2,21)}=1,41$; $p=0,266$)] e nem da interação entre esses dois fatores [(GD: ($F_{(2,21)}=0,87$; $p=0,432$); CA1-CA3: ($F_{(2,21)}=0,19$; $p=0,824$); Tecido Total: ($F_{(2,21)}=0,27$; $p=0,764$)], em nenhuma das sub-regiões e nem no tecido total (Fig. 29, d, e, f).

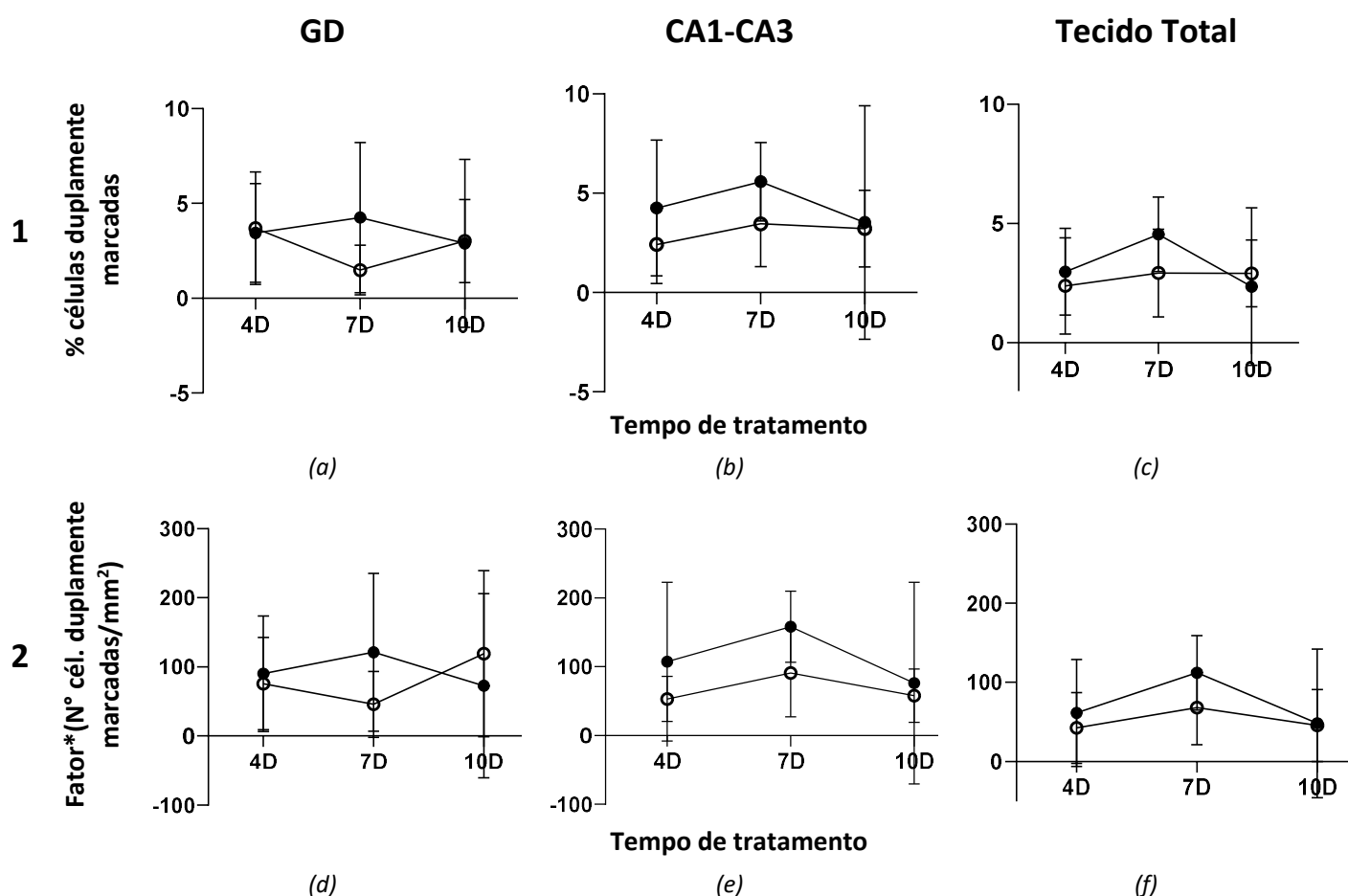


Fig. 29. Dados da análise quantitativa (Média \pm SD) do número de neurônios duplamente marcados ($NeuN^+/IP^+$), expressos em 1. porcentagem em relação ao número total de neurônios (painéis a, b e c) e 2. número de neurônios duplamente marcados corrigidos pelo Fator de Ajuste calculado para a condição ST (painéis e, f e g). Os dados estão apresentados para as sub-regiões GD, CA1-CA3 e tecido total após 4, 7 e 10 dias de tratamento em meio deficiente (ST, círculo vazio) ou não (CT, círculo cheio) de tiamina. $n=6$ para cada condição de cada tempo.

Um dado interessante é que, ao analisar se existe correlação significativa entre o número de neurônios e a porcentagem de células duplamente marcadas (Fig. 30), encontramos uma correlação entre esses dois fatores no grupo CT nas sub-regiões do GD ($r=0,68$; $p=0,007$) e CA1-CA3 ($r=0,56$; $p=0,039$), mas as correlações desaparecem nas duas sub-regiões [GD ($r=0,31$; $p=0,256$) e CA1-CA3 ($r=-$

0,02; $p=0,958$) na condição deficiente em tiamina (ST). Também não observamos uma correlação quando analisamos os dados da condição deficiente após a correção pelo fator [GD ($r=0,26$; $p=0,408$) e CA1-CA3 ($r=0,05$; $p=0,880$)].

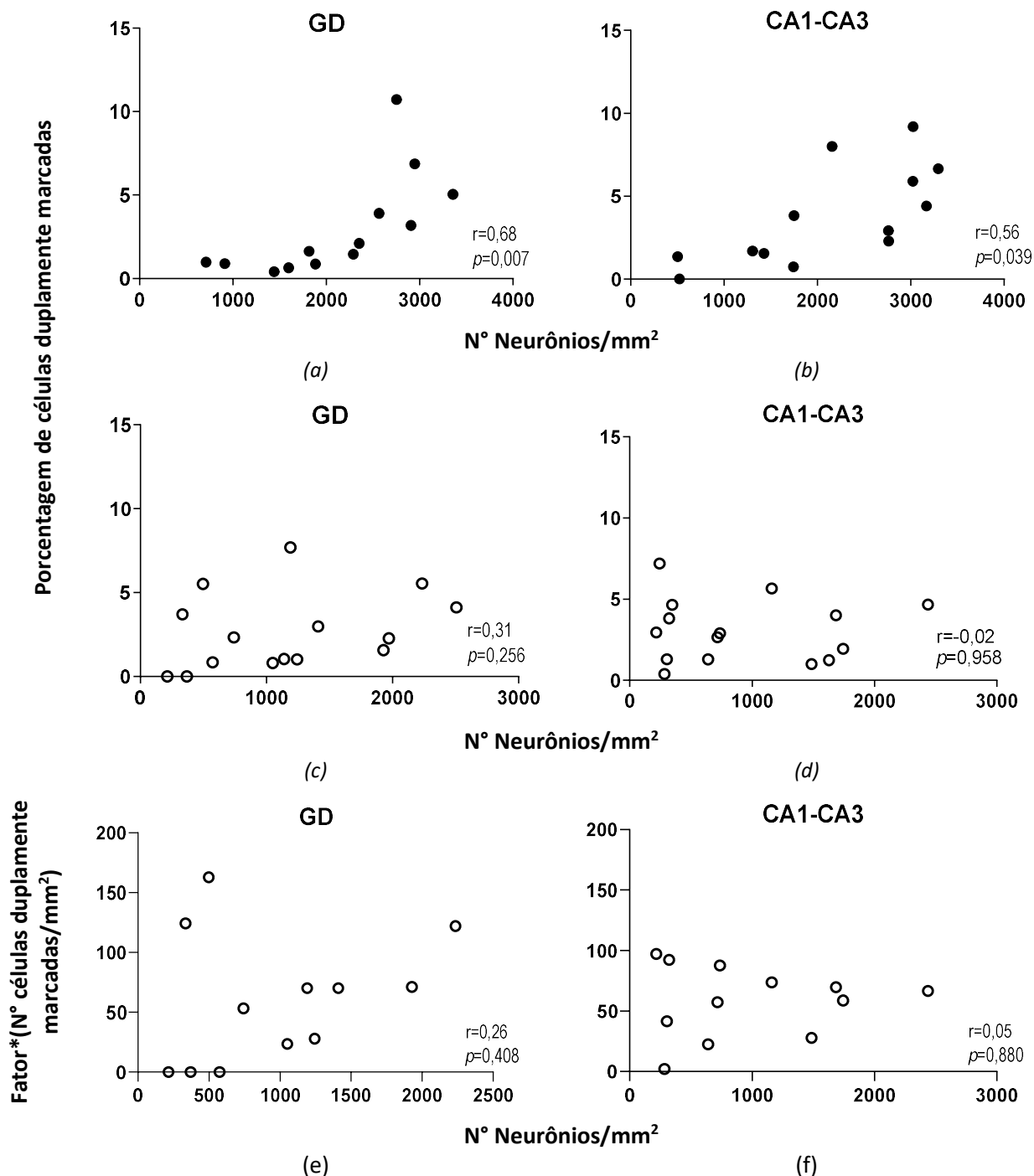


Fig. 30. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios/mm² e a porcentagem de células duplamente marcadas (NeuN⁺/IP⁺) no GD (a, c) e na região CA1-CA3 (b, d) para as condições sem tiamina (ST, círculo vazio) e com tiamina (CT, círculo cheio) e para os valores do grupo ST corrigidos pelo Fator (e, f). $n=6$ animais para todos os tratamentos.

5.2. RECUPERAÇÃO DO EPISÓDIO DE DT

Após o estudo da resposta do tecido em diferentes tempos durante um episódio de DT, decidimos estudar a recuperação do tecido. Portanto, após submeter as COH a um meio deficiente de tiamina por 10 dias, as culturas foram incubadas com meio N-B27 com tiamina por mais 7 dias. Assim, o experimento consistiu de dois grupos: o controle, incubado por 17 dias no meio N-B27 com tiamina (CT) e o deficiente, também incubado por 17 dias, sendo 10 dias no meio N-B27 sem tiamina, seguidos por 7 dias no meio N-B27 com tiamina (ST-REC). Após esse tempo, as culturas foram fixadas, imunomarcadas, fotografadas e analisadas de forma quantitativa.

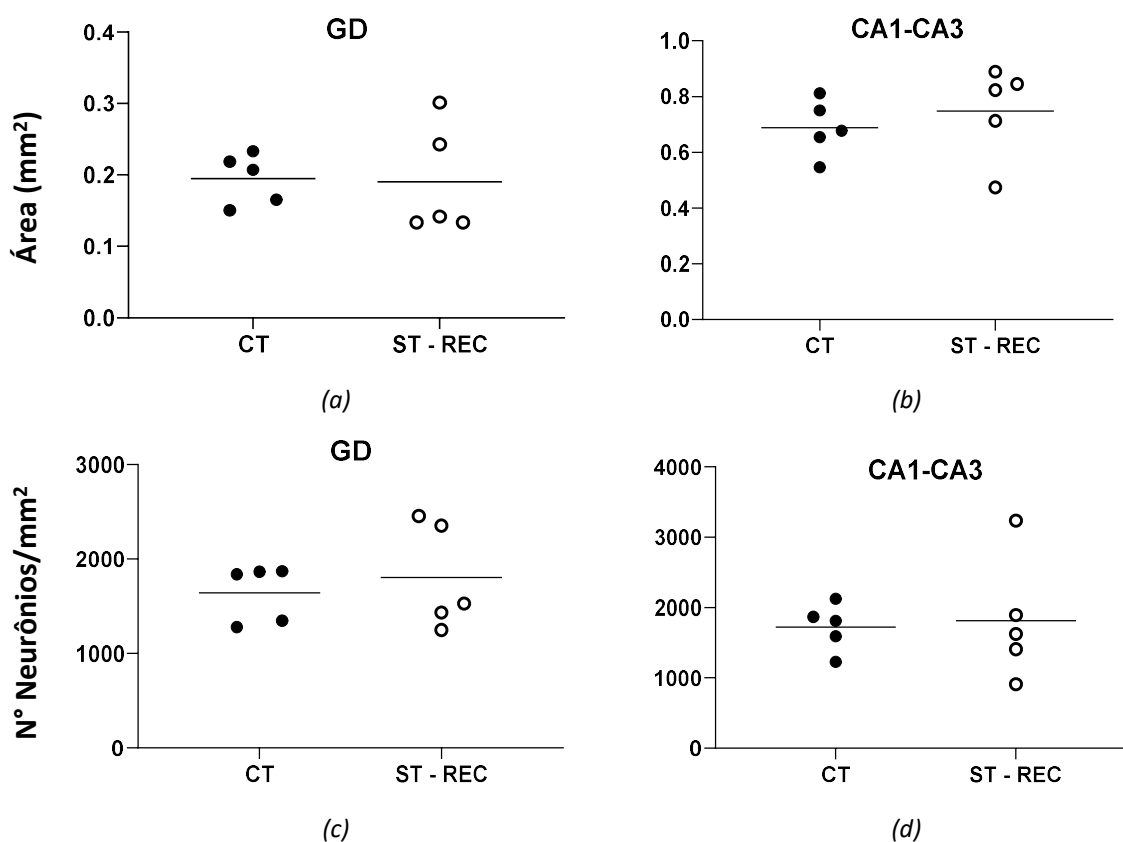


Fig. 31. Dados da análise quantitativa entre tamanho das áreas (em mm^2) para GD (a) e CA1-CA3 (b) e número de neurônios por mm^2 para GD (c) e CA1-CA3 (d). As medidas foram feitas após 10 dias de deficiência e 7 dias de recuperação (ST-REC, círculo vazio) ou 17 dias no meio com tiamina (CT, círculo cheio). $n=5$ para cada condição. A linha horizontal representa a média dos valores.

No **GD** e no **CA1-CA3**, usando o teste t para amostras pareadas, não encontramos diferença significativa (GD: $p=0,906$; CA1-CA3: $p=0,402$) entre as duas condições (CT x ST-REC) para o tamanho das regiões (Fig. 31; a, b). Também não encontramos diferença significativa (GD: $p=0,812$; CA1-CA3: $p=0,810$) entre o número de neurônios nas duas condições (CT x ST-REC) nessas duas regiões (Fig. 31; c, d).

Como o tamanho da amostra para o experimento de recuperação era igual a 5 animais para cada condição (CT e ST-REC), para estudar a relação entre os dois parâmetros, tamanho da área e a contagem de neurônios, decidimos agrupar os dados das duas sub-regiões (GD+CA1-CA3) para proceder às análises. Usando o teste de correlação de Pearsons, encontramos que tanto para a condição CT ($r=0,94$; $p<0,0001$) como para a condição ST-REC ($r=0,79$; $p=0,006$) existe uma correlação significativa entre o número de neurônios e as áreas (Fig. 32). Comparando as correlações obtidas no GD e em CA1-CA3, usando a ferramenta COCOR (Diedenhofen & Musch, 2015), encontramos que os coeficientes de correlação são significativamente diferentes ($z=1,99$; $p=0,047$) entre as duas condições CT e ST-REC.

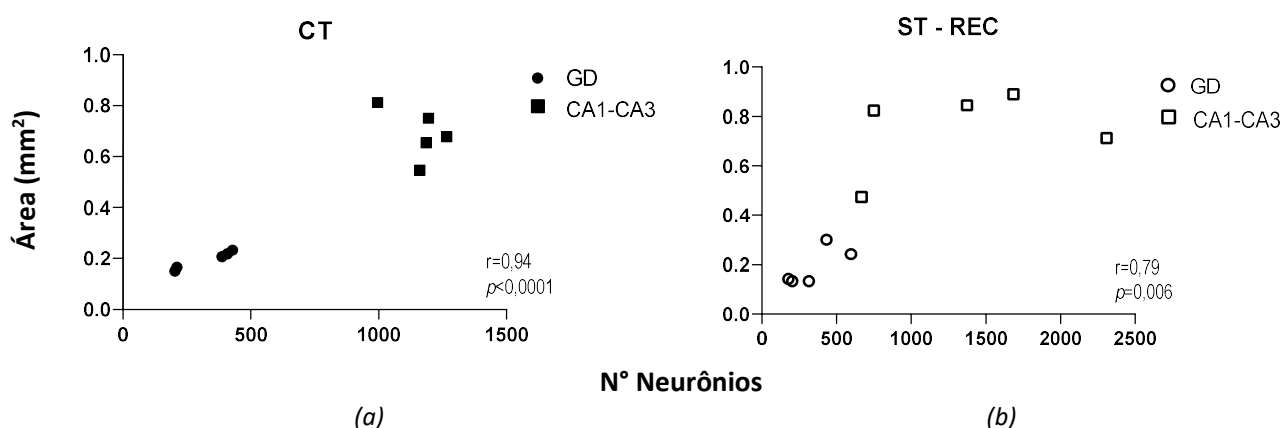


Fig. 32. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios e o tamanho das sub-regiões GD + CA1-CA3 associadas, nas condições CT (círculo cheio, painel a) e ST-REC (círculo vazio, painel b). $n=5$ para cada uma das duas condições.

O próximo passo foi avaliar as variações dos dois parâmetros, tamanho das áreas e número de neurônios, ao longo dos 10 dias do episódio de DT seguido do período de recuperação de 7 dias. Para isso, representamos em um mesmo gráfico (embora pertencentes a experimentos independentes) os valores das áreas e do número de neurônios de cada sub-região (Fig. 33). Para a **análise da área** do **GD**, *Two-Way* ANOVA mostrou efeito significativo do tratamento ($F_{(1,105)}=4,16$; $p=0,044$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(3,105)}=2,56$; $p=0,059$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(3,105)}=0,38$; $p=0,770$). O pós-teste de Sidak não mostrou nenhuma diferença significativa entre os dias ($p>0,05$) nem entre as áreas do GD nas duas condições ($p>0,05$). Na área da sub-região **CA1-CA3**, ANOVA mostrou efeito do tempo ($F_{(3,105)}=7,709$; $p=0,0001$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{(1,105)}=1,14$; $p=0,289$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(3,105)}=0,64$; $p=0,592$). O pós-teste de Sidak mostrou diferenças significativas entre os dias 4 ($p=0,001$), 7 ($p=0,004$) e 10 ($p=0,039$) comparados com o dia 17 dentro do grupo CT. Houve também diferença entre o dia 4 e o dia 17 ($p=0,033$) na condição ST.

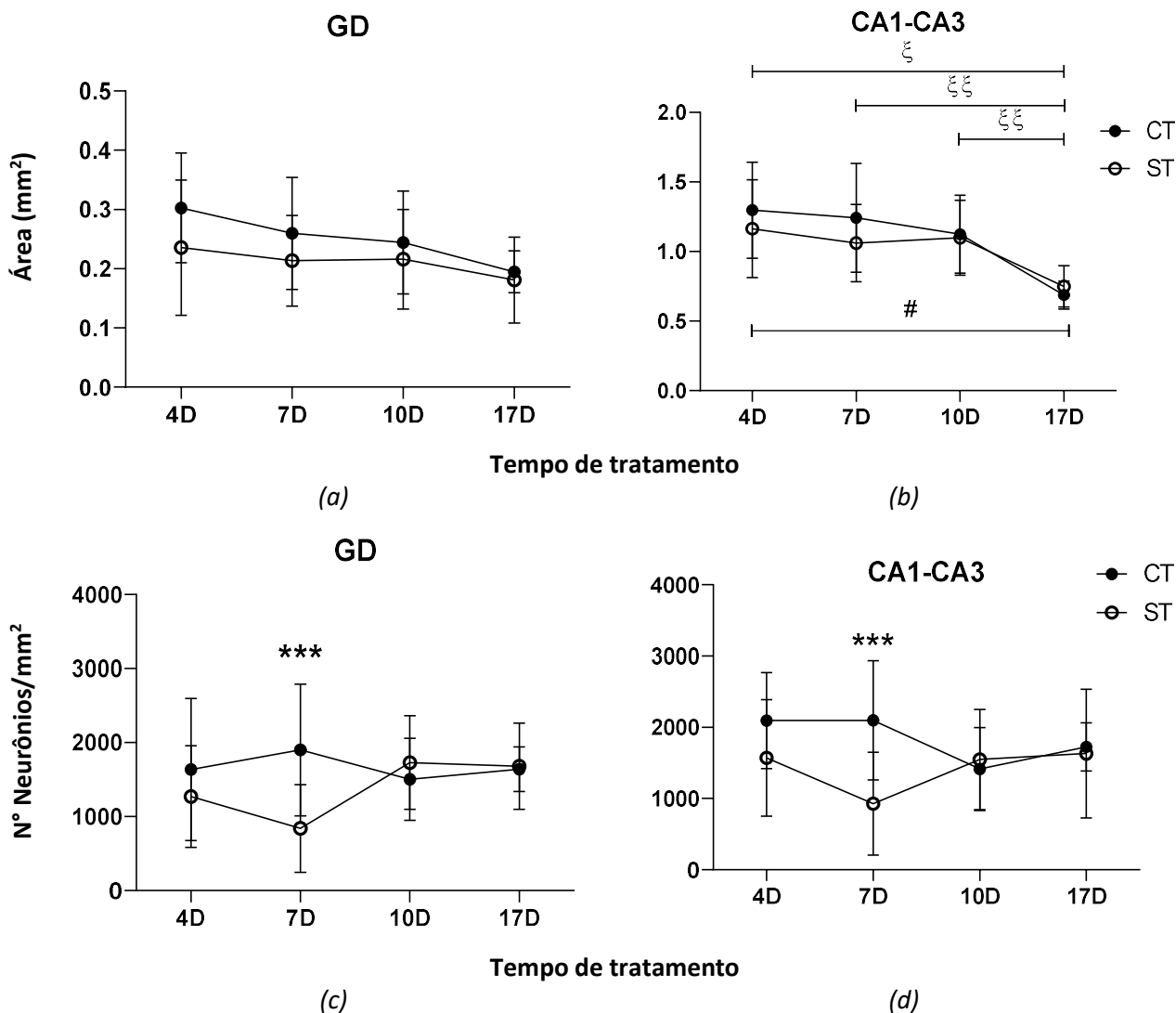


Fig. 33. Dados (Média \pm SD) do tamanho das áreas para o GD (a) e CA1-CA3 (b) e densidade de neurônios no GD (c) e CA1-CA3 (d) após 4, 7 e 10 dias em duas condições, com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina (ST, círculo vazio) seguidos de mais 7 dias (até o 17^o dia, 17D) em condição com tiamina (recuperação para ST, neste período do 10^o ao 17^o dia, condição denominada ST-REC). *** $p < 0,001$ para comparações entre CT e ST; # $p < 0,05$ para comparações entre tempos na condição ST, § $p < 0,05$ e §§ $p < 0,01$ para comparações entre tempos na condição CT. $n = 18$ para cada condição nos tempos 4D, 7D e 10D e $n = 5$ para cada condição no tempo 17D.

No caso do **número de neurônios**, na sub-região **GD**, ANOVA mostrou interação significativa entre os fatores tratamento e tempo ($F_{(3,93)} = 4,34$; $p = 0,007$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{(1,93)} = 3,45$; $p = 0,664$) e nem do tempo ($F_{(3,93)} = 0,82$; $p = 0,488$). O pós-teste de Sidak detectou diferença significativa entre as condições CT e ST-REC no dia 7 ($p = 0,0006$). Na sub-região **CA1-CA3**, foi encontrado um efeito do tratamento ($F_{(1,92)} = 6,75$; $p = 0,011$) e interação entre os dois fatores tratamento e tempo ($F_{(3,92)} = 4,30$; $p = 0,007$). Não houve efeito do tempo ($F_{(3,92)} = 1,45$; $p = 0,233$). O pós-teste de Sidak mostrou diferença significativa entre as condições CT e ST no sétimo dia ($p = 0,0002$).

5.3. EFEITO DE UM EPISÓDIO DE DT SOBRE O NÚMERO DE OLIGODENDRÓCITOS

Como mencionado nos objetivos, possíveis modificações na população de oligodendrócitos também foram avaliadas após a exposição à DT, seguindo o desenho experimental apresentado na Fig. 8. Assim, foram produzidas 6 membranas e incubadas em meio deficiente ou não de tiamina por 4, 7 ou 10 dias. Após cada um desses tempos, uma cultura CT e outra ST foram fixadas e imunomarcadas com anti-GalC para marcar oligodendrócitos, fotografadas usando o microscópio confocal e os parâmetros analisados de forma quantitativa.

RM Two-Way ANOVA com efeitos mistos mostrou que não houve efeito significativo do tratamento ($F_{(1,5)}=0,87$; $p=0,394$), do tempo ($F_{(2,10)}=1,05$; $p=0,387$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(2,4)}=0,06$; $p=0,938$) para o número de oligodendrócitos nas regiões GD, CA1-CA3 e no tecido total (Fig. 34).

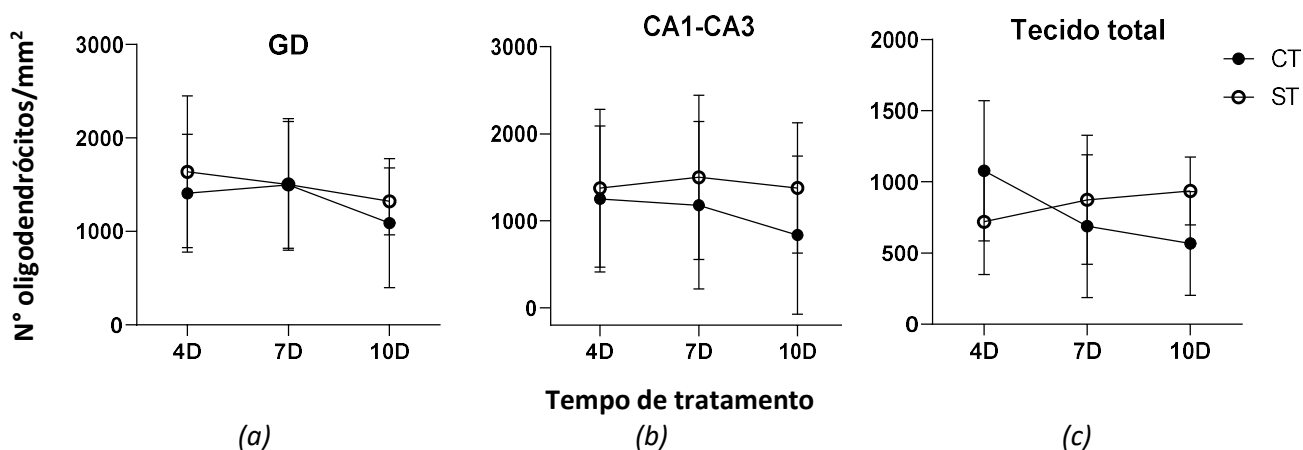


Fig. 34. Dados (Média \pm SD) do número de oligodendrócitos no GD (a), na sub-região CA1-CA3 (b) e no tecido total (c) após 4, 7 e 10 dias de tratamento (abscissa: 4D, 7D e 10D, respectivamente) em meio deficiente (ST, círculo vazio) ou não (CT, círculo cheio) de tiamina. $n=6$ para cada condição em cada tempo.

Realizamos também uma análise de correlação entre os parâmetros tamanho do tecido e o número de oligodendrócitos e encontramos uma correlação positiva no caso da sub-região GD ($r=0,55$; $p=0,041$) e CA1-CA3 ($r=0,89$; $p<0,0001$) nas culturas controle, CT. Quando analisamos as culturas deficientes em tiamina, ST, verificamos que a relação entre os dois parâmetros se manteve no GD ($r=0,77$; $p=0,0006$). Por outro lado, na sub-região CA1-CA3, a relação entre esses dois fatores foi rompida pela deficiência de tiamina (condição ST). Os gráficos correspondentes às análises de correlação encontram-se na Fig. 35.

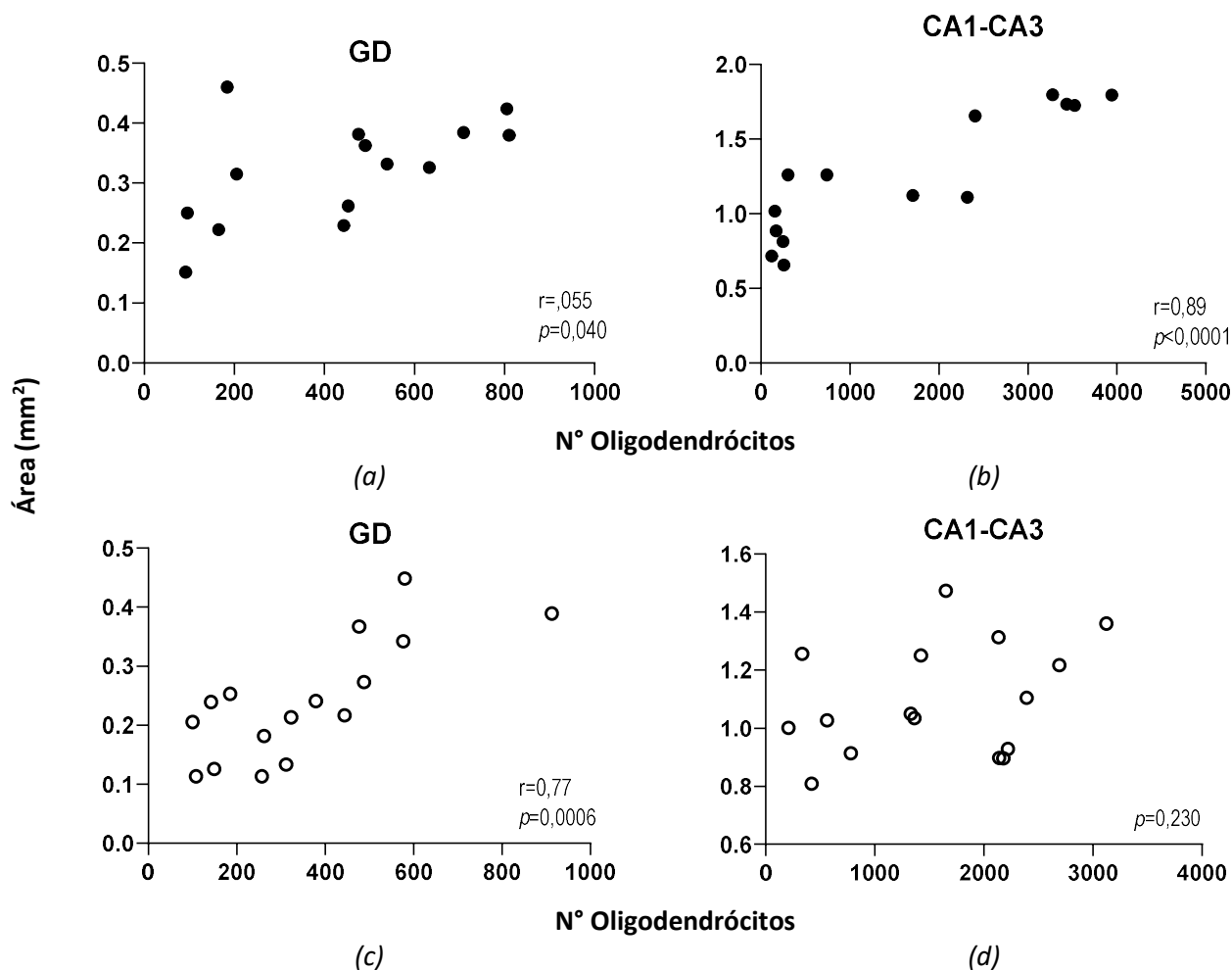


Fig. 35. Gráficos de dispersão da relação entre o número de oligodendrócitos/mm² e o tamanho do GD (a, c), e o tamanho da sub-região CA1-CA3 (painéis b, d) para as condições sem tiamina (ST, círculo vazio) e com tiamina (CT, círculo cheio). $n=6$ animais para cada tratamento. Cada ponto representa uma COH.

Usando a ferramenta COCOR, comparamos os coeficientes de correlação obtidos nas sub-regiões GD e CA1-CA3 no grupo CT e observamos que os coeficientes de correlação são significativamente diferentes ($z=-3,33$; $p=0,0009$), indicando que existe um comportamento diferente na relação entre o número de oligodendrócitos e a área quando se comparam as duas sub-regiões. Quando comparamos os dois valores de r obtidos para os grupos CT e ST na sub-região GD, verificamos que os dois coeficientes não são estatisticamente diferentes ($z=-1,02$; $p=0,306$), indicando que, no GD, as relações entre os dois parâmetros tanto na condição controle como deficiente têm o mesmo comportamento.

6. DISCUSSÃO

A escolha do hipocampo para estudar os efeitos da DT se baseia em várias razões. Em primeiro lugar, foi observado que a DT produz deficiências nos processos de aprendizado e memória espacial (de Freitas Silva *et al.*, 2009; Vedder & Savage, 2017). O hipocampo é a região do cérebro que é responsável pelos processos cognitivos e a navegação espacial (Jarrard, 1993; O'keefe & Nadel, 1979)e, portanto, os déficits observados nesses processos envolvem alguma alteração bioquímica nesta região. Porém, os estudos conduzidos até o momento para elucidar quais as modificações que a DT gera neste tecido tem produzido resultados contraditórios, com autores observando apenas modificações bioquímicas (Langlais & Savage, 1995; Ryan P. Vetreno *et al.*, 2011), neurodegeneração (Inaba *et al.*, 2016) ou perda da capacidade neurogênica do tecido (Y. Zhao *et al.*, 2009). Por outra parte, o hipocampo possui células progenitoras que ajudam na estabilidade a longo prazo das culturas organotípicas produzidas a partir deste tecido (B. Gähwiler, 1997), o que possibilita o estudo não apenas do processo de neurodegeneração, como também neurogênese em estudos futuros. A citoarquitetura do hipocampo e a composição celular também se mantêm, permitindo o estudo das possíveis modificações pela DT nas diferentes sub-regiões e nos diferentes tipos celulares. A implantação do modelo de COH para o estudo da DT é de extrema importância já que permite, não só a avaliação das modificações bioquímicas e morfológicas produzidas durante um episódio de DT, mas também o estudo da recuperação do tecido. Este modelo pode ajudar no esclarecimento dos resultados contraditórios obtidos em outros experimentos no hipocampo e contribuir para a elucidação dos mecanismos bioquímicos subjacentes. Nesta parte do trabalho, conseguimos implementar o modelo de cultura organotípica para o estudo da DT com sucesso, e obtivemos resultados ainda não descritos na literatura.

Após a determinação das condições e do tempo de estabilização das COH e, dada a inexistência de trabalhos utilizando culturas organotípicas para o estudo dos efeitos da DT, recorreremos a estudos realizados em culturas celulares para nos orientarmos na escolha do tempo de incubação em meio sem tiamina. A DT afeta de forma seletiva as regiões do cérebro, já que produz morte neuronal em regiões específicas e gera a ativação da micróglia, dos astrócitos e de células endoteliais (Ke *et al.*, 2003). Como a DT não produz morte de células da glia (Meng *et al.*, 1998), foram descartados os trabalhos de cultura usando esses tipos celulares e focamos nossa pesquisa em trabalhos que os autores usaram culturas de neurônios. Park *et al.* (2000) induziram TD numa cultura de neurônios hipocampais incorporando um inibidor competitivo dos transportadores de tiamina, o amprolium (1nM), por até 14 dias e observaram um aumento no número de células com núcleo apoptótico no

terceiro dia de tratamento. No sétimo dia, 40% dos neurônios exibiam sinais de apoptose (Larry C.H. Park *et al.*, 2000). Pesquisadores do mesmo grupo realizaram também uma co-cultura de neurônios hipocámpais com astrócitos ou micróglia, expostos ao meio de cultura deficiente de tiamina por 3 e 7 dias, observando uma perda celular no número de neurônios no sétimo dia (L. C.H. Park *et al.*, 2001). Wang *et al.* (2017) incubaram neurônios derivados de células progenitoras humanas com amprolium, por 3, 5 e 7 dias, encontrando uma perda celular no sétimo dia, de 36% para uma concentração de amprolium de 1mM e 46% para 2 mM (Wang *et al.*, 2017). Lee *et al.* (2010) também usaram amprolium (1mM) em cultura de neurônios corticais e, após 4 dias de deficiência observaram 40% de incorporação de IP nos neurônios, identificando perda da permeabilidade da membrana devido à iniciação de processos de morte celular (S. Lee *et al.*, 2010). Meng *et al.* (1998) cultivaram colículos superior e inferior por 3, 7 e 10 dias em meio sem tiamina, e observaram diferenças morfológicas e morte neuronal em culturas após apenas 3 dias de exposição. Esse último artigo foi de especial interesse porque os autores realizaram uma cultura do tecido inteiro com todos os tipos celulares, semelhante a uma cultura organotípica. Os autores também cultivaram as fatias usando meio sem tiamina em conjunto com o inibidor da enzima que converte a tiamina na sua forma ativa, a piritiamina. Nesses casos, observaram morte celular pronunciada e destruição total do tecido 7 e 10 dias após a exposição (Meng *et al.*, 1998). Considerando que o colículo é um tecido mais sensível à DT que o hipocampo (Kruse *et al.*, 2004), estabelecemos o primeiro tempo de exposição ao meio sem tiamina como sendo de 4 dias, objetivando verificar o processo inicial da deficiência, como por exemplo, possíveis modificações bioquímicas. A presença de morte neuronal após a exposição a DT no hipocampo está ainda em discussão, como já foi mencionado anteriormente. Mas, como culturas de neurônios hipocámpais parecem apresentar sinais de apoptose com apenas 3 dias de incubação com amprolium, determinamos os dias subsequentes de exposição como sendo de 7 e 10 dias, já que permitiria ver a exacerbação do quadro das modificações bioquímicas e detectar eventuais processos de morte celular nas diferentes regiões do tecido.

Usando esse desenho experimental, quisemos avaliar parâmetros neurobiológicos de sub-regiões do hipocampo durante um episódio de DT, e observamos reduções nas áreas das GD e CA1-CA3. Observações como essas já foram feitas em humanos diagnosticados com o SWK *post mortem* (Mayes *et al.*, 1988) e *in vivo* (Sullivan & Marsh, 2003; Sullivan & Pfefferbaum, 2009). Sullivan e Marsh (2003) observaram que a perda do volume do hipocampo em pacientes com SWK era comparável com as diminuições observadas em pacientes com doença de Alzheimer. Além disso, eles relacionaram essa perda com déficits cognitivos, como memória declarativa. Não apenas em pacientes com SWK e em modelos experimentais de DT foi encontrada uma diminuição nas diferentes regiões do hipocampo, mas também em outros casos clínicos. Em casos de depressão grave, foi encontrada uma redução do

volume hipocampal (Campbell *et al.*, 2004) e, especificamente, do GD (Boldrini *et al.*, 2013), que reverte nos pacientes medicados com antidepressivos. Também foram encontradas reduções nas diferentes regiões do hipocampo em casos de doença de Alzheimer (Gosche *et al.*, 2002; Lindberg *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2009), esquizofrenia (Adriano *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 1998), estresse pós-traumático (Smith, 2005), epilepsia (Lawson *et al.*, 2000) e inclusive em pacientes alcoólatras (Wilhelm *et al.*, 2008). Portanto, os resultados obtidos aqui em relação à uma redução significativa das subáreas do GD e CA1-CA3, indica que o modelo COH representa um instrumento valioso para o estudo dos mecanismos envolvidos neste fenômeno.

Interessante destacar que, ao contrário da diminuição induzida no GD e na subárea CA1-CA3, a DT causou um aumento na área total das fatias expostas ao meio sem tiamina, quando comparadas ao controle. Esse aumento pode ser explicado por uma expansão das células da glia em resposta ao insulto, a fim de dar suporte para a população neuronal. Sabe-se que as respostas inflamatórias do cérebro produzem a ativação e proliferação de micróglia e astrócitos (Kim & Joh, 2006; Nagele *et al.*, 2004). Em sujeitos pré-senis, Boekhoorn *et al.* (2006) encontraram também uma redução do tamanho das áreas correspondentes à região CA1-CA2, assim como um aumento da proliferação glial e vascular em todas as regiões do hipocampo (Boekhoorn *et al.*, 2006). Todd & Butterworth (1999) usaram um modelo animal deficiente de tiamina, tratando ratos com piritiamina, e observaram, analisando o cérebro todo, um aumento do número de células de micróglia ativada, que foi incrementando ao longo da deficiência, chegando ao valor máximo no dia da perda do reflexo de endireitamento pelos animais com deficiência grave. Nesse mesmo dia, observaram um número de astrócitos aumentado combinado com uma diminuição no número de neurônios (Todd & Butterworth, 1999). Park *et al.* (2001) mostraram que a co-cultura de neurônios com astrócitos ou com micróglia tem um efeito protetor nos neurônios submetidos à DT. No caso das COH, após a estabilização das culturas, o tecido torna-se uma monocamada celular, já que as células expostas ao ar têm mais dificuldade para receber nutrientes, que são difundidos do meio de cultura por capilaridade e, portanto, acabam morrendo. Assim, é de se esperar que, caso ocorra uma expansão da glia, ela ocorra nas margens do tecido e não na superfície dele, aumentando a área da fatia. Sendo que o número de neurônios nas fatias expostas à deficiência é igual ou menor ao número do controle, como discutido adiante, o aumento na área da fatia só pode ser atribuído a um aumento das células da glia. Assim, a geração de novas células gliais nas COH expostas à DT parece funcionar como uma reação compensatória para proteger os neurônios sobreviventes e também favorecer a formação de novos neurônios. Como foi discutido anteriormente, Todd e Butterworth (1999) mostraram que há um aumento do número de astrócitos e micróglia durante um episódio de DT em ratos. Outros grupos também observaram um aumento do número de células da micróglia em resposta à DT (Calingasan *et al.*, 1999) e, portanto, futuros experimentos

usando COH podem ser feitos a fim de testar essa hipótese de que a expansão do tecido submetido à DT se deve à proliferação de células da glia.

Também, foi observada a perda de neurônios no sétimo dia da deficiência em todas as regiões do hipocampo. Interessante que, entre o sétimo e o décimo dia sem tiamina, observa-se uma aproximação dos valores de densidade de neurônios dos grupos ST e CT, indicando algum tipo de reação para recuperar o número de neurônios. Assim, as culturas deficientes, em relação ao número de neurônios, ficam estatisticamente indistinguíveis das fatias controle. Até hoje em dia existem diferentes opiniões do que acontece no hipocampo num episódio de DT. Na maioria dos trabalhos realizados, os autores só observam o comportamento do tecido após um episódio de DT e um período de recuperação variável (Inaba *et al.*, 2016; Irle & Markowitsch, 1983; Langlais & Savage, 1995; Ryan P Vetreno *et al.*, 2009), o que poderia explicar por que os resultados obtidos são tão díspares. Além disto, os métodos de geração da DT são os mais diversos, sendo alguns através da dieta e outros pela administração de fármacos. No presente trabalho, conseguimos observar a cinética dos processos de neurodegeneração no hipocampo **durante o processo de DT** e observamos que, do 7º ao 10º dia, ocorrem mecanismos que inibem a perda neuronal até ao ponto desta variável se igualar aos níveis da condição controle. Esses mecanismos podem ser uma ativação dos processos de diferenciação de células progenitoras, acionados pelo insulto, no caso a DT, com posterior migração dos novos neurônios para as regiões afetadas. Ou seja, por um determinado tempo, mesmo na presença do insulto, o hipocampo é capaz de acionar um mecanismo de defesa para preencher a perda de neurônios. Sabemos que para proceder uma diferenciação celular, o tecido demanda energia e, no caso de um tecido sem tiamina, o sistema deve lançar mão de outras alternativas não dependentes do ciclo do ácido cítrico, o que a longo prazo pode ser um dos motivos do agravamento do quadro de deficiência, causando distúrbios neurológicos graves devido a mudanças de pH. Após a recuperação da deficiência, o número de neurônios permanece constante, similar ao controle, pelo menos até onde medimos. Esse achado é mais uma evidencia da relevância do modelo da COH, para o estudo do processo de neurodegeneração e neurogênese no hipocampo. Além disto, os resultados apresentados em relação aos efeitos sobre as células neuronais e não-neuronais indiretamente corroboram a capacidade plástica e de neuroregeneração do hipocampo em condições adversas, como a DT.

O aumento de proliferação celular e neurogênese evidenciado em diferentes patologias tem sido mostrado em vários tipos de modelos animais. Após um processo de isquemia, observa-se a morte e posterior recuperação de neurônios na região CA1 em roedores (Bendel *et al.*, 2005; Petit & Pulsinelli, 1984; Salazar-Colocho *et al.*, 2008). Convulsões tipo epiléticas produzem morte neuronal no GD, seguida de processos de diferenciação celular para produção de novos neurônios, também em ratos (Benzon *et al.*, 1997; Jessberger *et al.*, 2005). O traumatismo cranioencefálico também produz a

morte e posterior produção de novos neurônios (D. Lu *et al.*, 2007). Porém, o efeito regenerativo do hipocampo é difícil de avaliar em doenças neurológicas crônicas, principalmente porque o insulto que leva à morte neuronal continua presente. Nestes casos, dependendo da intensidade e duração do insulto, a resposta neurogênica pode ser suficiente para funcionar como uma resposta compensatória que permita preservar as funções hipocampais e minimizar o impacto na perda neuronal após um insulto neurodegenerativo, como a DT. Alguns estudos têm avaliado a presença de neurogênese e lesões no hipocampo no decorrer da deficiência. Zhao *et al.* (2008) administraram uma dieta deficiente de tiamina a camundongos e analisaram os padrões de diferenciação de células progenitoras em diferentes momentos da deficiência. Eles observaram uma diminuição progressiva das células que incorporaram BrdU no GD começando no nono dia da deficiência até o dia 25, assim como uma diminuição da produção de novos neurônios (N. Zhao *et al.*, 2008). Porém, eles não encontraram, no nono dia, diferença no número de neurônios na região GD entre o deficiente e o controle. Assim, eles postularam que a DT parece afetar a neurogênese, mas não induz a morte de neurônios já maduros. Porém, eles não investigaram o que acontece com os neurônios em dias subsequentes da DT. A administração de tiamina no nono dia da deficiência aumenta novamente o número de células que incorporaram BrdU e a produção de novos neurônios. No presente trabalho, o hipocampo perde a conexão com outras regiões cerebrais e com os vasos sanguíneos que poderiam fornecer tiamina de outras regiões do corpo e, portanto, é de se esperar que os sinais da deficiência apareçam antes do observado *in vivo*. Assim, podemos estabelecer um paralelo entre as observações realizadas por Zhao *et al.* no nono dia da DT e a contagem de neurônios no quarto dia de incubação das COH. Diferentes hipóteses podem ser testadas através da realização de estudos usando COH, como por exemplo, através da incorporação de BrdU para observar se a incorporação de tiamina ao meio (recuperação) aumenta a neurogênese, ou seja, se os neurônios observados no período de recuperação são produzidos após a incorporação de tiamina ou se os neurônios observados no décimo dia da deficiência sobrevivem até a recuperação.

Vetreno (2011) analisou o GD de ratos em diferentes etapas do processo de DT usando piritiamina para induzir a deficiência. Procederam a avaliar a sub-região após 8 ou 15 dias do começo da administração da piritiamina e 24 horas ou 28 dias depois da administração de tiamina (recuperação). Eles não encontraram diferenças no volume do GD nos quatro tempos, mas observaram um aumento inicial na proliferação de células progenitoras, seguido de uma redução crônica da neurogênese hipocampal após a recuperação (Vetreno, 2011), o que foi diferente das observações feitas por Zhao *et al.* (2008). Eles teorizam, entre outras possibilidades, que o aumento da incorporação de BrdU pode dever-se a efeitos compensatórios para manter a homeostase hipocampal durante o insulto. No presente trabalho, não observamos diferenças na contagem do número de neurônios em nenhuma

sub-região do hipocampo, entre o 10º dia sem tiamina e após 7 dias em meio contendo tiamina (recuperação do tecido). Porém, esta observação não pode ser atribuída a um aumento na neurogênese sem um estudo de incorporação de BrdU. Interessante mencionar que encontramos um processo de neuroregeneração **durante** uma fase do episódio de DT, que não foi mostrado ainda em nenhum trabalho, até onde temos conhecimento. Esse fato pode ser uma das razões para explicar a grande quantidade de controvérsias em relação às disfunções do hipocampo na DT.

A análise de correlação entre o tamanho das regiões e o número de neurônios também é interessante de se discutir. A perda de correlação entre o número de neurônios e a área do hipocampo já foi observada em trabalhos anteriores focando o estudo de outras doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (Bobinski *et al.*, 1996; Rössler *et al.*, 2002; Šimić *et al.*, 1997), depressão (Boldrini *et al.*, 2013), epilepsia (Lencz *et al.*, 1992) e também no envelhecimento fisiológico (Schuff *et al.*, 1999). Porém, de forma interessante, no presente trabalho, considerando o efeito da DT sobre a relação número de neurônios e tamanho da área, observamos que o GD tem o mesmo comportamento nas COH incubadas com meio sem ou com tiamina, já que não encontramos uma correlação significativa entre o número de neurônios e a área para nenhum dos três tempos de incubação (4, 7 e 10 dias). Por outro lado, na sub-região CA1-CA3, observamos uma correlação positiva significativa no grupo controle no 10º dia de incubação (equivalente ao 24º dia de manutenção da COH) e, no grupo deficiente, observamos correlações significativas no 4º e no 10º dia de incubação. Isso pode ser explicado pela ocorrência de uma perda neuronal induzida pela deficiência, levando à produção de novos neurônios para se contrapor a esta perda. No sétimo dia de incubação, a perda celular é grande o suficiente para romper com a correlação observada no 4º dia de incubação. Porém, no décimo dia provavelmente, graças a um processo de repopulação neuronal, observamos a restauração da correlação entre número de neurônios e a área da sub-região. Assim, pode-se pensar que a área da sub-região CA1-CA3 dependente do número de neurônios na presença de um insulto, explicando não só a perda celular observada, como também a restauração da correlação quando o tecido é regenerado, o que foi observado aqui no 10º dia. Esse achado indica uma maior sensibilidade da sub-região CA1-CA3 comparada ao GD. Foi mostrado, em outros trabalhos, que os neurônios piramidais das regiões CA1 e CA3 são mais susceptíveis à neurodegeneração que as células de outras regiões do hipocampo em condições como epilepsia, acidente cerebral-vascular e doença de Alzheimer (Mattson *et al.*, 1989), e que essa vulnerabilidade seletiva parece estar relacionada ao excesso de liberação de glutamato (Butler *et al.*, 2010). Sabe-se que o aumento da liberação de glutamato é parte da patofisiologia da DT (Langlais *et al.*, 1996) e, portanto, uma das possíveis causas da morte celular encontrada principalmente na sub-região CA1-CA3. Também, observamos uma correlação positiva entre o número de neurônios e o tamanho da sub-região CA1-CA3 na cultura em condição controle no

décimo dia. Esse dado pode ser o resultado da ocorrência de um processo de envelhecimento, que se manifesta no 10º dia, reforçando a relação entre tamanho da região e número de neurônios. Como foi mencionado anteriormente, o décimo dia de incubação em meio sem ou com tiamina corresponde ao dia 24 da obtenção das COH (14 dias de estabilização e 10 dias de tratamento), portanto, a presença de uma correlação significativa entre a área e o número de neurônios no 10º dia pode ser um indicador de envelhecimento da cultura, onde poderia estar ocorrendo um aumento da perda neuronal causada pelo envelhecimento, refletindo no tamanho da área. Foi mostrado, em outros trabalhos, que existe um aumento constante da probabilidade de encontrar atividade epileptiforme nas culturas organotípicas entre 11 e 40 dias de incubação, principalmente na região CA1, provavelmente devido à perda de equilíbrio entre diferentes neurotransmissores (McBain *et al.*, 1989). Outros autores também mostraram que, após 18 dias de incubação, a viabilidade da fatia diminui (De Simoni & Yu, 2006; Gogolla *et al.*, 2006; Nägerl *et al.*, 2004). Assim, a instauração de uma correlação entre a área da sub-região e o número de neurônios pode dever-se a um processo de envelhecimento da cultura. Esse achado é acompanhado também de um aumento na produção de BDNF, como será discutido na Parte 3 do presente trabalho, acrescentando indícios de que a cultura parece estar atravessando um processo de envelhecimento. Por outro lado, a correlação entre a área e o número de oligodendrócitos se mantém ao longo do episódio de deficiência no GD, mas não na região CA1-CA3. Isso pode ser interpretado como uma perda gradativa da correlação nessa sub-região, que pode ser um indicador da perda da morfologia da região. Existem evidências de uma relação significativa entre o número de oligodendrócitos no hipocampo e a manifestação de déficits cognitivos, especialmente na região CA3, em pacientes com esquizofrenia (Falkai *et al.*, 2016). Sabe-se também que uma das alterações descritas em casos de esquizofrenia é a perda neuronal ou disfunções no processo de neurogênese. Também, podemos deduzir que, como o número de oligodendrócitos não aumenta ao longo da deficiência e a correlação entre o número de oligodendrócitos e a área no GD se mantém constante, não há um aumento da diferenciação das células progenitoras para oligodendrócitos no decorrer da deficiência, nem morte dos oligodendrócitos provocada pela DT. Interessante que as células progenitoras possuem receptores de glutamato, e a ativação destes receptores impede a proliferação e maturação destas células em oligodendrócitos (Gallo *et al.*, 1996). Como a DT parece envolver um aumento da liberação de glutamato (Langlais *et al.*, 1996), esse aumento pode estar envolvido na repressão da diferenciação de novos oligodendrócitos no hipocampo.

Também foi analisada a correlação entre número de neurônios e área após a recuperação (7 dias de cultura em meio com tiamina, após um episódio de deficiência de 10 dias) e foi observada uma correlação positiva significativa tanto no grupo CT como no grupo ST, usando os dados juntos de GD+CA1-CA3. Porém, uma análise estatística da similaridade entre os dois coeficientes de correlação

mostrou que eles são significativamente diferentes. Embora o número de animais utilizado nesse experimento foi pequeno (5 animais para cada tratamento), podemos observar que o comportamento dos dois tratamentos é diferente. Nos gráficos de dispersão onde a correlação entre esses parâmetros pode ser visualizada, observa-se uma maior dispersão dos dados no grupo ST quando comparado com CT. Podemos inferir que o insulto induzido pela deficiência e a posterior recuperação do tecido provocaram uma re-população dos neurônios atingidos, mas alguma disfunção metabólica persiste.

Finalmente, foi analisada a incorporação de iodeto de propídio (IP) em neurônios a fim de avaliar possíveis processos de morte celular. O IP é incorporado em células necróticas ou em apoptose tardia, mas não é incorporado nos estágios iniciais das células apoptóticas (Crowley *et al.*, 2016). Portanto, esse método permite distinguir morte celular por necrose de morte celular por apoptose. Não foi encontrada diferença em nenhuma das sub-regiões do hipocampo analisadas entre o grupo controle (CT) e o deficiente (ST). Uma das conclusões possíveis deste experimento é que a morte celular dos neurônios expostos a DT no hipocampo não se produz por necrose. Porém, a existência de uma correlação entre a porcentagem de células duplamente marcadas (NeuN⁺/IP⁺) e a densidade de neurônios no grupo CT, pode ser explicado pela morte celular que ocorre fisiologicamente nas culturas controle. Ou seja, quanto maior o número de neurônios, maior a possibilidade de ter células atravessando processos fisiológicos de morte. Pode ser observado que a porcentagem de células NeuN⁺/IP⁺ (neurônios que atravessam um processo de morte celular) nas culturas controle é menor, em todos os casos, ao 5% do total dos neurônios (células NeuN⁺). Porém, no grupo deficiente, embora a porcentagem de células duplamente marcadas também é pequena, não existe uma correlação entre a densidade neuronal e a porcentagem de células NeuN⁺/IP⁺. Portanto, a marcação não depende do número de neurônios e sim, provavelmente, de outros processos acontecendo no tecido devido à DT. Entretanto, estudos posteriores devem ser conduzidos a fim de esclarecer o papel da necrose no hipocampo exposto à DT. No presente trabalho, utilizamos o método de Brana *et al.* (2002) para estudar a incorporação de IP em neurônios de COH (Brana *et al.*, 2002). Este método utiliza uma exposição de IP às culturas por 1 hora. Assim, a marcação pode ter sido insuficiente porque só conseguimos observar as células que estavam entrando em necrose apenas em um período de 1 hora. Avaliação similar poderia ser feita no 7º dia de deficiência, que é o dia que foi observada uma maior diminuição no número de neurônios, adicionando o IP no meio de incubação 48 horas antes. Deste modo, seria possível avaliar se os processos de neurodegeneração, que culminam com a diminuição do número de neurônios observada no 7º dia, são necróticos ou apoptóticos. A perda de correlação no grupo ST permite pensar que existem processos necróticos acontecendo no hipocampo nas regiões GD e CA1-CA3 e a mudança do desenho experimental permitiria contribuir para esclarecer essa questão. Outra estratégia que poderá ser usada em estudo posterior é realizar uma tripla marcação

com anti-NeuN, IP e Anexina V a fim de observar concomitantemente a necrose e a apoptose nos neurônios presentes nas fatias expostas à DT.

Evidências de necrose foram encontradas em outros trabalhos com DT em diferentes regiões cerebrais: tálamo (Harata & Iwasaki, 1995; Inaba *et al.*, 2016; McRee *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 1981), neocórtex (Harata & Iwasaki, 1995), corpos mamilares (Watanabe *et al.*, 1981) e colículo inferior (Hazell *et al.*, 1998). Porém, como foi discutido, os resultados de trabalhos realizados no hipocampo não permitem se chegar a um consenso sobre as consequências dos efeitos da DT neste tecido. São poucos os autores que encontraram neurodegeneração produzida por DT no hipocampo, e não há evidências do tipo de morte celular (*i.e.*, necrose ou apoptose) provocada pela deficiência (Irle & Markowitsch, 1983; Sullivan & Pfefferbaum, 2009). Como se sabe, os mecanismos que levam à morte celular envolvem disfunções não apenas de um tipo celular presente no hipocampo, mas podem afetar outras células ou componentes extracelulares do tecido. Neste sentido, o modelo da COH poderá contribuir de forma importante na compreensão de um fenômeno complexo presente nos processos neurodegenerativos, característicos não apenas da SWK, mas também de várias doenças neurodegenerativas.

Importante finalizar essa discussão destacando que, embora esse trabalho mostrou evidências da presença de um processo neurodegenerativo induzido pela DT e posterior recuperação do tecido, resultado inédito na literatura, mais estudos devem ser realizados a fim de reforçar esse achado e avaliar se dependem de fatores como a idade dos animais dos quais se obtêm as fatias de hipocampo. As COH utilizadas aqui foram produzidas a partir de animais de aproximadamente 7 dias de idade, que é o momento ótimo para a produção das fatias (Muller *et al.*, 1997; Stoppini *et al.*, 1991), como descrito na Parte 1 do presente trabalho. Assim, no momento da condução dos experimentos, e supondo que o desenvolvimento das fatias é semelhante ao desenvolvimento do cérebro dos animais (D. Debanne *et al.*, 1995), as fatias seriam comparáveis a hipocampos extraídos de animais de aproximadamente 21 dias (7 dias de vida do animal mais 14 dias de estabilização da fatia no meio de cultura). Poucos estudos têm sido realizados em animais neonatais a fim de elucidar os efeitos da DT no hipocampo (Bâ, 2008, 2017; Bâ *et al.*, 1999, 2005). Corroborando os dados do presente trabalho, esses autores também observaram a perda de neurônios especificamente na sub-região CA1-CA3.

Assim, o uso do modelo da COH para estudar os mecanismos de neurodegeneração induzidos pela DT, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos responsáveis por relações entre neurônios e glia, e também pela perda de associações entre diferentes componentes que estabelecem comunicação entre essas células. Além disto, os dados do presente estudo abrem perspectivas sobre a importância de estudos em modelos *in vivo* com objetivos de esclarecer o papel dos oligodendrócitos

em disfunções cognitivas causadas pela DT ou outros insultos neurodegenerativos. Por outro lado, a COH nas condições estabelecidas, não apenas é sensível aos efeitos da DT, mas também mantém as condições neurobiológicas que as torna capazes de reverter o processo, após um determinado período de tratamento.

PARTE 3

Determinação da produção de BDNF durante e após um episódio de deficiência de tiamina em modelo de Cultura Organotípica de Hipocampo.

7. RESULTADOS

Sabendo que o modelo das culturas organotípicas é adequado para o estudo dos efeitos da DT em diferentes sub-regiões do hipocampo, seguindo os objetivos do presente estudo, o próximo passo foi analisar a produção de BDNF em neurônios e oligodendrócitos, após a exposição das fatias a um episódio de DT por 4, 7 e 10 dias (delineamento experimental na Fig. 8).

7.1. EFEITO DA DT SOBRE OS NÍVEIS DE BDNF EM NEURÔNIOS

Após a produção das culturas e a incubação por 4, 7 e 10 dias na presença (CT) ou não (ST) de tiamina, as membranas foram fixadas, imunomarcadas e fotografadas. Posteriormente, foi analisado o número de células duplamente marcadas (BDNF⁺/NeuN⁺) para cada um dos tempos de incubação (Fig. 36).

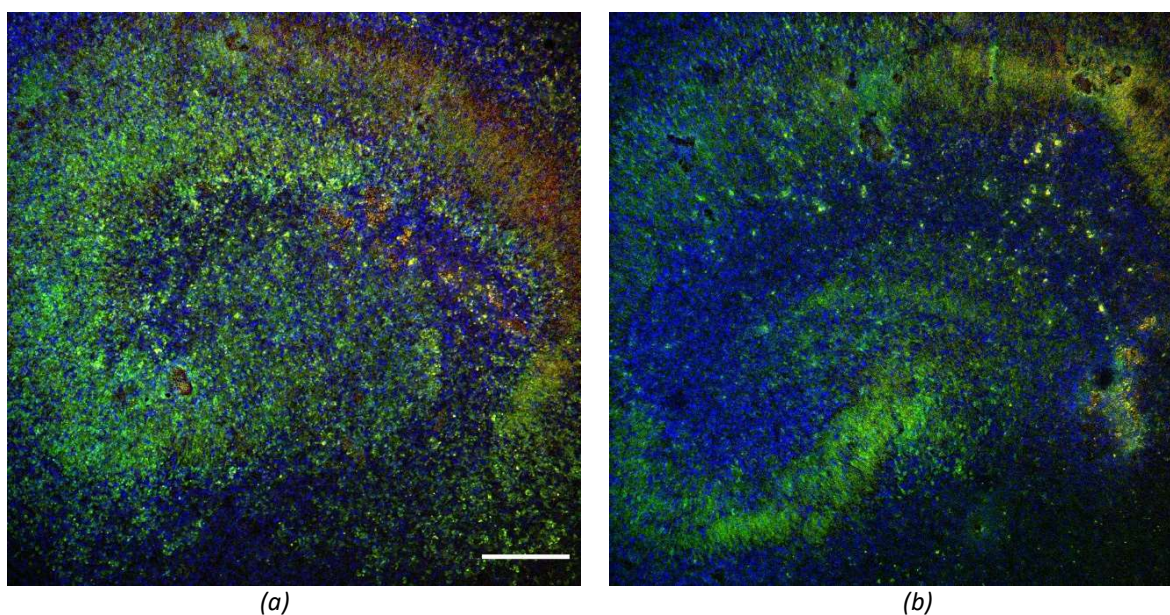


Fig. 36. Imagens representativas utilizadas para obter os dados quantitativos. (a) tecido exposto por 7 dias de cultura em meio normal (CT), (b) tecido exposto por 7 dias em meio de cultura sem tiamina (ST). Em verde, marcação para neurônio (anti-NeuN), em vermelho, marcação para BDNF (anti-BDNF). Em azul, núcleo de todas as células (DAPI). A linha horizontal branca representa 200 μm .

Em relação ao número de células duplamente marcadas por mm^2 no **GD**, *RM Two-Way ANOVA* com efeitos mistos mostrou efeito significativo do tempo ($F_{(2,22)}=6,23$, $p=0,007$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{(1,11)}=0,01$, $p=0,913$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(2,11)}=3,32$, $p=0,075$) (Fig. 37, a). O pós-teste de Sidak mostrou diferença significativa entre o dia 4 e o dia 10 na condição ST ($p=0,001$).

No caso da sub-região **CA1-CA3**, ANOVA mostrou efeito significativo do tempo ($F_{(2,22)}=7,10$, $p=0,004$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{(1,11)}=0,01$, $p=0,929$) e nem interação entre os fatores ($F_{(2,10)}=1,75$, $p=0,223$). O pós-teste de Sidak mostrou que existe diferença significativa entre o dia 4 e o dia 7 ($p=0,013$) no grupo CT e entre o dia 4 e o dia 10 ($p=0,006$) no grupo ST (Fig. 37, b).

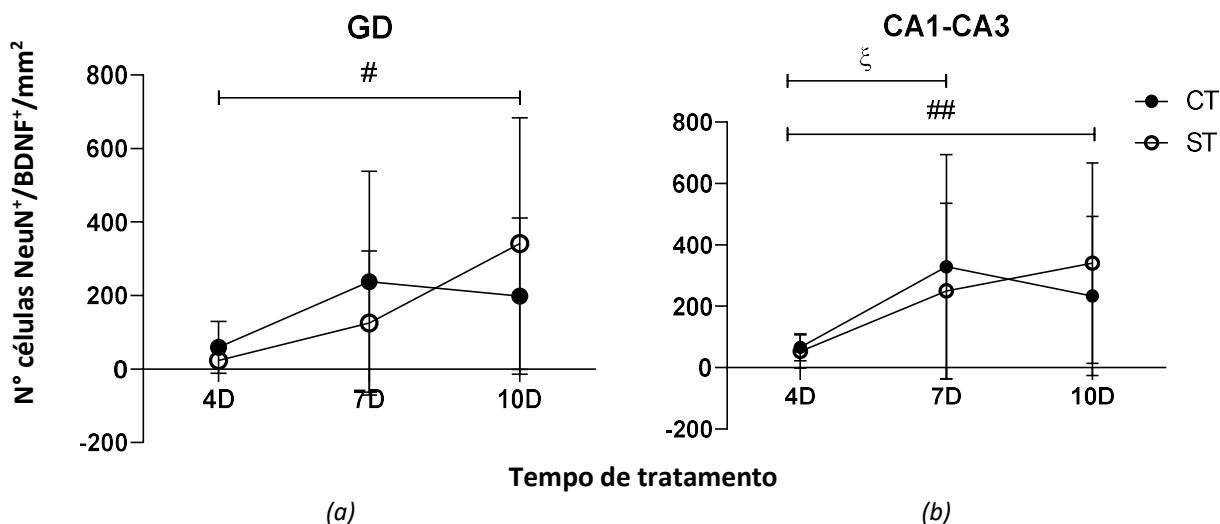


Fig. 37. Média \pm SD da densidade de neurônios expressando BDNF (marcação com NeuN⁺/BDNF⁺) na região GD (painel a) e CA1-CA3 (painel b) para as condições com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina (ST, círculo vazio) nos tempos de incubação 4, 7 e 10 dias. $n=12$ para cada ponto; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ entre 4D e 10D na condição ST, § $p<0,05$ entre 4D e 7D na condição CT.

No caso do **tecido total** (Fig. 38), ANOVA também mostrou efeito significativo do tempo ($F_{(2,22)}=7,38$, $p=0,034$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{(1,11)}=0,10$, $p=0,764$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(2,10)}=2,89$, $p=0,102$). O pós-teste de Sidak revelou uma diferença significativa entre os dias 4 e 10 na condição ST ($p=0,049$), e entre o dia 4 na condição CT e o dia 10 na condição ST ($p=0,030$).

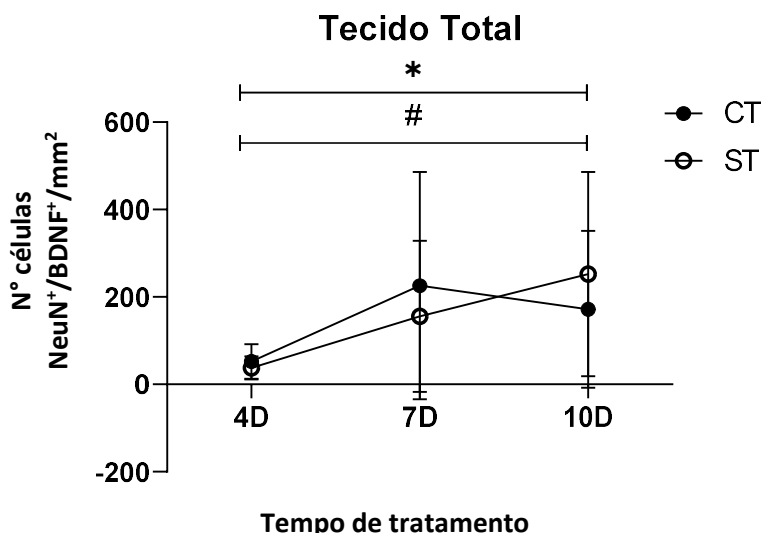


Fig. 38. Média \pm SD da densidade de neurônios que expressam BDNF (marcação com NeuN⁺/BDNF⁺) no tecido total (fatia do hipocampo) para as condições com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina (ST, círculo vazio) nos tempos de incubação 4, 7 e 10 dias. $n=12$ para cada um dos pontos. # $p<0,05$ para comparações entre tempos de incubação na condição ST e * $p<0,05$ para comparações entre CT e ST.

Após comparar o número de neurônios contendo BDNF (marcados com NeuN⁺/BDNF⁺) nas duas condições CT e ST em três tempos de incubação (4D, 7D e 10D), decidimos comparar a porcentagem desse tipo de células em relação ao número de neurônios totais por mm² (considerado 100%), em cada uma das regiões (Fig. 39). Assim, *RM Two-Way* ANOVA com efeitos mistos, mostrou no **GD** um efeito significativo do tempo ($F_{(92,22)}=10,89$, $p=0,0005$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{(1,11)}=0,37$, $p=0,555$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(2,10)}=2,38$, $p=0,143$). O pós-teste de Sidak mostrou diferença significativa entre os dias 4 e 10 na condição ST ($p=0,010$) e entre o dia 4 na condição CT e o dia 10 da condição ST ($p=0,018$).

Na sub-região **CA1-CA3**, ANOVA mostrou efeito significativo do tempo ($F_{(2,22)}=10,75$, $p=0,0006$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{(1,11)}=0,001$, $p=0,980$) e nem interação entre os dois fatores ($F_{(2,10)}=2,13$, $p=0,169$). O pós-teste evidenciou diferenças significativas entre os dias 4 e 7 ($p=0,044$) e entre os dias 4 e 10 ($p=0,018$) na condição ST e entre o dia 4 na condição CT e o dia 10 na condição ST ($p=0,026$).

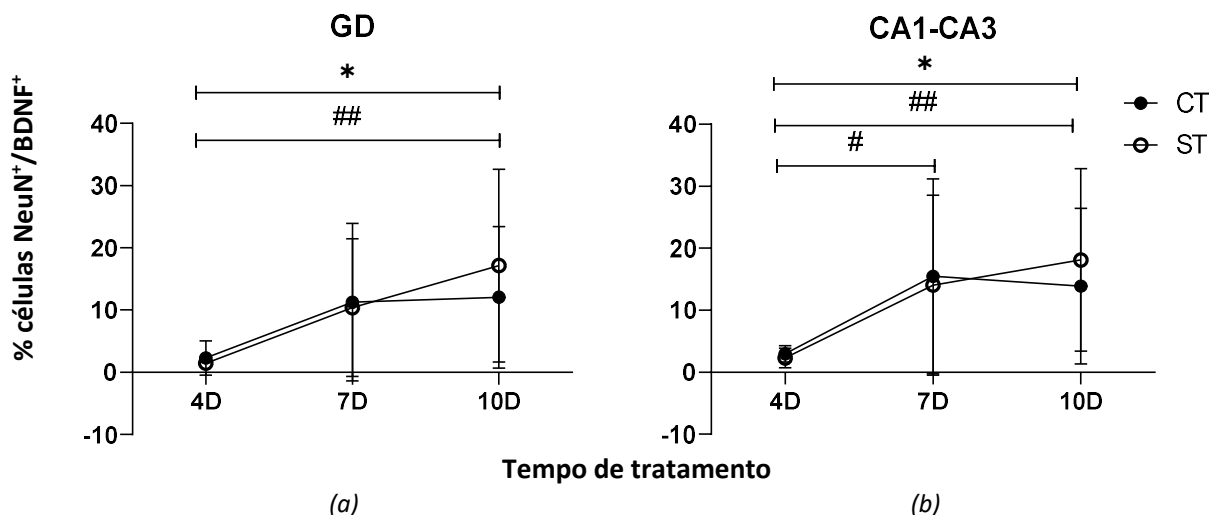


Fig. 39. Média \pm SD da porcentagem de neurônios que expressam BDNF (marcação com NeuN⁺/BDNF⁺) nas sub-regiões do GD (painel a) e CA1-CA3 (painel b) para as condições com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina (ST, círculo vazio) nos tempos de incubação 4, 7 e 10 dias. $n=12$ para cada ponto; * $p<0,05$ e ## $p<0,01$ para comparações entre tempos na condição ST, * $p<0,05$ para comparações entre CT e ST.

Com relação à porcentagem do número de neurônios expressando BDNF em relação ao número total de neurônios, considerado 100%, *RM Two-Way ANOVA* com efeitos mistos mostrou no **tecido total** (Fig. 40), efeito significativo do tempo ($F_{(2,22)}=10,65$, $p=0,001$) e interação significativa entre os fatores tempo e tratamento ($F_{(2,10)}=6,78$, $p=0,014$), mas não houve efeito do tratamento ($F_{(1,11)}=1,44$, $p=0,255$). O pós-teste de Sidak mostrou diferenças significativas entre os dias 4 e 10 na condição ST ($p=0,007$), entre o dia 4 na condição CT e o dia 10 na condição ST ($p=0,010$) e entre CT e ST no 10º dia de incubação ($p=0,035$).

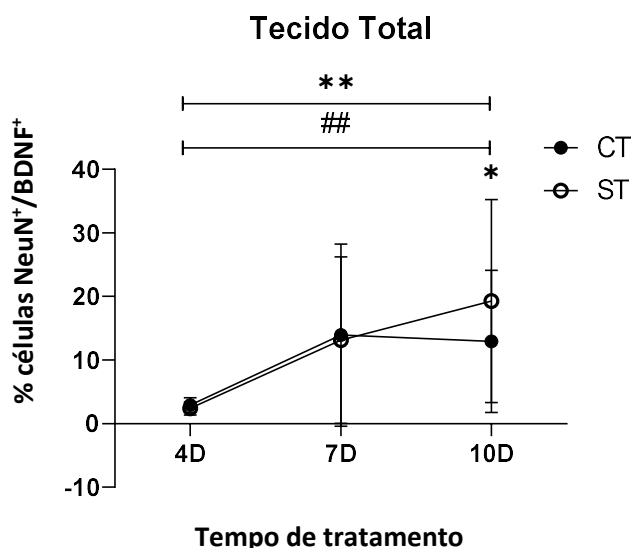


Fig. 40. Média \pm SD da porcentagem de neuronios que expressam BDNF (marcados com NeuN⁺/BDNF⁺) no tecido total na condição com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina (ST, círculo vazio) nos tempos de incubação de 4, 7 e 10 dias. $n=12$; ## $p<0,01$ para comparações na condição ST; * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ para comparações entre CT e ST.

Com a finalidade de avaliar se havia correlação significativa entre a porcentagem de neurônios expressando BDNF e o número de neurônios totais por mm^2 no GD e na sub-região CA1-CA3 (Fig. 41) análises foram realizadas na condição CT usando o teste de Pearson. Encontramos correlações significativas entre as duas variáveis no GD ($r=0,75$, $p<0,0001$) e também em CA1-CA3 ($r=0,59$, $p=0,005$). De forma similar, ao analisar a relação entre porcentagem de neurônios expressando BDNF e número de neurônios totais na condição ST, também encontramos correlações significativas tanto na sub-região GD ($r=0,74$, $p=0,0003$) como em CA1-CA3 ($r=0,79$, $p<0,0001$).

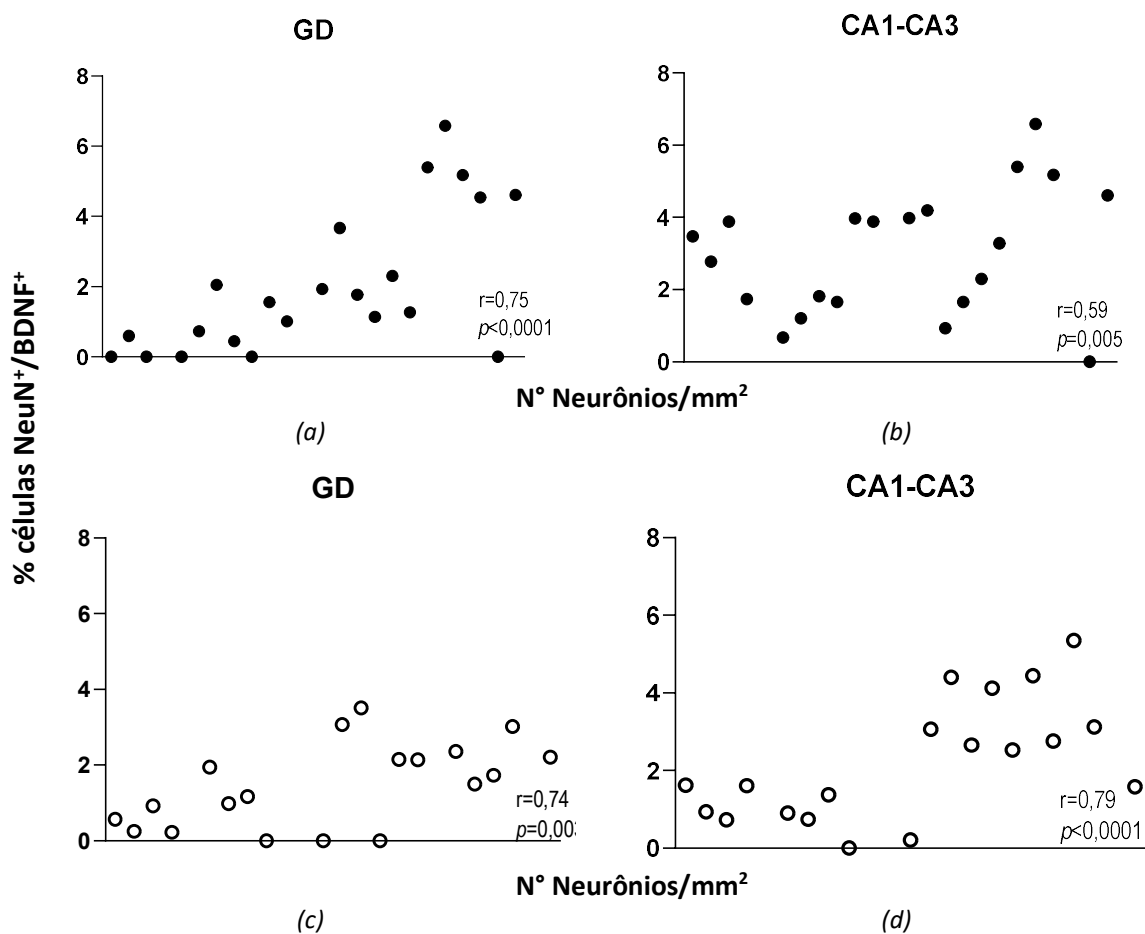


Fig. 41. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios totais/ mm^2 e a porcentagem de neurônios que expressam BDNF (marcados com BDNF⁺/NeuN⁺) no GD (a, c), e na sub-região CA1-CA3 (b, d) nas condições sem tiamina (ST, círculo vazio) e com tiamina (CT, círculo cheio). $n=8$ para cada condição.

Após esta análise, decidimos investigar se os coeficientes de correlação entre esses dois parâmetros seriam similares ou não nas diferentes sub-regiões, considerando as condições com e sem tiamina. Com esse objetivo, conduzimos análises de comparações entre coeficientes de correlação para duas amostras sobrepostas de grupos dependentes, usando a ferramenta COCOR (Diedenhofen & Musch, 2015). Não encontramos diferenças entre os coeficientes de correlação observados nas sub-regiões GD e CA1-CA3 ($z=-0,93$, $p=0,352$) na condição CT, nem entre as sub-região GD ($z=-0,06$, $p=0,955$) e CA1-CA3 ($z=-0,88$, $p=0,381$) quando comparadas as condições CT e ST. Portanto, as relações

entre neurônios totais e neurônios expressando BDNF são iguais nas duas sub-regiões na presença ou ausência de tiamina nos tempos de incubação estudados.

7.2. RECUPERAÇÃO DOS EFEITOS DA DT SOBRE A PRODUÇÃO DE BDNF EM NEURÔNIOS

Em seguida, avaliamos se os efeitos da DT sobre a produção de BDNF por neurônios do hipocampo, que foi significativamente menor após 10 dias de incubação em meio ST comparado com a condição CT (Fig. 40), seriam revertidos após 7 dias de incubação em meio com tiamina. O delineamento experimental compreendeu incubações das culturas por 10 dias em duas condições ST seguido de mais 7 dias de incubação em meio com tiamina (uma semana de recuperação) denominado ST-REC e culturas controle (CT) mantidas 17 dias em meio com tiamina. Portanto, no total foram 17 dias de incubação sendo dez dias no meio sem tiamina seguidos de 7 dias em meio com tiamina na condição ST-REC e 17 dias no meio com tiamina na condição CT. Teste *t* para amostras pareadas mostrou que não existem diferenças significativas entre o número de neurônios que expressam BDNF na condição ST-REC, ou seja, após 7 dias de recuperação, e na condição CT em tempo de incubação correspondente (Fig. 42), no GD ($p=0,783$) e nem na sub-região CA1-CA3 ($p=0,701$).

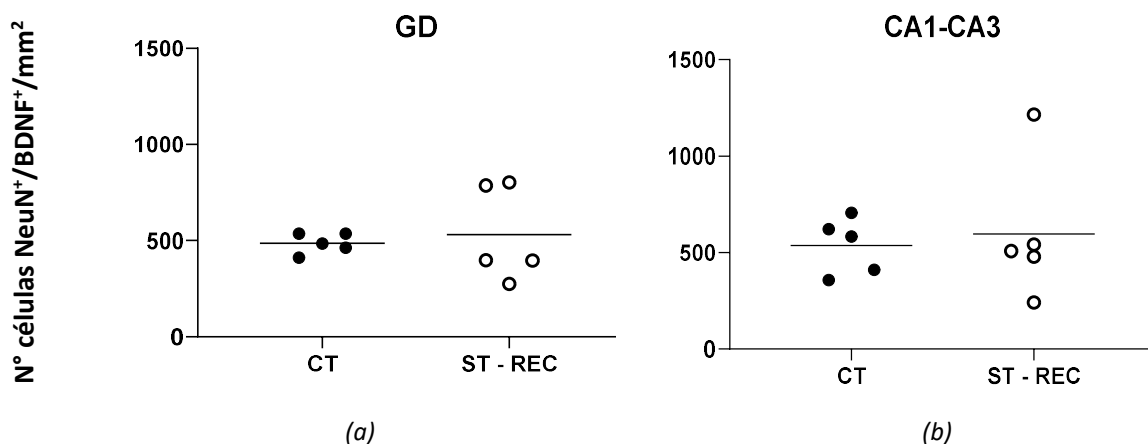


Fig. 42. Número de neurônios que expressam BDNF (marcados com BDNF⁺/NeuN⁺) no GD (painel a) e na sub-região CA1-CA3 (painel b) para as condições com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina após 7 dias de recuperação, (ST-REC, círculo vazio). $n=5$ para cada condição nas duas subregiões. As linhas horizontais representam a média dos valores.

Analisando a porcentagem de neurônios produtores de BDNF (Fig. 43) em relação ao total de neurônios (considerado 100%), não observamos diferenças significativas entre as condições CT e ST-REC no GD ($p=0,094$) e nem na sub-região CA1-CA3 ($p=0,701$).

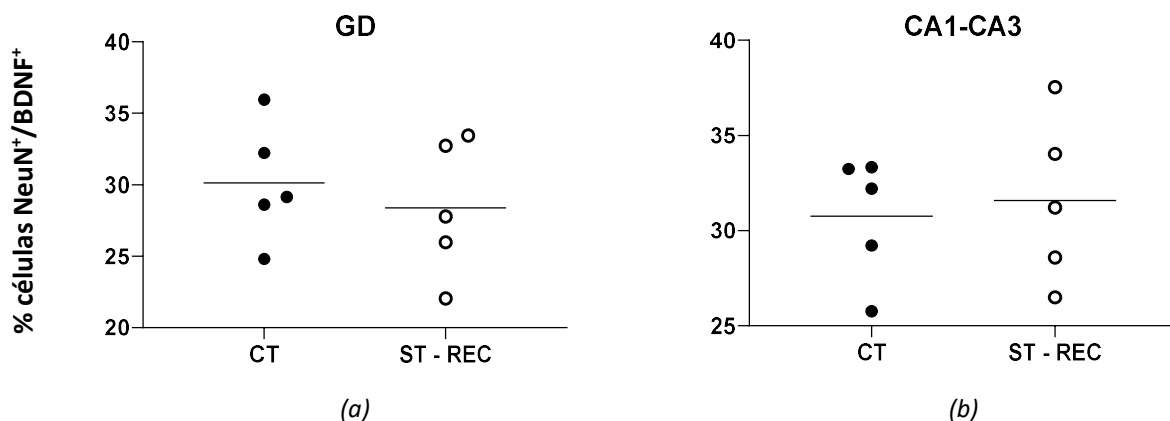


Fig. 43. Porcentagem de neurônios que expressam BDNF (marcados com $BDNF^+/NeuN^+$) em relação ao número total de neurônios ($=100\%$) no GD (painel a) e na sub-região CA1-CA3 (painel b) para as condições com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina após 7 dias de recuperação (ST-REC, círculo vazio). $n=5$ para cada condição nas duas sub-regiões; as linhas horizontais representam a média dos valores.

Com o objetivo de investigar se existiam correlações significativas entre o número de neurônios por mm^2 e a porcentagem de neurônios que expressam BDNF (marcados com $NeuN^+/BDNF^+$), aplicamos o teste de Pearsons. Usando os dados agrupados, obtidos nas duas sub-regiões, para usar um tamanho de amostra maior e atender o critério do teste, encontramos correlação significativa (Fig. 44, painel b) na condição sem tiamina após recuperação, ST-REC ($r=0,77$; $p=0,010$), mas não encontramos nenhuma correlação significativa ($p=0,739$) com os dados obtidos na condição controle CT (Fig. 44, painel a).

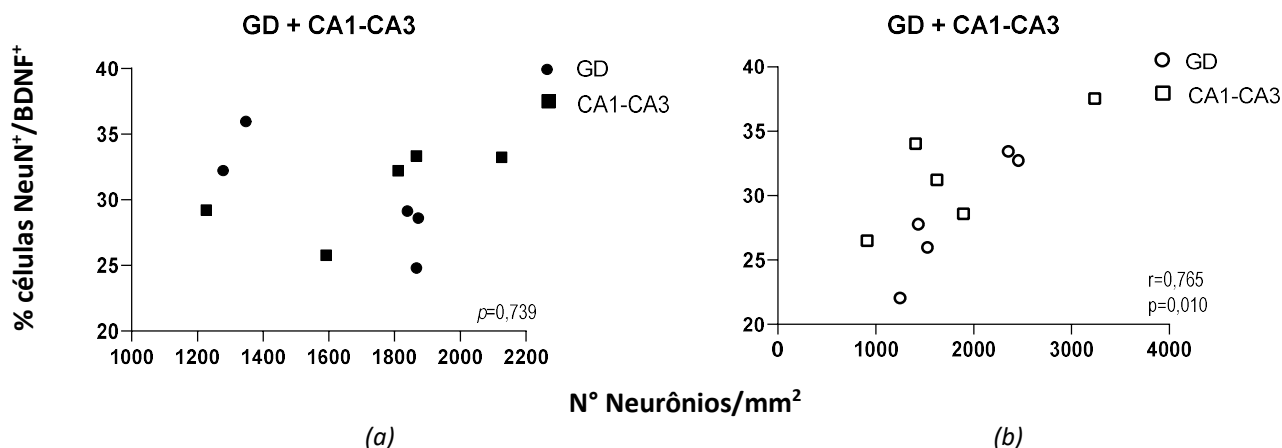


Fig. 44. Gráficos de dispersão entre o número de neurônios/ mm^2 e a porcentagem de neurônios que expressam BDNF (marcados $NeuN^+/BDNF^+$) no GD+CA1-CA3, nas condições com tiamina por 17 dias (CT, círculo cheio: painel a) e meio sem tiamina por 10 dias, seguidos por 7 dias de recuperação em meio com tiamina (ST-REC, círculo vazio: painel b); $n=5$ para cada uma das condições.

7.3. EFEITO DA DT SOBRE OS NÍVEIS DE BDNF EM OLIGODENDRÓCITOS

Posteriormente, avaliamos os efeitos da DT na produção de BDNF por oligodendrócitos, seguindo o mesmo desenho experimental apresentado na Fig. 8. Após cada tempo de incubação 4, 7 e 10 dias, as membranas foram fixadas, imunomarcadas, fotografadas e, posteriormente quantificadas. Foi determinado o número de oligodendrócitos que expressam BDNF (marcados com BDNF⁺/GalC⁺). Na Fig. 45 podemos ver um exemplo das fotos obtidas, com a dupla marcação, sendo que os oligodendrócitos estão marcados em verde (anti-GalC), o BDNF em verde (Anti-BDNF) e, em azul, o núcleo de todas as células (DAPI).

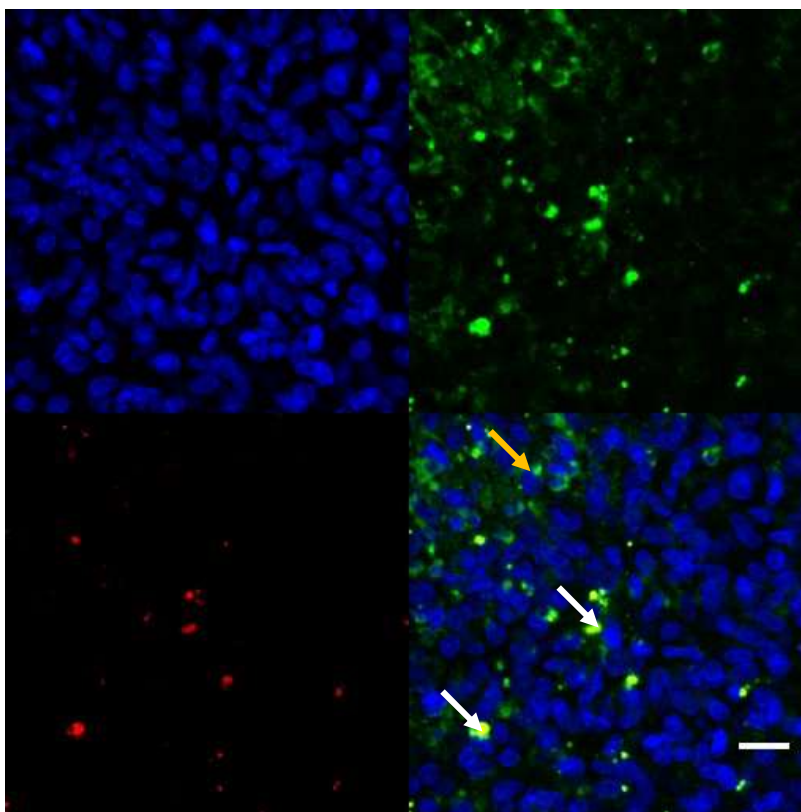


Fig. 45. Imagem representativa de uma dupla marcação. No sentido horário temos no primeiro canal no topo à esquerda (azul): marcação de todos os núcleos. No segundo canal no topo à direita (verde): marcação de anti-GalC (oligodendrócitos). No terceiro canal abaixo (vermelho): Marcação de anti-BDNF. No quarto canal, abaixo à esquerda: somatória de todas as imagens. Setas brancas: células que possuem as duas marcações (GalC⁺/BDNF⁺). Seta laranja: célula GalC⁺/BDNF⁻. A linha branca horizontal representa 20 μ m.

RM Two-Way ANOVA com efeitos mistos, não mostrou efeito significativo do tratamento (Fig. 46) em nenhuma das três regiões analisadas (**GD**: $F_{(1,5)}=0,33$, $p=0,589$ e **CA1-CA3**: $F_{(1,5)}=0,78$, $p=0,417$), nem do tempo (**GD**: $F_{(2,10)}=2,15$, $p=0,168$ e **CA1-CA3**: $F_{(2,10)}=0,21$, $p=0,814$) e nem interação entre os dois fatores (**GD**: $F_{(2,4)}=0,47$, $p=0,654$ e **CA1-CA3**: $F_{(2,4)}=0,50$, $p=0,640$) em nenhuma das duas sub-regiões e nem no **tecido total** (tratamento: $F_{(1,5)}=0,02$, $p=0,891$; tempo: $F_{(2,10)}=1,18$, $p=0,365$ e interação: $F_{(2,4)}=3,14$, $p=0,154$).

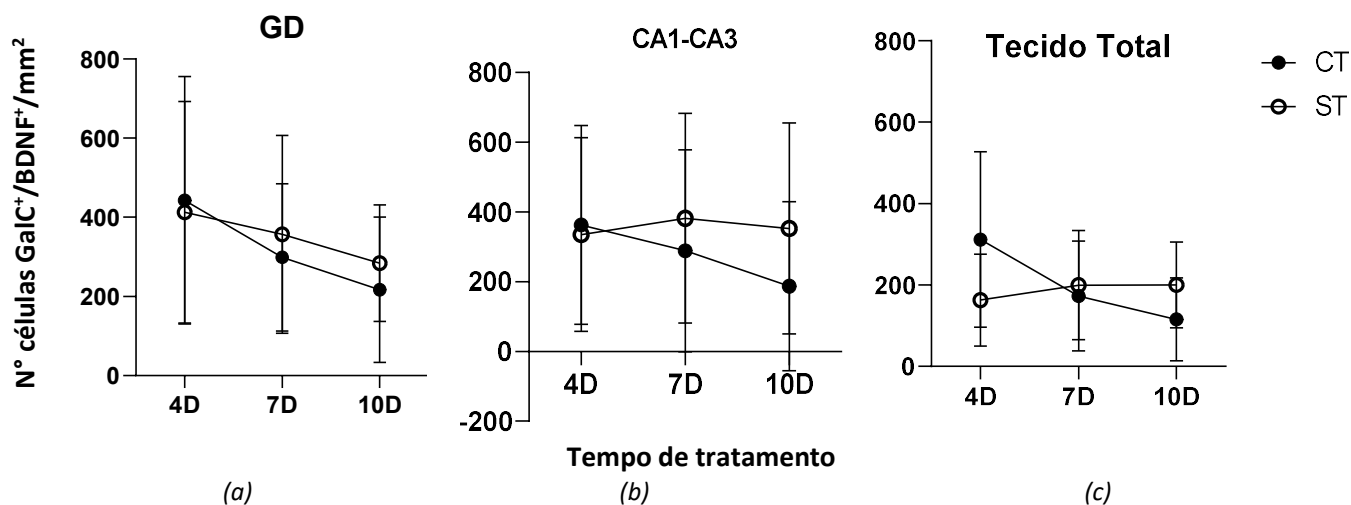


Fig. 46. Média \pm SD da densidade de oligodendrócitos produtores de BDNF (células marcadas para GalC⁺/BDNF⁺) na região do GD (a), CA1-CA3 (b) e tecido total (c) nas condições com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina (ST, círculo vazio) nos tempos de incubação de 4, 7 e 10 dias. $n=6$ para cada ponto.

Posteriormente, avaliamos a porcentagem de células duplamente marcadas (GalC⁺/BDNF⁺) em cada uma das sub-regiões e tecido total (Fig. 47). ANOVA mostrou para a sub-região **GD** um efeito significativo do tratamento ($F_{(1,5)}=6,93$; $p=0,046$), mas não houve efeito do tempo ($F_{(2,10)}=0,26$, $p=0,773$) e nem interação ($F_{(2,4)}=1,68$, $p=0,300$) entre os fatores. O pós-teste de Sidak não mostrou nenhuma diferença significativa entre as condições em nenhum dos tempos e nem entre os tempos de incubação.

A análise usando *Two-Way* ANOVA dos dados obtidos na região **CA1-CA3** não mostrou efeito do tratamento ($F_{(1,5)}=0,061$, $p=0,815$), do tempo ($F_{(2,10)}=0,59$, $p=0,573$) e nem da interação entre eles ($F_{(2,4)}=0,12$, $p=0,899$). No **tecido total** também não houve efeito desses dois fatores [tratamento: ($F_{(1,5)}=0,30$, $p=0,608$) e tempo ($F_{(2,10)}=0,74$, $p=0,516$)] e nem interação entre eles ($F_{(2,4)}=0,03$, $p=0,974$).

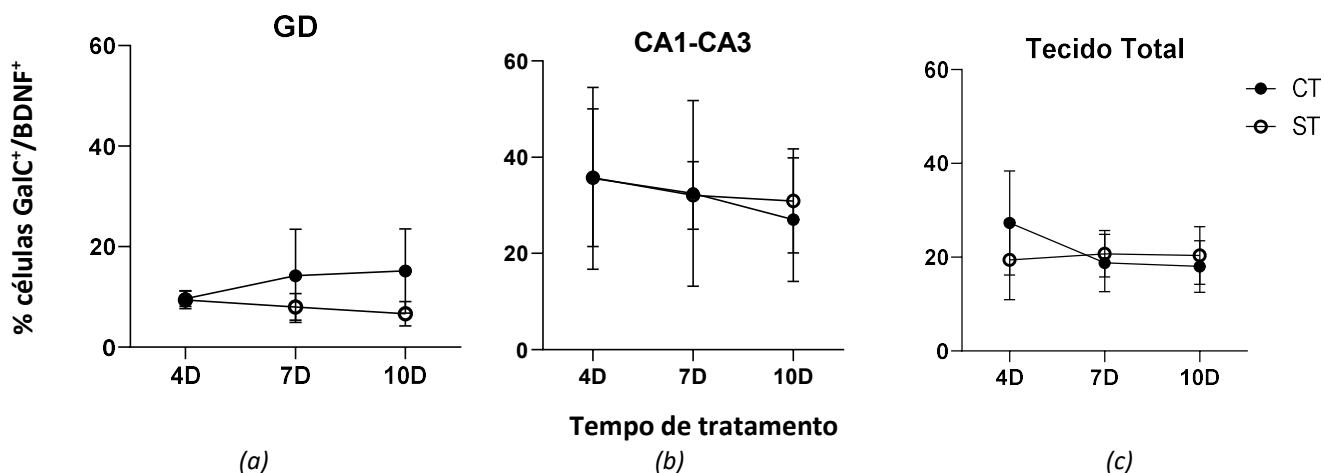


Fig. 47. Média \pm SD da porcentagem de oligodentrócitos que expressam BDNF (células duplamente marcadas GalC⁺/BDNF⁺) na sub-região do GD (a), CA1-CA3 (b) e tecido total (c) para as condições com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina (ST, círculo vazio) nos tempos de incubação de 4, 7 e 10 dias. $n=6$ para cada ponto.

Finalmente, fizemos uma análise de correlação de Pearsons dos dados obtidos nas duas sub-regiões (GD e CA1-CA3) para as duas condições (CT e ST). Encontramos uma correlação significativa nos quatro casos (Fig. 48): GD-CT ($r=0,57$, $p=0,016$), CA1-CA3-CT ($r=0,59$, $p=0,031$), GD-ST ($r=0,74$, $p=0,001$), CA1-CA3-ST ($r=0,91$, $p<0,0001$).

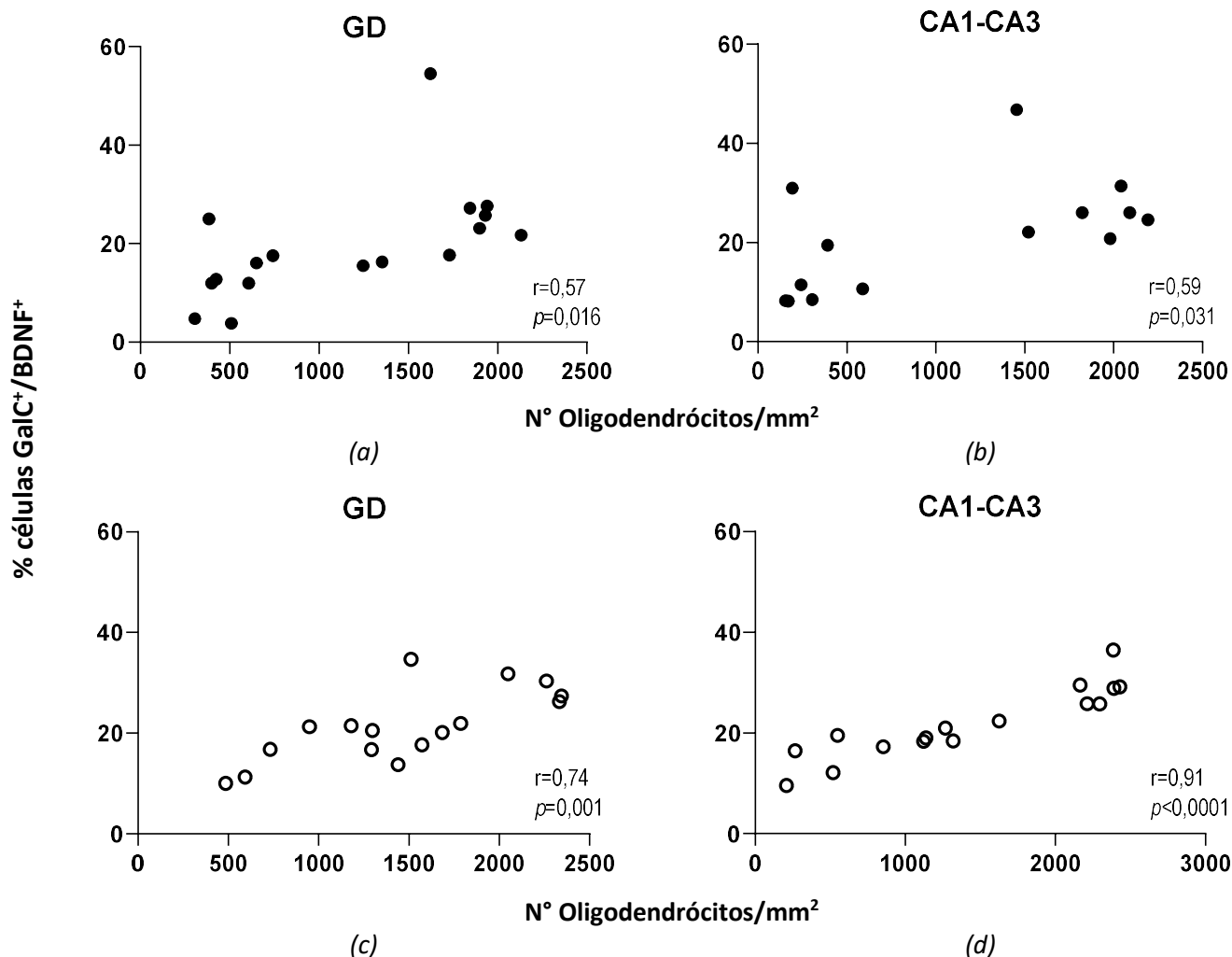


Fig. 48. Gráficos de dispersão entre o número de oligodendrócitos/mm² e a porcentagem de oligodendrócitos que expressam BDNF (células duplamente marcadas (GalC⁺/BDNF⁺) em relação ao número total de oligodendrócitos (=100%) no GD (a, c), e na sub-região CA1-CA3 (b, d) nas condições com tiamina (CT, círculo cheio) e sem tiamina (ST, círculo vazio). n=6 para cada condição.

Análise de comparação de coeficientes de correlação para duas amostras sobrepostas de grupos dependentes usando a ferramenta COCOR (Diedenhofen & Musch, 2015), não mostrou diferença entre os coeficientes de correlação para os dados obtidos nas sub-regiões GD e CA1-CA3 na condição com tiamina, CT ($z=-0,07$; $p=0,944$). Também não encontramos diferenças entre as condições CT e ST na sub-região GD ($z=-0,42$; $p=0,677$). Porém, encontramos diferença significativa entre os coeficientes de correlação na sub-região CA1-CA3 ($z=-3,31$, $p=0,0009$) entre as condições CT e ST. Portanto, na sub-região CA1-CA3 a relação funcional entre oligodendrócitos que produzem BDNF e o número de oligodendrócitos é afetada pela DT.

8. DISCUSSÃO

Existem várias evidências sobre o papel funcional do fator neurotrófico BDNF nos fenômenos de plasticidade neuronal e neurodegeneração (Hennigan *et al.*, 2007). O objetivo dos experimentos que compõem a Parte 3 do presente trabalho foi estudar os efeitos de um insulto neurodegenerativo, induzido pela DT, sobre a produção de BDNF em uma preparação que propicia a avaliação desses efeitos sobre neurônios e oligodendrócitos. Os resultados obtidos aqui indicam que a COH é um modelo adequado para esse propósito. O interesse do nosso grupo de pesquisa sobre o envolvimento do BDNF no mecanismo de ação da DT se baseia nas evidências que foram obtidas em estudos prévios sobre a relação do BDNF com o desempenho de roedores em tarefas cognitivas espaciais e os achados obtidos pelo nosso grupo (Sena, 2015, 2019) e outros autores (Vedder *et al.*, 2015) de que a DT afeta os níveis de BDNF no hipocampo e também o desempenho cognitivo dos animais. Essas evidências foram a base que fundamentaram a hipótese de que a DT interfere na produção de BDNF por neurônios e oligodendrócitos. Até onde temos conhecimento, este foi o primeiro trabalho a estudar as variações na produção de BDNF **durante** o processo da DT. Além disto, representa o primeiro estudo utilizando COH para avaliar os efeitos da DT sobre dois tipos celulares em um mesmo tipo de preparação, acompanhando as variações dos níveis de BDNF em sub-regiões do hipocampo, durante um episódio de DT e também após um período de recuperação.

Observamos um aumento da produção de BDNF em neurônios do GD e da sub-região CA1-CA3 e no tecido total, no 10º dia de DT. Este aumento pode estar relacionado com o aumento na diferenciação de neurônios (para se contrapor à perda neuronal induzida pela DT) e posterior migração para outras regiões do tecido. As funções do BDNF no GD têm sido amplamente estudadas. Esta neurotrofina influencia o crescimento e sobrevivência das células granulares e regula a sua morfologia e atividade (Danzer *et al.*, 2002; Holtzman & Lowenstein, 1995). Foi mostrado que o aumento do BDNF na zona subventricular do GD aumenta o número de neurônios no hipocampo e em outras regiões do cérebro (J. Lee *et al.*, 2002; Pencea *et al.*, 2001; Scharfman *et al.*, 2005). O aumento do BDNF na região CA1 e CA3 parece estar relacionado também com um aumento na transmissão excitatória (B. Lu, 2003) e com um maior número de espinhas dendríticas nos neurônios piramidais (von Bohlen und Halbach & von Bohlen und Halbach, 2018). Portanto, podemos pensar que houve um aumento na produção de BDNF no grupo ST e, conseqüentemente, um aumento do número de neurônios no décimo dia da DT, mas que tanto no grupo controle como no deficiente o efeito do BDNF está relacionado com a diferenciação de células progenitoras para neurônios, já que o coeficiente de correlação entre o grupo deficiente e o controle é estatisticamente similar, indicando um comportamento homólogo.

Conforme mencionado acima, na condição deficiente de tiamina (ST) o aumento da produção de BDNF por neurônios, ao longo do tempo, foi observado de forma significativa quando se compara o 4º e o 10º dia de exposição à DT. Esse efeito não foi observado na produção de BDNF por oligodendrócitos, indicando uma possível diferença funcional no papel do BDNF neuronal comparado com o produzido por oligodendrócitos. Uma hipótese que pode ser levantada é que o aumento na produção do BDNF representa uma resposta compensatória, para ativar o processo de neurogênese e compensar eventuais perdas neuronais. Perdas essas evidenciadas no presente estudo, no sétimo dia de incubação com meio sem tiamina (Parte 2, Fig. 21 e 22).

Um fator que precisa ser considerado e, posteriormente, estudado em mais detalhes, é o efeito do próprio envelhecimento da cultura, que pode levar a um aumento na produção de BDNF por neurônios. Observamos um aumento significativo quando se compara o nível de BDNF no 4º dia com o 10º dia de incubação das fatias do hipocampo na região CA1-CA3 no grupo CT (Fig. 37). O aumento na produção de BDNF nas culturas controle pode ser explicada pela necessidade de manutenção das populações no decorrer da incubação, devido ao efeito do “envelhecimento”. O décimo dia de cultura é, na verdade, o vigésimo quarto dia, contando os 14 dias de estabilização das COH. Portanto, a produção de BDNF é provavelmente necessária a fim de manter os diferentes tipos celulares e a homeostasia da fatia. Essa observação foi feita na Parte 2 do presente trabalho, quando observamos a presença de uma correlação entre o número de neurônios e a área da sub-região CA1-CA3 também no décimo dia, provavelmente devido à necessidade de produção de novos neurônios para se contrapor às perdas produzidas pelo envelhecimento, evidenciado também no aumento da produção de BDNF. A medida que as culturas ficam mais tempo incubadas, podem iniciar a ocorrência de processos não fisiológicos, como exemplificado abaixo, que podem estar relacionados com o envelhecimento das COH. Como foi comentado na Parte 2 do presente trabalho, outros autores mostraram um aumento constante da probabilidade de encontrar atividade epileptiforme nas culturas organotípicas entre 11 e 40 dias de incubação, principalmente na região CA1 (McBain *et al.*, 1989) e uma perda da viabilidade da fatia após 18 dias de incubação (De Simoni & Yu, 2006; Gogolla *et al.*, 2006; Nägerl *et al.*, 2004). Porém, após 49 dias de cultura, a viabilidade celular mantém-se constante em 60% (Gong *et al.*, 2016). Portanto, pode-se observar um processo de envelhecimento da cultura ao longo do tempo de incubação, mas atinge-se uma estabilidade após um certo período, provavelmente devido a efeitos compensatórios, como a produção de BDNF a fim de garantir a sobrevivência neuronal e de outros tipos celulares.

Após o episódio de DT, observamos que sete dias de recuperação parecem ser suficientes para reverter os efeitos da DT na produção de BDNF. Era esperado observar uma diminuição da produção de BDNF após um período de recuperação, pois, como foi mencionado, trabalhos de nosso grupo e

outros mostram uma queda na produção desta neurotrofina após a recuperação de um episódio de DT *in vivo* (Sena, 2019; Vedder *et al.*, 2015). Com relação a esse dado, a não detecção desse efeito usando COH poderia estar relacionado com o tamanho da amostra utilizada ($n=5$), a diferença no tempo de recuperação (mais de duas semanas nos testes *in vivo* e uma semana nas COH) ou a intensidade do insulto. Outra questão é que a concentração de BDNF determinada por outros autores (Sena, 2019; Vedder *et al.*, 2015) foi realizada usando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR: *Polymerase chain reaction*) e Ensaio de Elisa (ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), sendo, portanto, dosada no hipocampo todo e não em diferentes tipos celulares e sub-regiões como feito aqui. Também, é importante observar que existe uma correlação significativa entre o número de neurônios por mm^2 e a porcentagem de neurônios que expressão BDNF unicamente no grupo ST. Isto pode refletir a necessidade dos tecidos expostos a DT de produzir BDNF para estimular a diferenciação de novos neurônios, enquanto no tecido controle o BDNF parece ter outro papel, como por exemplo, produção de neuritos (von Bohlen und Halbach & von Bohlen und Halbach, 2018).

No caso da porcentagem de oligodendrócitos produtores de BDNF, observamos o efeito do tratamento no GD, mostrando uma diminuição da neurotrofina quando comparado com o controle. Na região CA1-CA3 e no tecido total não foi encontrada diferença entre os tratamentos. A produção de BDNF pelos oligodendrócitos está relacionada com sustentação trófica para os neurônios circundantes (Dai *et al.*, 2003), com a regulação da liberação de neurotransmissores nos neurônios pré-sinápticos (Jang *et al.*, 2019) e com a mielinização de neurônios (Peckham *et al.*, 2016; Vondran *et al.*, 2010). Interessante que foi observado por outros pesquisadores que existe uma retração da mielinização no GD quando os receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) são ativados (Makinodan *et al.*, 2013), e essa inibição parece estar envolvida com deficiências na plasticidade e na memória (Vanguilder *et al.*, 2012). Um dos efeitos do insulto produzido pela DT é uma liberação aumentada de glutamato e consequente ativação dos receptores de tipo NMDA (Langlais *et al.*, 1997). O processo de mielinização parece ser controlado pela liberação de BDNF e, devido ao aumento das concentrações de glutamato, a diminuição na produção desta neurotrofina pode ter como consequência a diminuição na produção de mielina (Lundgaard *et al.*, 2013) e, conseqüentemente, déficits de memória, como observado na DT *in vivo*. Posteriores estudos são necessários para confirmar estas hipóteses, como avaliação da mielinização e liberação de glutamato em cultura organotípica (COH), e a sua relação com a produção de BDNF. É interessante destacar que existe uma disfunção inerente à DT na produção da bainha de mielina, já que a tiamina é cofator essencial para a produção dos ácidos graxos que a compõem (Manzetti *et al.*, 2014), e algumas das aberrações neurológicas observadas na DT podem ser atribuídas a uma diminuição na transmissão do impulso elétrico (Nazir *et al.*, 2019), processo que é dependente da integridade da bainha de mielina. Portanto,

precisa ser estudado se a diminuição da produção de BDNF pelos oligodendrócitos no GD é uma causa ou uma consequência da diminuição da produção de mielina induzida pela falta de tiamina.

A diferença no coeficiente de correlação para os grupos CT e ST, mostrado pela ferramenta COCOR, entre a porcentagem de oligodendrócitos produtores de BDNF e a densidade de oligodendrócitos na região CA1-CA3 pode estar relacionada com a presença de células progenitoras de oligodendrócitos (OPC, *oligodendrocyte progenitor cells*) nesta região. Sabe-se que estes tipos celulares estão presentes durante o período pós-natal, e possuem funções neuromoduladoras e de regulação da mielinização (Bergles & Jahr, 2000). O anticorpo anti-GalC marca oligodendrócito maduro, mas também existe uma pequena marcação de OPC, já que este tipo celular pode produzir galactocerebrósido em pequenas quantidades (Bichenkov & Ellingson, 1999). A produção de BDNF por este tipo celular já foi observado em modelos de COH submetidas a privação de oxigênio e glicose (Sypecka *et al.*, 2013), e foi encontrada uma relação entre a liberação de BDNF e a sobrevivência da fatia, assim como um aumento da proliferação celular. Portanto, a mudança no comportamento evidenciada pela diferença no coeficiente de correlação entre o grupo controle (CT) e o grupo deficiente (ST) pode dever-se ao aumento da produção de BDNF pelas OPC nesta região no grupo deficiente, como uma resposta ao insulto a fim de estimular a sobrevivência do tecido.

É importante observar que, como mencionado na Parte 2, as culturas foram produzidas a partir de animais neonatais de 7 dias de idade e, portanto, estudos futuros devem ser conduzidos usando modelos *in vivo* com animais neonatais para avaliar se as modificações das variáveis aqui apresentadas acontecem também no estado *in vivo*. Porém, é interessante observar que, no rato, a mielinização do hipocampo começa no 5º dia após o nascimento e perdura até o 25º dia, quando atinge um fenótipo indistinguível do adulto (Meier *et al.*, 2004). Nas COH, após os 14 dias de estabilização, a fatia tem uma idade comparável com um rato de 21 dias aproximadamente, portanto a mielinização estaria nos estágios finais. Estudos produzindo COH com animais de 11 dias podem ser conduzidos, a fim de iniciar os experimentos com fatias de 25 dias, momento em que animais de 25 dias já completaram o processo de mielinização. Importante registrar que outros autores observaram, realizando estudos conduzidos em animais neonatais, a perda da bainha de mielina e um déficit do crescimento dendrítico e axonal (Bâ *et al.*, 2005), característica também observada em pacientes com SWK (Zahr *et al.*, 2011). Portanto, embora estudos mais detalhados são necessários, o modelo de COH parece ser adequado para contribuir no entendimento dos efeitos da DT e para a elucidação de alguns dos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de neurodegeneração e, portanto, na patofisiologia da doença.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a finalidade de resumir alguns dos resultados obtidos no presente trabalho, apresentamos a seguir, na Tabela 2, alguns destes resultados.

Tabela 2: Resumo de Parte dos Resultados

EXPERIMENTO	RESULTADO	INTERPRETAÇÃO
PARTE 1: PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE FATIAS DE HIPOCAMPO		
Tempo de suplementação com soro	7 dias de uso de soro parecem ser suficientes para a recuperação do tecido e 7 dias após a retirada do soro o tecido atinge estabilidade (em termos de densidade neuronal).	O soro equino é necessário para a estabilização do tecido, mas se mantido por um tempo maior que o necessário pode desestabilizar a cultura.
Produção de novos neurônios	Não foi observado produção de novos neurônios nas COH incubadas com soro. Após a retirada do soro, foi observada a presença de células NeuN ⁺ /BrdU ⁺ , indicando a presença de novos neurônios.	Existe um efeito neurosupressor do soro e a sua remoção do meio de incubação, após uma semana, é suficiente para ativar os processos de diferenciação neuronal.
Estabilidade da cultura em Meio Essencial Mínimo (MEM)	Nos dias 14, 21 e 24 a densidade neuronal das culturas é indistinguível ao longo desse período (do 14 ^o ao 24 ^o dia). No 7 ^o dia, a presença do soro afeta o número de neurônios, induzindo uma diminuição em relação aos demais dias.	Depois de uma semana em MEM contendo soro equino, as COH podem ser mantidas estáveis, em relação ao número de neurônios, por pelo menos 24 dias, se nutridas com MEM sem soro do 8 ^o ao 24 ^o dia.
Estabilidade da cultura em meio Neurobasal suplementado com B27 (N-B27)	Diminui a variabilidade das COH em relação à parâmetros morfológicos e facilita a visualização de subestruturas do hipocampo.	A substituição do MEM para o meio N-B27 contribuiu para uma melhor estabilidade do tecido e manutenção da citoarquitetura do hipocampo.
Determinação de um período de 14 dias de estabilização, sendo os primeiros 7 dias em MEM suplementado com soro equino e os seguintes 7 dias, em meio Neurobasal com B27 (meio sem soro). Meio Neurobasal suplementado com B27 pelo restante do experimento independente da condição.		
PARTE 2: ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS ORGANOTÍPICAS DO HIPOCAMPO COMO MODELO PARA O ESTUDO DA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA		
Efeito de um episódio de DT nas áreas das sub-regiões hipocâmpais	Foi observada uma diminuição no GD e em CA1-CA3. Porém, foi observado um aumento da área do tecido total.	A diminuição das sub-regiões GD e CA1-CA3 parece estar relacionada com os processos fisiopatológicos de perda neuronal desencadeados pelo insulto e o aumento do tecido total reflete nas reações de células não

		neuronal com consequente aumento das células da glia.
Efeito de um episódio de DT na densidade neuronal	Foi observado uma diminuição da densidade de neurônios no sétimo dia e uma reversão dessa perda no décimo dia nas três regiões analisadas (GD, CA1-CA3 e tecido total).	As alterações no tecido hipocampal, até onde foi medido, envolvem duas etapas: perda neuronal seguida de reações neurobiológicas compensatórias, que devem perdurar ou não dependendo da intensidade e da duração do insulto.
Análise de correlação entre área e número de neurônios durante um episódio de DT	Existe uma correlação positiva entre a área e o número de neurônios no grupo CT, nas duas sub-regiões, GD e CA1-CA3. Essa relação é rompida pela DT, na condição ST.	A perda de neurônios e reação da glia induzidos pela DT interfere com a relação entre a densidade de neurônios e o tamanho da área.
Viabilidade celular durante um episódio de DT	Não há diferença na incorporação de IP em nenhuma das três regiões do hipocampo para os dois tratamentos. Analisando a correlação entre o número de neurônios totais e o número de neurônios (NeuN ⁺ /IP ⁺) em degeneração, observamos que existe uma correlação positiva entre essas variáveis no grupo CT nas sub-regiões GD e CA1-CA3, mas a relação é rompida pela deficiência, ou seja, desaparece no grupo ST.	No hipocampo, em condições fisiológicas (condição CT), o processo de perda neuronal (apoptose) e neurogênese acontece de forma contínua estabelecendo o <i>turnover</i> de uma população de neurônios hipocampais. Um insulto degenerativo, como a DT, pode deslocar o equilíbrio para o lado da morte celular (condição ST), rompendo as relações fisiológicas de diferenciação e apoptose.
Recuperação de um episódio de DT	Não foi observada diferença na área das sub-regiões nem na densidade neuronal nos grupos ST-REC e CT. Os coeficientes de correlação entre a área e o número de neurônios, para os grupos CT e ST-REC, foram diferentes.	O insulto induzido pela deficiência provocou a morte e re-população neuronal mas, no processo de recuperação, persistem disfunções metabólicas e estruturais, p.ex. na glia, que podem refletir na extensão da área.
Efeito de um episódio de DT na densidade de oligodendrócitos	Não houve diferença no número de oligodendrócitos em nenhuma das sub-regiões hipocampais para nenhuma das condições (CT e ST). Correlação significativa e positiva entre número de oligodendrócitos e a área na condição CT, nas sub-regiões GD e CA1-CA3. Na condição ST essa relação foi rompida na sub-região CA1-CA3.	A perda de correlação em CA1-CA3 pode ser um indicador da susceptibilidade desta sub-região aos efeitos da DT. Evidência similar foi descrita por outros autores (Mattson <i>et al.</i> , 1989) em outros processos neurodegenerativos.

PARTE 3: DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BDNF DURANTE E APÓS UM EPISÓDIO DE DEFICIÊNCIA DE TIAMINA EM MODELO DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO.

<p>Efeito da DT sobre a produção de BDNF em neurônios</p>	<p>Aumento da produção de BDNF no 10° dia de exposição à DT nas duas sub-regiões analisadas e no tecido total. Aumento de produção de BDNF no 7° dia no grupo controle. Existência de correlação positiva entre a porcentagem de neurônios produtores de BDNF e a densidade neuronal nas condições com (CT) e sem tiamina (ST), em todas as sub-regiões. Os coeficientes de correlação foram similares.</p>	<p>O aumento do 10° dia no grupo deficiente parece estar relacionado com os processos de neurodegeneração observados no 7° dia, e o aumento no 7° dia no controle parece corresponder ao envelhecimento da COH e a produção de fatores que garantam a sobrevivência dos neurônios.</p>
<p>Efeito de 7 dias de recuperação após DT sobre a produção de BDNF por neurônios</p>	<p>Não houve diferença entre o grupo ST-REC na produção de BDNF em relação ao controle. Existe uma correlação positiva entre a porcentagem de neurônios produtores de BDNF e a densidade neuronal na condição ST.</p>	<p>Nas condições estabelecidas, uma semana foi um período de recuperação suficiente para restaurar a produção de BDNF por neurônios hipocâmpais para um nível comparável ao controle. A produção de BDNF se relaciona com o número de neurônios no caso de uma demanda gerada por um insulto. Essa relação não é observada na condição fisiológica.</p>
<p>Efeito da DT sobre a produção de BDNF em oligodendrócitos</p>	<p>Diminuição da produção de BDNF na condição sem tiamina (ST) na sub-região do GD. Foi encontrada uma correlação positiva entre oligodendrócitos produtores de BDNF e densidade de oligodendrócitos em todas as sub-regiões. No entanto, os coeficientes de correlação são estatisticamente diferentes, quando se compara os dados obtidos na condição CT e ST, na sub-região CA1-CA3.</p>	<p>O efeito da DT sobre a produção de BDNF e a sua relação com o número de oligodendrócitos é dependente da sub-região, indicando diferenças na suscetibilidade aos efeitos da deficiência entre as sub-regiões hipocâmpais. A diminuição da produção de BDNF por oligodendrócitos no GD, induzido pela DT, parece estar relacionada com um aumento na liberação de glutamato e diminuição na produção de mielina. Frente a insultos, as OPC da região CA1-CA3 podem produzir BDNF e isso pode explicar a diferença observada entre os coeficientes de correlação (produção de BDNF x n° de oligodendrócitos) entre os grupos CT e ST nesta sub-região.</p>

O presente trabalho possibilitou o estabelecimento das COH como modelo para o estudo de fenômenos neurobiológicos no hipocampo, e contribuiu para o conhecimento de quais seriam as condições adequadas para a manutenção das COH por um período apropriado para o estudo de processos neurodegenerativos, como os induzidos pela DT. Além disto, abriu perspectivas para a exploração simultânea de outros fenômenos concomitantes, como a neurogênese e o envolvimento de diferentes componentes celulares, neuronais e gliais, que constituem a cultura organotípicas de fatias do hipocampo.

Avaliamos algumas das alterações neurobiológicas que acontecem durante um episódio de DT, destacando que as observações foram realizadas durante os processos de deficiência em células neuronais e da glia. Identificamos fases de neurodegeneração que antecederam um processo de neuroregeneração, resultado não descrito até o momento. E, finalmente, mostramos uma diferença importante na produção de BDNF por neurônios e por oligodendrócitos no decorrer do insulto (Tabela 2).

Até onde conhecemos, este é o primeiro trabalho utilizando culturas organotípicas do hipocampo de ratos para o estudo da deficiência de tiamina como modelo de neurodegeneração. Consideramos isto de especial importância porque, como foi mencionado no decorrer do texto, os dados sobre os efeitos da DT no hipocampo são contraditórios e a possibilidade de explorar os diversos componentes do tecido hipocampal ao longo do processo de deficiência e após a retirada do insulto representa uma vantagem em relação a outros modelos. Nas condições desenvolvidas, verificamos uma sequência cronológica de eventos, identificando um processo de morte neuronal no sétimo dia de exposição à DT e uma posterior recuperação no décimo dia. Simultânea à essa recuperação (10º dia), observamos um aumento da produção de BDNF, que provavelmente está relacionado com um estímulo da sobrevivência e diferenciação celular, no intuito de contrapor os efeitos da DT. Estudos posteriores, mais detalhados da cinética desses processos, abordando as consequências funcionais nos neurônios e oligodendrócitos podem ser realizados para se aprofundar no entendimento das bases moleculares que culminam com esses eventos.

Interessante destacar que, após uma semana de recuperação da deficiência, verificamos uma recuperação na produção de BDNF em neurônios, observação também realizada pelo nosso grupo no hipocampo, usando outro modelo experimental (Sena, 2019). A presença de uma correlação positiva entre o número de neurônios produtores de BDNF e a densidade neuronal na condição sem tiamina (ST) parece indicar que a produção de BDNF na presença de um insulto que ativa processos de morte neuronal está relacionada, de forma direta e positiva, à estimulação da diferenciação neuronal que também acontece em fases iniciais pós-insulto. Ou seja, enquanto os mecanismos que compensam

esses insultos conseguem os contrapor de forma eficiente. Provavelmente, esses efeitos compensatórios tem um limite e dependem da intensidade e da duração do estímulo, do período de recuperação e todas essas variáveis também podem ser melhor estudadas no futuro usando COH.

Em relação aos oligodendrócitos, não encontramos nenhuma diferença na densidade dessas células durante o insulto, o qual está de acordo com a literatura (Meng *et al.*, 1998). No entanto, existe uma diminuição na produção de BDNF por esse tipo celular na sub-região do GD. Essa diminuição parece estar relacionada também com as deficiências na produção de mielina (processo no qual a tiamina é cofator essencial) e, conseqüentemente, com a diminuições na transmissão do impulso elétrico, que podem produzir alguns dos sintomas que são observados em pacientes deficientes em tiamina. Estudos posteriores deverão determinar se a diminuição da produção de BDNF por oligodendrócitos no GD é uma causa ou consequência da diminuição da produção de mielina. E quais seriam as bases moleculares que poderiam explicar porque esse efeito é dependente da sub-região hipocampal?

O modelo da COH permite a execução de um amplo leque de análises, bioquímicas, eletrofisiológicas e farmacológicas, dentre outros, que podem ajudar na compreensão de alguns dos mecanismos subjacentes aos processos de neurodegeneração induzidos pela DT.

10. CONCLUSÕES

O modelo de culturas organotípicas de hipocampo é adequado para o estudo dos mecanismos associados aos efeitos da Deficiência de Tiamina e de processos relacionados, como a neurodegeneração, neurogênese e mielinização.

Foi mostrado pela primeira vez que as etapas do processo de DT no hipocampo, podem envolver uma resposta associada à uma re-população neuronal, que por sua vez está relacionada à um aumento na produção de BDNF, a qual precede uma fase de perda neuronal.

Alterações funcionais de oligodendrócitos da sub-região do GD compõem o mecanismo relacionado aos efeitos induzidos pela DT no hipocampo.

A produção de BDNF por neurônios e oligodendrócitos no hipocampo, dependem do número total dessas células, respectivamente, nas sub-regiões do GD e CA1-CA3.

Concluimos também que alguns dos efeitos da DT no hipocampo são dependentes da sub-região, afetando de forma diferenciada o GD e a sub-região CA1-CA3.

11. REFERÊNCIAS

- Adriano, F., Caltagirone, C., & Spalletta, G. (2012). Hippocampal volume reduction in first-episode and chronic schizophrenia: A review and meta-analysis. In *Neuroscientist*. <https://doi.org/10.1177/1073858410395147>
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). In *Progress in Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Anderson, V. E. R., Cairns, N. J., & Leigh, P. N. (1995). Involvement of the amygdala, dentate and hippocampus in motor neuron disease. *Journal of the Neurological Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(95\)00069-E](https://doi.org/10.1016/0022-510X(95)00069-E)
- Arancio, O., & Chao, M. V. (2007). Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. In *Current Opinion in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.03.013>
- Arendt, T., Brückner, M. K., Krell, T., Pagliusi, S., Kruska, L., & Heumann, R. (1995). Degeneration of rat cholinergic basal forebrain neurons and reactive changes in nerve growth factor expression after chronic neurotoxic injury-II. Reactive expression of the nerve growth factor gene in astrocytes. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00523-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00523-8)
- Bâ, A. (2008). Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. In *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9297-7>
- Bâ, A. (2017). Alcohol and thiamine deficiency trigger differential mitochondrial transition pore opening mediating cellular death. *Apoptosis*, 22(6), 741–752. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1372-4>
- Bâ, A., N'Douba, V., D'Almeida, M. A., & Seri, B. V. (2005). Effects of maternal thiamine deficiencies on the pyramidal and granule cells of the hippocampus of rat pups. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 65(4), 387–398.
- Bâ, A., Seri, B. V., Aka, K. J., Glin, L. éon, & Tako, A. (1999). Comparative effects of developmental thiamine deficiencies and ethanol exposure on the morphometry of the CA3 pyramidal cells. *Neurotoxicology and Teratology*, 21(5), 579–586. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00014-8)

- Bagayogo, I. P., & Dreyfus, C. F. (2009). Regulated release of BDNF by cortical oligodendrocytes is mediated through metabotropic glutamate receptors and the PLC pathway. *ASN Neuro*, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.1042/AN20090006>
- Bahr, B. A. (1995). Long-term hippocampal slices: A model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes. In *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.490420303>
- Ben, M. D., Bongiovanni, R., Tuniz, S., Fioriti, E., Tiribelli, C., Moretti, R., & Gazzin, S. (2019). Earliest mechanisms of dopaminergic neurons sufferance in a novel slow progressing ex vivo model of parkinson disease in rat organotypic cultures of substantia nigra. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092224>
- Bendel, O., Bueters, T., Von Euler, M., Ove Ögren, S., Sandin, J., & Von Euler, G. (2005). Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(12), 1586–1595. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600153>
- Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmér, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M., & Lindvall, O. (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10432–10437. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10432>
- Bergles, D. E., & Jahr, C. E. (2000). *Bergles, 2000. 15439(1996)*, 187–191.
- Bernardino, L. (2005). Modulator Effects of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- on AMPA-Induced Excitotoxicity in Mouse Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Journal of Neuroscience*, 25(29), 6734–6744. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1510-05.2005>
- Bettendorff, L., Henuy, B., Wins, P., & Schoffeniels, E. (1993). Thiamin and derivatives as modulators of rat brain chloride channels. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90547-S](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90547-S)
- Bichenkov, E., & Ellingson, J. S. (1999). Temporal and quantitative expression of the myelin-associated lipids, ethanolamine plasmalogen, galactocerebroside, and sulfatide, in the differentiating CG-4 glial cell line. *Neurochemical Research*, 24(12), 1549–1556. <https://doi.org/10.1023/A:1021104232590>
- Bobinski, M., Wegiel, J., Wisniewski, H. M., Tarnawski, M., Bobinski, M., Reisberg, B., De Leon, M. J., & Miller, D. C. (1996). Neurofibrillary pathology - Correlation with hippocampal formation atrophy

- in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(96\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(96)00160-1)
- Boekhoorn, K., Joels, M., & Lucassen, P. J. (2006). Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiology of Disease*, *24*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.04.017>
- Boldrini, M., Santiago, A. N., Hen, R., Dwork, A. J., Rosoklija, G. B., Tamir, H., Arango, V., & John Mann, J. (2013). Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology*, *38*(6), 1068–1077. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.5>
- Bousquet, J., & Meunier, J. M. (1962). Organotypic culture, on natural and artificial media, of fragments of the adult rat hypophysis. *Comptes Rendus Des Séances de La Société de Biologie et de Ses Filiales*.
- Bovolenta, P., Wandosell, F., & Nieto-Sampedro, M. (1992). CNS glial scar tissue: A source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Progress in Brain Research*, *94*(C), 367–379. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61765-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61765-3)
- Boyd, W. H. (1971). A chamber for organotypic culture; adapted for growing large volumes of tissue. *Biotechnic and Histochemistry*, *46*(2), 85–87. <https://doi.org/10.3109/10520297109067827>
- Brana, C., Benham, C., & Sundstrom, L. (2002). A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Research Protocols*, *10*(2), 109–114. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(02)00201-5)
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., & Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research*, *35*(5), 567–576. <https://doi.org/10.1002/jnr.490350513>
- Bronzuoli, M. R., Facchinetti, R., & Scuderi, C. (2018). Preparation of rat hippocampal organotypic cultures and application to study amyloid β -peptide toxicity. *Methods in Molecular Biology*, *1727*, 333–341. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_24
- Brunoni, A. R., Lopes, M., & Fregni, F. (2008). A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: Implications for the role of neuroplasticity in depression. In *International Journal of Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1017/S1461145708009309>
- Bueno, K. O., de Souza Resende, L., Ribeiro, A. F., dos Santos, D. M., Gonçalves, E. C., Vigil, F. A. B., de

- Oliveira Silva, I. F., Ferreira, L. F., de Castro Pimenta, A. M., & Ribeiro, A. M. (2015). Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome are related to changes in thalamic VDAC protein concentrations. *Neuroscience*, *294*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.001>
- Butler, T. R., Self, R. L., Smith, K. J., Sharrett-Field, L. J., Berry, J. N., Littleton, J. M., Pauly, J. R., Mulholland, P. J., & Prendergast, M. A. (2010). Selective vulnerability of hippocampal cornu ammonis 1 pyramidal cells to excitotoxic insult is associated with the expression of polyamine-sensitive N-methyl-d-aspartate-type glutamate receptors. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.018>
- Butterworth, R. F. (1978). *Aminoacid changes in thiamine deficient encephalopathy some implications for the pathogenesis of Friedreich's ataxia*.
- Butterworth, R. F., Kril, J. J., & Harper, C. G. (1993). Thiamine-Dependent Enzyme Changes in the Brains of Alcoholics: Relationship to the Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1993.tb05668.x>
- Calderó, J., Brunet, N., Tarabal, O., Piedrafita, L., Hereu, M., Ayala, V., & Esquerda, J. E. (2010). Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.034>
- Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., & MacQueen, G. M. (2004). Lower Hippocampal Volume in Patients Suffering from depression: A Meta-Analysis. *American Journal of Psychiatry*, *161*(4), 598–607. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.4.598>
- Carvalho, F. M., Pereira, S. R. C., Pires, R. G. W., Ferraz, V. P., Romano-Silva, M. A., Oliveira-Silva, I. F., & Ribeiro, A. M. (2006). Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *83*(4), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.03.004>
- Cavaliere, F., Benito-Muñoz, M., & Matute, C. (2016). Organotypic Cultures as a Model to Study Adult Neurogenesis in CNS Disorders. *Stem Cells International*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/3540568>
- Chao, M. V., & Hempstead, B. L. (1995). p75 and Trk: A two-receptor system. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)93922-K](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93922-K)
- Chapleau, C. A., Carlo, M. E., Larimore, J. L., & Pozzo-Miller, L. (2008). The actions of BDNF on dendritic

- spine density and morphology in organotypic slice cultures depend on the presence of serum in culture media. *Journal of Neuroscience Methods*.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.12.006>
- Chen, Z., & Zhong, C. (2013). Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. In *Progress in Neurobiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.004>
- Cherubini, E., & Miles, R. (2015). The CA3 region of the hippocampus: How is it? What is it for? How does it do it? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(FEB), 9–11.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00019>
- Cho, S., Liu, D., Fairman, D., Li, P., Jenkins, L., McGonigle, P., & Wood, A. (2004). Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.11.012>
- Churchyard, A., & Lees, A. J. (1997). The relationship between dementia and direct involvement of the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease. *Neurology*.
<https://doi.org/10.1212/WNL.49.6.1570>
- Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1981). Retrograde amnesia and remote memory impairment. *Neuropsychologia*. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(81\)90064-6](https://doi.org/10.1016/0028-3932(81)90064-6)
- Collins, G. H. (1967). Glial cell changes in the brain stem of thiamine-deficient rats. *American Journal of Pathology*.
- Coltman, B. W., & Ide, C. F. (1996). Temporal characterization of microglia, IL-1 β -like immunoreactivity and astrocytes in the dentate gyrus of hippocampal organotypic slice cultures. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 14(6), 707–719. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(96\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(96)00071-8)
- Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., & Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal transport. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-07-02295.1997>
- Corse, A. M., Bilak, M. M., Bilak, S. R., Lehar, M., Rothstein, J. D., & Kuncl, R. W. (1999). Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiology of Disease*, 6(5), 335–346. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0253>

- Crain, S. M. (1966). Development of "Organotypic" Bioelectric Activities in Central Nervous Tissues During Maturation in Culture. *International Review of Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60135-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60135-X)
- Crain, S. M., & Bornstein, M. B. (1972). Organotypic bioelectric activity in cultured reagggregates of dissociated rodent brain cells. *Science*, *176*(4031), 182–184. <https://doi.org/10.1126/science.176.4031.182>
- Crews, F. T., Collins, M. A., Dlugos, C., Littleton, J., Wilkins, L., Neafsey, E. J., Pentney, R., Snell, L. D., Tabakoff, B., Zou, J., & Noronha, A. (2004). Alcohol-Induced Neurodegeneration: When, Where and Why? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *28*(2), 350–364. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000113416.65546.01>
- Croft, C. L., Futch, H. S., Moore, B. D., & Golde, T. E. (2019). Organotypic brain slice cultures to model neurodegenerative proteinopathies. *Molecular Neurodegeneration*, *14*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0346-0>
- Croft, Cara L., & Noble, W. (2018). Preparation of organotypic brain slice cultures for the study of Alzheimer's disease [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, *7*(1). <https://doi.org/10.12688/f1000research.14500.1>
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(11), 953–957. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- Czapiga, M., & Colton, C. A. (1999). Function of microglia in organotypic slice cultures. *Journal of Neuroscience Research*, *56*(6), 644–651. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990615\)56:6<644::AID-JNR10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990615)56:6<644::AID-JNR10>3.0.CO;2-9)
- Dai, X., Lercher, L. D., Clinton, P. M., Du, Y., Livingston, D. L., Vieira, C., Yang, L., Shen, M. M., & Dreyfus, C. F. (2003). The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. *Journal of Neuroscience*, *23*(13), 5846–5853. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-13-05846.2003>
- Danzer, S. C., Crooks, K. R. C., Lo, D. C., & McNamara, J. O. (2002). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-22-09754.2002>
- de Fátima Oliveira-Silva, I., Pereira, S. R. C., Fernandes, P. A., Ribeiro, A. F., Pires, R. G. W., & Ribeiro, A.

- M. (2014). Mild Thiamine Deficiency and Chronic Ethanol Consumption Modulate Acetylcholinesterase Activity Change and Spatial Memory Performance in a Water Maze Task. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(1), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0306-7>
- de Freitas-Silva, D. M., Resende, L. de S., Pereira, S. R. C., Franco, G. C., & Ribeiro, A. M. (2010). Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring. *Behavioural Brain Research*, 211(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.002>
- de Freitas Silva, D. M., Ferraz, V. P., & Ribeiro, Â. M. (2009). Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 177(2), 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.10.011>
- De Michele, P. (2016). *Analysis, tuning and implementation of neuronal models simulating Hippocampus dynamics Big Data Analytics in context of IoT View project Article CRESCO EDOC (EDucation On Cloud): Cloud computing in service of training and teaching for advanced scientific . March 2015.* <https://doi.org/10.6092/UNINA/FEDOA/10322>
- De Simoni, A., & Yu, L. M. Y. (2006). Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: Interface method. *Nature Protocols*, 1(3), 1439–1445. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.228>
- Debanne, D., Shulz, D. E., & Fregnac, Y. (1995). Temporal constraints in associative synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1139/y95-185>
- Debanne, Dominique, Gähwiler, B. H., & Thompson, S. M. (1994). Asynchronous pre- and postsynaptic activity induces associative long-term depression in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1148>
- Dhir, S., Tarasenko, M., Napoli, E., & Giulivi, C. (2019). Neurological, psychiatric, and biochemical aspects of thiamine deficiency in children and adults. *Frontiers in Psychiatry*, 10(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00207>
- Diedenhofen, B., & Musch, J. (2015). Cocor: A comprehensive solution for the statistical comparison of correlations. *PLoS ONE*, 10(4), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121945>
- Du, Y., & Dreyfus, C. F. (2002). Oligodendrocytes as providers of growth factors. *Journal of*

Neuroscience Research, 68(6), 647–654. <https://doi.org/10.1002/jnr.10245>

- Dwivedi, Y. (2009). Brain-derived neurotrophic factor: Role in depression and suicide. In *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. <https://doi.org/10.2147/ndt.s5700>
- Egert, U., Schlosshauer, B., Fennrich, S., Nisch, W., Fejtl, M., Knott, T., Müller, T., & Hämmerle, H. (1998). A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Research Protocols*, 2(4), 229–242. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(98\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(98)00013-0)
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E. M., & Black, I. B. (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2508–2521. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-08-02508.1996>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Estrada, J. A., Contreras, I., Pliego-Rivero, F. B., & Otero, G. A. (2014). Molecular mechanisms of cognitive impairment in iron deficiency: Alterations in brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor expression and function in the central nervous system. *Nutritional Neuroscience*, 17(5), 193–206. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.0000000084>
- Falkai, P., Steiner, J., Malchow, B., Shariati, J., Knaus, A., Bernstein, H. G., Schneider-Axmann, T., Kraus, T., Hasan, A., Bogerts, B., & Schmitt, A. (2016). Oligodendrocyte and interneuron density in hippocampal subfields in schizophrenia and association of oligodendrocyte number with cognitive deficits. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(MAR2016), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00078>
- Fedoroff, S., & Hall, C. (1979). *Evaluation of Cultures*. 15(8).
- Fields, R. D. (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. In *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.04.001>
- Fourie, C., Kiraly, M., Madison, D. V., & Montgomery, J. M. (2014). Paired whole cell recordings in organotypic hippocampal slices. *Journal of Visualized Experiments*, 91. <https://doi.org/10.3791/51958>
- Frisoni, G. B., Ganzola, R., Canu, E., Rüb, U., Pizzini, F. B., Alessandrini, F., Zoccatelli, G., Beltramello, A., Caltagirone, C., & Thompson, P. M. (2008). Mapping local hippocampal changes in Alzheimer's

- disease and normal ageing with MRI at 3 Tesla. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awn280>
- Frozza, R. L., Horn, A. P., Hoppe, J. B., Simão, F., Gerhardt, D., Comiran, R. A., & Salbego, C. G. (2009). A Comparative study of β -amyloid peptides A β 1-42 and A β 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochemical Research*, *34*(2), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9776-8>
- Fujita, H., Tanaka, J., Toku, K., Tateishi, N., Suzuki, Y., Matsuda, S., Sakanaka, M., & Maeda, N. (1996). Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: A morphometrical study. *Glia*, *18*(4), 269–281. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199612\)18:4<269::AID-GLIA2>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199612)18:4<269::AID-GLIA2>3.0.CO;2-T)
- Gähwiler, B. (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends in Neurosciences*, *20*(10), 471–477. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01122-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01122-3)
- Gähwiler, B. H. (1981a). Morphological differentiation of nerve cells in thin organotypic cultures derived from rat hippocampus and cerebellum. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *211*(1184), 287–290. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1981.0007>
- Gähwiler, B. H. (1981b). Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(81\)90003-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(81)90003-0)
- Gähwiler, B. H. (1984). Slice cultures of cerebellar, hippocampal and hypothalamic tissue. *Experientia*, *40*(3), 235–243. <https://doi.org/10.1007/BF01947561>
- Gallo, V., Zhou, J. M., McBain, C. J., Wright, P., Knutson, P. L., & Armstrong, R. C. (1996). Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-08-02659.1996>
- Gangolf, M., Wins, P., Thiry, M., El Moulaj, B., & Bettendorff, L. (2010). Thiamine triphosphate synthesis in rat brain occurs in mitochondria and is coupled to the respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(1), 583–594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054379>
- Gerlach, J., Donkels, C., Münzner, G., & Haas, C. A. (2016). Persistent Gliosis Interferes with Neurogenesis in Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00131>
- Geva-Sagiv, M., Las, L., Yovel, Y., & Ulanovsky, N. (2015). Spatial cognition in bats and rats: From sensory acquisition to multiscale maps and navigation. In *Nature Reviews Neuroscience*.

<https://doi.org/10.1038/nrn3888>

- Gibson, G. E., & Zhang, H. (2002). Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochemistry International*, *40*(6), 493–504. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00120-6)
- Gogolla, N., Galimberti, I., DePaola, V., & Caroni, P. (2006). Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging. *Nature Protocols*, *1*(3), 1165–1171. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.168>
- Goldschneider, D., & Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: A new paradigm in cell signaling and cancer therapy. In *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.13>
- Gong, W., Sencar, J., Bakkum, D. J., Jäckel, D., Obien, M. E. J., Radivojevic, M., & Hierlemann, A. R. (2016). Multiple single-unit long-term tracking on organotypic hippocampal slices using high-density microelectrode arrays. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(NOV), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00537>
- Gonzalez, A., Moya-Alvarado, G., Gonzalez-Billaut, C., & Bronfman, F. C. (2016). Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton*, *73*(10), 612–628. <https://doi.org/10.1002/cm.21312>
- Gosche, K. M., Mortimer, J. A., Smith, C. D., Markesbery, W. R., & Snowdon, D. A. (2002). Hippocampal volume as an index of Alzheimer neuropathology: Findings from the Nun study. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.10.1476>
- Grabiec, U., Hohmann, T., Hammer, N., & Dehghani, F. (2017). Organotypic hippocampal slice cultures as a model to study neuroprotection and invasiveness of tumor cells. *Journal of Visualized Experiments*, *2017*(126), 1–10. <https://doi.org/10.3791/55359>
- Harata, N., & Iwasaki, Y. (1995). Evidence for early blood-brain barrier breakdown in experimental thiamine deficiency in the mouse. *Metabolic Brain Disease*, *10*(2), 159–174. <https://doi.org/10.1007/BF01991863>
- Harper, C. (2009). The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol and Alcoholism*, *44*(2), 136–140. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn102>
- Harris, B. R., Gibson, D. A., Prendergast, M. A., Blanchard, J. A., Holley, R. C., Hart, S. R., Scotland, R. L., Foster, T. C., Pedigo, N. W., & Littleton, J. M. (2003). The Neurotoxicity Induced by Ethanol Withdrawal in Mature Organotypic Hippocampal Slices Might Involve Cross-Talk between

- Metabotropic Glutamate Type 5 Receptors and N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 27(11), 1724–1735.
<https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000093601.33119.E3>
- Hazell, A. S., McGahan, L., Tetzlaff, W., Bedard, A. M., Robertson, G. S., Nakabeppu, Y., & Hakim, A. M. (1998). Immediate-early gene expression in the brain of the thiamine-deficient rat. *Journal of Molecular Neuroscience*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF02737081>
- Hennigan, A., O'Callaghan, R. M., & Kelly, Á. M. (2007). Neurotrophins and their receptors: Roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochemical Society Transactions*.
<https://doi.org/10.1042/BST0350424>
- Holtzman, D. M., & Lowenstein, D. H. (1995). Selective inhibition of axon outgrowth by antibodies to NGF in a model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-11-07062.1995>
- Hoyumpa, A. M. (1980). Mechanisms of thiamin deficiency in chronic alcoholism. In *American Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/ajcn/33.12.2750>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
- Humpel, C. (2015). Organotypic Brain Slice Cultures : A Review. *Neuroscience, October*(1), 86–98.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.086.ORGANOTYPIC>
- Inaba, H., Kishimoto, T., Oishi, S., Nagata, K., Hasegawa, S., Watanabe, T., & Kida, S. (2016). Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines : potential microendophenotypes of Wernicke – Korsakoff syndrome. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(12), 1–12.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1224639>
- Irle, E., & Markowitsch, H. J. (1983). Widespread Neuroanatomical Damage and Learning Deficits Following Chronic Alcohol Consumption or Vitamin-B (Thiamine) Deficiency in Rats. *Behavioural Brain Research*, 9, 277–294.
- Jang, M., Gould, E., Xu, J., Kim, E. J., & Kim, J. H. (2019). Oligodendrocytes regulate presynaptic properties and neurotransmission through bdnf signaling in the mouse brainstem. *ELife*, 8, 1–26.
<https://doi.org/10.7554/eLife.42156>
- Jarrard, L. E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. In *Behavioral*

and Neural Biology. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(93\)90664-4](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)90664-4)

- Jessberger, S., Römer, B., Babu, H., & Kempermann, G. (2005). Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Experimental Neurology*, *196*(2), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.08.010>
- Jhala, S. S., & Hazell, A. S. (2011). Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: Consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochemistry International*, *58*(3), 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.11.019>
- Jhala, S. S., Wang, D., & Hazell, A. S. (2014). Thiamine deficiency results in release of soluble factors that disrupt mitochondrial membrane potential and downregulate the glutamate transporter splice-variant GLT-1b in cultured astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *448*(3), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.017>
- Kamada, M., Li, R. Y., Hashimoto, M., Kakuda, M., Okada, H., Koyanagi, Y., Ishizuka, T., & Yawo, H. (2004). Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *20*(10), 2499–2508. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03721.x>
- Kang, H., & Schuman, E. M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.7886457>
- Karuppagounder, S., & Gibson, G. E. (2009). Thiamine deficiency: A model of metabolic encephalopathy and of selective neuronal vulnerability. In *Metabolic Encephalopathy*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79112-8_12
- Ke, Z. J., Bowen, W. M., & Gibson, G. E. (2006). Peripheral inflammatory mechanisms modulate microglial activation in response to mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.04.011>
- Ke, Z. J., DeGiorgio, L. A., Volpe, B. T., & Gibson, G. E. (2003). Reversal of thiamine deficiency-induced neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *62*(2), 195–207. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.2.195>
- Kim, Y. S., & Joh, T. H. (2006). Microglia, major player in the brain inflammation: Their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. In *Experimental and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1038/emm.2006.40>
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2018). BDNF: A Key Factor

- with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(3), 579–593. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
- Kruse, M., Navarro, D., Desjardins, P., & Butterworth, R. F. (2004). Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: Relationship to selective vulnerability. *Neurochemistry International*, 45(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.12.007>
- Landis, D. M. D., Weinstein, L. A., & Skordeles, C. J. (1990). Serum influences the differentiation of membrane structure in cultured astrocytes. *Glia*, 3(3), 212–221. <https://doi.org/10.1002/glia.440030308>
- Langlais, P. J., Anderson, G., Guo, S. X., & Bondy, S. C. (1997). Increased cerebral free radical production during thiamine deficiency. *Metabolic Brain Disease*, 12(2), 137–143. <https://doi.org/10.1023/B:MEBR.0000007108.14989.e8>
- Langlais, P. J., & Savage, L. M. (1995). Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. *Behavioural Brain Research*, 68(1), 75–89. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)00162-9](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)00162-9)
- Langlais, P. J., & Zhang, S. X. (1993). Extracellular Glutamate Is Increased in Thalamus During Thiamine Deficiency-Induced Lesions and Is Blocked by MK-801. *Journal of Neurochemistry*, 61(6), 2175–2182. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07457.x>
- Langlais, P. J., Zhang, S. X., & Savage, L. M. (1996). Neuropathology of thiamine deficiency: An update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metabolic Brain Disease*, 11(1), 19–37. <https://doi.org/10.1007/BF02080929>
- Lawson, J. A., Vogrin, S., Bleasel, A. F., Cook, M. J., & Bye, A. M. E. (2000). Cerebral and cerebellar volume reduction in children with intractable epilepsy. *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb00122.x>
- Lee, H., Lee, D., Park, C. H., Ho, W. K., & Lee, S. H. (2012). GABA mediates the network activity-dependent facilitation of axonal outgrowth from the newborn granule cells in the early postnatal rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 36(6), 2743–2752. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08192.x>
- Lee, J., Duan, W., & Mattson, M. P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*.

<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01085.x>

- Lee, S., Yang, G., Yong, Y., Liu, Y., Zhao, L., Xu, J., Zhang, X., Wan, Y., Feng, C., Fan, Z., Liu, Y., Luo, J., & Ke, Z.-J. (2010). ADAR2-dependent RNA editing of GluR2 is involved in thiamine deficiency-induced alteration of calcium dynamics. *Molecular Neurodegeneration*, *5*(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-54>
- Lencz, T., McCarthy, G., Bronen, R. A., Scott, T. M., Inserni, J. A., Sass, K. J., Novelly, R. A., Kim, J. H., & Spencer, D. D. (1992). Quantitative magnetic resonance imaging in temporal lobe epilepsy: Relationship to neuropathology and neuropsychological function. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.410310610>
- Leuner, B., Glasper, E. R., & Gould, E. (2009). Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive. *The Journal of Comparative Neurology*, *517*(2), 123–133. <https://doi.org/10.1002/cne.22107>
- Leuner, B., Gould, E., & Shors, T. J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*, *16*(3), 216–224. <https://doi.org/10.1002/hipo.20153>
- Lindberg, O., Walterfang, M., Looi, J. C. L., Malykhin, N., Östberg, P., Zandbelt, B., Styner, M., Paniagua, B., Velakoulis, D., Örndahl, E., & Wahlund, L. O. (2012). Hippocampal shape analysis in alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration subtypes. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-112210>
- Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Ranganath, C., & Redish, A. D. (2017). Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature Neuroscience*, *20*(11), 1434–1447. <https://doi.org/10.1038/nn.4661>
- Liu, D., Ke, Z., & Luo, J. (2017). Thiamine Deficiency and Neurodegeneration: the Interplay Among Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy. *Molecular Neurobiology*, *54*(7), 5440–5448. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0079-9>
- Liu, J., Timm, D. E., & Hurley, T. D. (2008). *Pyriothiamine as a Substrate for Thiamine*. *281*(10), 6601–6607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510951200>
- Lonsdale, D. (2006). A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *3*(1), 49–59. <https://doi.org/10.1093/ecam/nek009>
- Lu, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. In *Learning and Memory*.

<https://doi.org/10.1101/lm.54603>

- Lu, D., Qu, C., Goussev, A., Jiang, H., Lu, C., Schallert, T., Mahmood, A., Chen, J., Li, Y., & Chopp, M. (2007). Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*. <https://doi.org/10.1089/neu.2007.0288>
- Lundgaard, I., Luzhynskaya, A., Stockley, J. H., Wang, Z., Evans, K. A., Swire, M., Volbracht, K., Gautier, H. O. B., Franklin, R. J. M., French-Constant, C., Attwell, D., & Káradóttir, R. T. (2013). Neuregulin and BDNF Induce a Switch to NMDA Receptor-Dependent Myelination by Oligodendrocytes. *PLoS Biology*, *11*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001743>
- Machado, A. (2002). Neuroanatomia Funcional- Machado. In *Neuroanatomia Funcional* (pp. 249–253).
- Makinodan, M., Okuda-Yamamoto, A., Ikawa, D., Toritsuka, M., Takeda, T., Kimoto, S., Tatsumi, K., Okuda, H., Nakamura, Y., Wanaka, A., & Kishimoto, T. (2013). Oligodendrocyte Plasticity with an Intact Cell Body In Vitro. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066124>
- Manzetti, S., Zhang, J., & Van Der Spoel, D. (2014). Thiamin function, metabolism, uptake, and transport. In *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi401618y>
- Martin, N. A., Bonner, H., Elkjær, M. L., D’Orsi, B., Chen, G., König, H. G., Svensson, M., Deierborg, T., Pfeiffer, S., Prehn, J. H., & Lambertsen, K. L. (2016). BID mediates Oxygen-Glucose deprivation-induced neuronal injury in organotypic hippocampal slice cultures and modulates tissue inflammation in a transient focal cerebral ischemia model without changing lesion volume. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00014>
- Martin, P. R., Singleton, C. K., & Hiller-Sturmhöfel, S. (2003). The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. In *Alcohol Research and Health*.
- Mattson, M. P., Guthrie, P. B., & Kater, S. B. (1989). Intrinsic factors in the selective vulnerability of hippocampal pyramidal neurons. In *Progress in clinical and biological research*.
- Mayes, A. R., Meudell, P. R., Mann, D., & Pickering, A. (1988). Location of Lesions in Korsakoff’s Syndrome: Neuropsychological and Neuropathological Data on Two Patients. *Cortex*, *24*(3), 367–388. [https://doi.org/10.1016/S0010-9452\(88\)80001-7](https://doi.org/10.1016/S0010-9452(88)80001-7)
- Mayr, J. A., Freisinger, P., Schlachter, K., Rolinski, B., Zimmermann, F. A., Scheffner, T., Haack, T. B., Koch, J., Ahting, U., Prokisch, H., & Sperl, W. (2011). Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway. *American Journal of*

Human Genetics. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.007>

- McBain, C. J., Boden, P., & Hill, R. G. (1989). Rat hippocampal slices “in vitro” display spontaneous epileptiform activity following long-term organotypic culture. *Journal of Neuroscience Methods*, 27(1), 35–49. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(89\)90051-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(89)90051-4)
- McRee, R. C., Terry-Ferguson, M., Langlais, P. J., Chen, Y., Nalwalk, J. W., Blumenstock, F. A., & Hough, L. B. (2000). Increased histamine release and granulocytes within the thalamus of a rat model of Wernicke’s encephalopathy. *Brain Research*, 858(2), 227–236. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02309-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02309-4)
- Meier, S., Bräuer, A. U., Heimrich, B., Nitsch, R., & Savaskan, N. E. (2004). Myelination in the hippocampus during development and following lesion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(9), 1082–1094. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-3469-5>
- Meng, Y., Okeda, R., Tajima, T., & Okada, S. (1998). An in vivo and in vitro comparative study on the mechanism of the selective vulnerability of the inferior colliculus in experimental thiamine-deficient encephalopathy. *Neuropathology*, 18(1), 27–32. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.1998.tb00074.x>
- Miller, A. P., Shah, A. S., Aperi, B. V., Budde, M. D., Pintar, F. A., Tarima, S., Kurpad, S. N., Stemper, B. D., & Glavaski-Joksimovic, A. (2015). Effects of blast overpressure on neurons and glial cells in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Frontiers in Neurology*, 6(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00020>
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2738>
- Morrison, M. E., & Mason, C. A. (1998). Granule neuron regulation of Purkinje cell development: Striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling. *Journal of Neuroscience*, 18(10), 3563–3573. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-10-03563.1998>
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. (2001). Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008104200>
- Mulholland, P. J., Self, R. L., Stepanyan, T. D., Little, H. J., Littleton, J. M., & Prendergast, M. A. (2005). Thiamine deficiency in the pathogenesis of chronic ethanol-associated cerebellar damage in vitro. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.077>

- Muller, D., Toni, N., Buchs, P.-A., Parisi, L., & Stoppini, L. (2001). Interface Organotypic Hippocampal Slice Cultures. In *Protocols for Neural Cell Culture* (pp. 13–27). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-207-4:13>
- Muller, D., Toni, N., Buchs, P., Parisi, L., & Stoppini, L. (1997). Interface Organotypic Hippocampal Slice Cultures. In *Protocols for Neural Cell Culture* (pp. 13–27). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-207-4:13>
- Nagele, R. G., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, K. C., & Wegiel, J. (2004). Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.01.007>
- Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B., & Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.016>
- Nakagawasai, O. (2005). Behavioral and neurochemical alterations following thiamine deficiency in rodents: Relationship to functions of cholinergic neurons. In *Yakugaku Zasshi*. <https://doi.org/10.1248/yakushi.125.549>
- Nakagawasai, O., Tadano, T., Hozumi, S., Tan-No, K., Nijijima, F., & Kisara, K. (2000). Immunohistochemical estimation of brain choline acetyltransferase and somatostatin related to the impairment of avoidance learning induced by thiamine deficiency. *Brain Research Bulletin*. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00248-3)
- Navarro, D., Zwingmann, C., Hazell, A. S., & Butterworth, R. F. (2005). Brain lactate synthesis in thiamine deficiency: A re-evaluation using ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Neuroscience Research*, 79(1–2), 33–41. <https://doi.org/10.1002/jnr.20290>
- Nazir, M., Lone, R., & Charoo, B. A. (2019). Infantile Thiamine Deficiency: New Insights into an Old Disease. In *Indian Pediatrics*. <https://doi.org/10.1007/s13312-019-1592-5>
- Nelson, M. D., Saykin, A. J., Flashman, L. A., & Riordan, H. J. (1998). Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: A meta-analytic study. *Archives of General Psychiatry*. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.5.433>
- Norberg, J., Kristensen, B. W., & Zimmer, J. (1999). Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Research Protocols*, 3(3), 278–290. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(98\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(98)00050-6)

- Numakawa, T., Suzuki, S., Kumamaru, E., Adachi, N., Richards, M., & Kunugi, H. (2010). BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histology and Histopathology*, 25(2), 237–258. <https://doi.org/10.14670/HH-25.237>
- O'keefe, J., & Nadel, L. (1979). Précis of O'Keefe & Nadel's *The hippocampus as a cognitive map*. *Behavioral and Brain Sciences*. <https://doi.org/10.1017/S0140525X00063949>
- Oliveira, F. A., Galan, D. T., Ribeiro, A. M., & Santos Cruz, J. (2007). Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K⁺ channels. *Brain Research*, 1134(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.064>
- Park, L. C.H., Zhang, H., & Gibson, G. E. (2001). Co-culture with astrocytes or microglia protects metabolically impaired neurons. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(1), 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00336-0](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00336-0)
- Park, Larry C.H., Calingasan, N. Y., Uchida, K., Zhang, H., & Gibson, G. E. (2000). Metabolic impairment elicits brain cell type-selective changes in oxidative stress and cell death in culture. *Journal of Neurochemistry*, 74(1), 114–124. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740114.x>
- Peckham, H., Giuffrida, L., Wood, R., Gonsalvez, D., Ferner, A., Kilpatrick, T. J., Murray, S. S., & Xiao, J. (2016). Fyn is an intermediate kinase that BDNF utilizes to promote oligodendrocyte myelination. *Glia*, 64(2), 255–269. <https://doi.org/10.1002/glia.22927>
- Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J., & Luskin, M. B. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-17-06706.2001>
- Petito, C. K., & Pulsinelli, W. A. (1984). Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: Possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 4(2), 194–205. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1984.28>
- Pinto, L. S. N. M., Gualberto, F. A. S., Pereira, S. R. C., Barros, P. A., Franco, G. C., & Ribeiro, A. M. (2006). Dietary restriction protects against chronic-ethanol-induced changes in exploratory behavior in Wistar rats. *Brain Research*, 1078(1), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.092>
- Pires, R. G. W., Pereira, S. R. C., Oliveira-Silva, I. F., Franco, G. C., & Ribeiro, A. M. (2005). Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: A study using a model

- of Wernicke–Korsakoff Syndrome. *Behavioural Brain Research*, 162(1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.02.032>
- Pires, R. G. W., Pereira, S. R. C., Pittella, J. E. H., Franco, G. C., Ferreira, C. L. M., Fernandes, P. A., & Ribeiro, A. M. (2001). The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70(2–3), 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00593-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00593-7)
- Pitkin, S. R., & Savage, L. M. (2004). Age-related vulnerability to diencephalic amnesia produced by thiamine deficiency: The role of time of insult. *Behavioural Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00208-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00208-0)
- Portari, G. V., Marchini, J. S., Vannucchi, H., & Jordao, A. A. (2008). Antioxidant Effect of Thiamine on Acutely Alcoholized Rats and Lack of Efficacy Using Thiamine or Glucose to Reduce Blood Alcohol Content. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103(5), 482–486. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00311.x>
- Prendergast, M. A., Harris, B. R., Mullholland, P. J., Blanchard, J. A., Gibson, D. A., Holley, R. C., & Littleton, J. M. (2004). Hippocampal CA1 region neurodegeneration produced by ethanol withdrawal requires activation of intrinsic polysynaptic hippocampal pathways and function of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, 124(4), 869–877. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.12.013>
- Purves, D., Augustine, G. J., Hall, W. C., Lamantia, A., Mcnamara, J. O., & White, L. E. (2010). *Neurociências | 4ª Edição*.
- Qu, W. S., Wang, Y. H., Wang, J. P., Tang, Y. X., Zhang, Q., Tian, D. S., Yu, Z. Y., Xie, M. J., & Wang, W. (2010). Galectin-1 enhances astrocytic BDNF production and improves functional outcome in rats following ischemia. *Neurochemical Research*, 35(11), 1716–1724. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0234-z>
- Raineteau, O., Rietschin, L., Gradwohl, G., Guillemot, F., & Gähwiler, B. H. (2004). Neurogenesis in hippocampal slice cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(2), 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.01.003>
- Resende, L. S., Ribeiro, A. M., Werner, D., Hall, J. M., & Savage, L. M. (2012). Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. *Behavioural Brain Research*, 232(2), 421–425.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.004>

- Revest, J. M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. (2009). Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Molecular Psychiatry*, *14*(10), 959–967. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.15>
- Rieger, D. K., Navarro, E., Buendia, I., Parada, E., González-Lafuente, L., Leon, R., Costa, A. P., Heinrich, I. A., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Lopez, M. G., Egea, J., & Leal, R. B. (2017). ConBr, A Lectin Purified from the Seeds of *Canavalia brasiliensis*, Protects Against Ischemia in Organotypic Culture of Rat Hippocampus: Potential Implication of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neurochemical Research*, *42*(2), 347–359. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2078-7>
- Robertson, D. M., Wasan, S. M., & Skinner, D. B. (1968). Ultrastructural features of early brain stem lesions of thiamine-deficient rats. *American Journal of Pathology*.
- Roecklein, B., Levin, S. W., Comly, M., & Mukherjee, A. B. (1985). Intrauterine growth retardation induced by thiamine deficiency and pyriithiamine during pregnancy in the rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(85\)90269-8](https://doi.org/10.1016/0002-9378(85)90269-8)
- Roland, J. J., Mark, K., Vetreno, R. P., & Savage, L. M. (2008). Increasing hippocampal acetylcholine levels enhance behavioral performance in an animal model of diencephalic amnesia. *Brain Research*, *1234*, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.090>
- Rössler, M., Zarski, R., Bohl, J., & Ohm, T. G. (2002). Stage-dependent and sector-specific neuronal loss in hippocampus during alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-001-0475-7>
- Sadgrove, M. P., Laskowski, A., & Gray, W. P. (2006). Examination of granule layer cell count, cell density, and single-pulse BrdU incorporation in rat organotypic hippocampal slice cultures with respect to culture medium, septotemporal position, and time in vitro. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.21000>
- Sahay, A., & Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience*, *10*(9), 1110–1115. <https://doi.org/10.1038/nn1969>
- Said, H. M. (2011). Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. In *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20110326>
- Saito, M., Smiley, J., Toth, R., & Vadasz, C. (2002). Microarray analysis of gene expression in rat hippocampus after chronic ethanol treatment. *Neurochemical Research*, *27*(10), 1221–1229.

<https://doi.org/10.1023/A:1020937728506>

- Salazar-Colocho, P., Lanciego, J. L., Del Rio, J., & Frechilla, D. (2008). Ischemia induces cell proliferation and neurogenesis in the gerbil hippocampus in response to neuronal death. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.01.008>
- Sato, Y., Chin, Y., Kato, T., Tanaka, Y., Tozuka, Y., Mase, M., Ageyama, N., Ono, F., Terao, K., Yoshikawa, Y., & Hisatsune, T. (2009). White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys. *Neuroscience Research*, *65*(1), 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.05.010>
- Savage, L. M. (2003). Diencephalic Damage Decreases Hippocampal Acetylcholine Release During Spontaneous Alternation Testing. *Learning & Memory*, *10*(4), 242–246. <https://doi.org/10.1101/lm.60003>
- Savage, L. M., & Guarino, S. (2010). Memory for reward location is enhanced even though acetylcholine efflux within the amygdala is impaired in rats with damage to the diencephalon produced by thiamine deficiency. *Neurobiology of Learning and Memory*, *94*(4), 554–560. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.09.008>
- Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., & Croll, S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Experimental Neurology*, *192*(2), 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.016>
- Schuff, N., Amend, D. L., Knowlton, R., Norman, D., Fein, G., & Weiner, M. W. (1999). Age-related metabolite changes and volume loss in the hippocampus by magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Neurobiology of Aging*. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00022-6)
- Sechi, G., & Serra, A. (2007). Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. *The Lancet Neurology*, *6*(5), 442–455. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70104-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70104-7)
- Sena, I. C. C. (2015). *O Aprendizado De Uma Tarefa De Navegação Espacial Altera Os Níveis De Gaba No Hipocampo De Camundongos Swiss*. 88.
- Sena, I. C. C. (2019). *Efeitos da deficiência de tiamina e do processo de aprendizagem espacial sobre parâmetros neuroquímicos e imunológicos do hipocampo e tálamo de camundongos Swiss*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Shi, F., Liu, B., Zhou, Y., Yu, C., & Jiang, T. (2009). Hippocampal volume and asymmetry in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Meta-analyses of MRI studies. In *Hippocampus*.

<https://doi.org/10.1002/hipo.20573>

- Šimić, G., Kostović, I., Winblad, B., & Bogdanović, N. (1997). Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *Journal of Comparative Neurology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970324\)379:4<482::AID-CNE2>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970324)379:4<482::AID-CNE2>3.0.CO;2-Z)
- Singleton, C., & Martin, P. (2001). Molecular Mechanisms of Thiamine Utilization. *Current Molecular Medicine*, 1(2), 197–207. <https://doi.org/10.2174/1566524013363870>
- Smith, M. E. (2005). Bilateral hippocampal volume reduction in adults with post-traumatic stress disorder: A meta-analysis of structural MRI studies. *Hippocampus*. <https://doi.org/10.1002/hipo.20102>
- Sparks, F. T. (2012). *Interactions of the Hippocampus and non-hippocampal long-term memory systems during learning, remembering, and over time.*
- Stahl, K., Mylonakou, M. N., Skare, Amiry-Moghaddam, M., & Torp, R. (2011). Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1378, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.090>
- Stoppini, L., Buchs, P.-A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90128-M](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90128-M)
- Sugai, F., Yamamoto, Y., Miyaguchi, K., Zhou, Z., Sumi, H., Hamasaki, T., Goto, M., & Sakoda, S. (2004). Benefit of valproic acid in suppressing disease progression of ALS model mice. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03765.x>
- Suh, E. C., Jung, Y. J., Kim, Y. A., Park, E. M., & Lee, K. E. (2008). A β 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures. *NeuroToxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.04.001>
- Sullivan, E. V, & Marsh, L. (2003). Hippocampal volume deficits in alcoholic Korsakoff's syndrome. *Neurology*, 61(12), 1716–1719. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000098940.31882.BB>
- Sullivan, E. V, & Pfefferbaum, A. (2009). Neuroimaging of the Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Alcohol and Alcoholism*, 44(2), 155–165. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn103>
- Sypecka, J., Sarnowska, A., Gadomska-Szabłowska, I., Lukomska, B., & Domanska-Janik, K. (2013).

- Differentiation of glia-committed NG2 cells: The role of factors released from hippocampus and spinal cord. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 73(1), 116–129.
- Tallaksen, C. M. E., Bøhmer, T., & Bell, H. (1992). Blood and Serum Thiamin and Thiamin Phosphate Esters Concentrations in Patients with Alcohol Dependence Syndrome Before and After Thiamin Treatment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1992.tb01384.x>
- Tellez, I., & Terry, R. D. (1968). Fine structure of the early changes in the vestibular nuclei of the thiamine-deficient rat. *American Journal of Pathology*.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., & Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
- Todd, K. G., & Butterworth, R. F. (1999). Early microglial response in experimental thiamine deficiency: An immunohistochemical analysis. *Glia*, 25(2), 190–198. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990115\)25:2<190::AID-GLIA9>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(19990115)25:2<190::AID-GLIA9>3.0.CO;2-B)
- Torvik, A. (2009). Brain lesions in alcoholics: Neuropathological observations. *Acta Medica Scandinavica*, 221(S717), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1987.tb13041.x>
- Trostler, N., Guggenheim, K., Havivi, E., & Sklan, D. (1977). Effect of thiamine deficiency in pregnant and lactating rats on the brain of their offspring. *Nutrition and Metabolism*. <https://doi.org/10.1159/000176075>
- Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Szalai, G., Sonntag, W. E., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2014). Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: Effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt177>
- Tyler, W. J., & Pozzo-Miller, L. D. (2001). BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(12), 4249–4258.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404410>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2806848>

- Ucar, B., & Humpel, C. (2019). Therapeutic efficacy of glial cell-derived neurotrophic factor loaded collagen scaffolds in ex vivo organotypic brain slice Parkinson's disease models. *Brain Research Bulletin*, 149(April), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.04.012>
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.291.5504.657>
- Vanguilder, H. D., Bixler, G. V., Sonntag, W. E., & Freeman, W. M. (2012). Hippocampal expression of myelin-associated inhibitors is induced with age-related cognitive decline and correlates with deficits of spatial learning and memory. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07671.x>
- Vedder, L. C., Hall, J. M., Jabrouin, K. R., & Savage, L. M. (2015). Interactions Between Chronic Ethanol Consumption and Thiamine Deficiency on Neural Plasticity, Spatial Memory, and Cognitive Flexibility. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1111/acer.12859>
- Vedder, L. C., & Savage, L. M. (2017). BDNF regains function in hippocampal long-term potentiation deficits caused by diencephalic damage. *Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1101/lm.043927.116>
- Vetreno, Ryan P., Hall, J. M., & Savage, L. M. (2011). Alcohol-related amnesia and dementia: Animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(4), 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.01.003>
- Vetreno, Ryan P., Ramos, R. L., Anzalone, S., & Savage, L. M. (2012). Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff syndrome. *Brain Research*, 1436, 178–192. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.11.038>
- Vetreno, Ryan P, Anzalone, S. J., & Savage, L. M. (2009). *Dependent on Task Demands*. 90(1), 237–244.
- Vetreno, Ryan Peter. (2011). Thiamine Deficiency-Induced Neurodegeneration And Neurogenesis. In *St. Thomas Aquinas College*.
- Vigil, F. A. B., Oliveira-Silva, I. de F., Ferreira, L. F., Pereira, S. R. C., & Ribeiro, A. M. (2010). Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behavioural Brain Research*, 210(1), 140–142. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.019>
- von Bohlen und Halbach, O., & von Bohlen und Halbach, V. (2018). BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 729–741.

<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2782-x>

Vondran, M. W., Clinton-Luke, P., Honeywell, J. Z., & Dreyfus, C. F. (2010). BDNF +/- mice exhibit deficits in oligodendrocyte lineage cells of the basal forebrain. *Glia*, *58*(7), 848–856. <https://doi.org/10.1002/glia.20969>

Walker, D. W., Barnes, D. E., Zornetzer, S. F., Hunter, B. E., & Kubanis, P. (1980). Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.7394532>

Wang, X., Xu, M., Frank, J. A., Ke, Z. ji, & Luo, J. (2017). Thiamine deficiency induces endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in human neurons derived from induced pluripotent stem cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *320*, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.02.009>

Watanabe, I., Tomita, T., Hung, K. S., & Iwasaki, Y. (1981). Edematous necrosis in thiamine-deficient encephalopathy of the mouse. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1097/00005072-198107000-00008>

Wilhelm, J., Frieling, H., Hillemacher, T., Degner, D., Kornhuber, J., & Bleich, S. (2008). Hippocampal volume loss in patients with alcoholism is influenced by the consumed type of alcoholic beverage. *Alcohol and Alcoholism*. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn002>

Wolf, M. K. (1970). Anatomy of cultured mouse cerebellum. II. Organotypic migration of granule cells demonstrated by silver impregnation of normal and mutant cultures. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.901400304>

Xiu, M. H., Hui, L., Dang, Y. F., De Hou, T., Zhang, C. X., Zheng, Y. L., Chen, D. C., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2009). Decreased serum BDNF levels in chronic institutionalized schizophrenia on long-term treatment with typical and atypical antipsychotics. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.08.011>

Yang, J., Harte-Hargrove, L. C., Siao, C. J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., Jing, D., LaFrancois, J. J., Bath, K. G., Mark, W., Ballon, D., Lee, F. S., Scharfman, H. E., & Hempstead, B. L. (2014). ProBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.040>

Ye, Z. C., & Sontheimer, H. (1998). Astrocytes protect neurons from neurotoxic injury by serum glutamate. *Glia*, *22*(3), 237–248. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-)

1136(199803)22:3<237::AID-GLIA3>3.0.CO;2-2

- Yonezawa, T., & Iwanami, H. (1966). An Experimental Study of Thiamine Deficiency in Nervous Tissue, using Tissue Culture Technics. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 25(3), 362–372. <https://doi.org/10.1097/00005072-196607000-00002>
- Zahr, N. M., Kaufman, K. L., & Harper, C. G. (2011). Clinical and pathological features of alcohol-related brain damage. *Nature Reviews Neurology*, 7(5), 284–294. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.42>
- Zajac, M. S., Pang, T. Y. C., Wong, N., Weinrich, B., Leang, L. S. K., Craig, J. M., Saffery, R., & Hannan, A. J. (2010). Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus*. <https://doi.org/10.1002/hipo.20658>
- Zhao, N., Zhong, C., Wang, Y., Zhao, Y., Gong, N., Zhou, G., Xu, T., & Hong, Z. (2008). Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. *Neurobiology of Disease*, 29(2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.08.014>
- Zhao, Y., Pan, X., Zhao, J., Wang, Y., Peng, Y., & Zhong, C. (2009). Decreased transketolase activity contributes to impaired hippocampal neurogenesis induced by thiamine deficiency. *Journal of Neurochemistry*, 111(2), 537–546. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06341.x>
- Zottoli, S. J., & Seyfarth, E. A. (2018). Mary Jane Hogue (1883–1962): A pioneer in human brain tissue culture. *Journal of the History of the Neurosciences*. <https://doi.org/10.1080/0964704X.2018.1468967>
- Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2009). Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*, 5(6), 311–322. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.54>

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DAS RELAÇÕES ENTRE PARÂMETROS EPIGENÉTICOS, MORFOLÓGICOS E DÉFICITS COGNITIVOS INDUZIDOS PELA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS", protocolo do CEUA: 314/2016 sob a responsabilidade de Angela Maria Ribeiro que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/05/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	14/12/2016 a 30/05/2020
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	3
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Linhagem Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Considerações posteriores:

08/05/2017	Aprovado na reunião do dia 08/05/2017. Validade: 08/05/2017 a 07/05/2022
------------	--

Belo Horizonte, 27/09/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

ANEXO B

Composição meio MEM:

SAIS ORGÂNICOS	mg/L		
CaCl ₂ .H ₂ O	264,87	L-treonina	48,00
KCl	400,00	L-triptofano	10,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00	L-tirosina	52,10
NaCl	6.800,00	L-valina	46,00
NaHCO ₃	2.200,00	VITAMINAS	mg/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	140,00	Pantotenato de cálcio	1,00
AMINOÁCIDOS	mg/L	Cloreto de colina	1,00
L-alanina	8,90	Ácido fólico	1,00
L-arginina.HCl	126,00	Inositol	2,00
L-asparagina	15,00	Nicotinamida	1,00
L-ácido aspártico	13,30	Piridoxal.HCl	1,00
L-cistina	31,29	Riboflavina	0,10
L-ácido glutâmico	14,70	Tiamina.HCl	1,00
L-glutamina	292,00	OUTROS COMPONENTES	mg/L
Glicina	7,50	Glicose	1.000,00
L-histidina.HCl.H ₂ O	42,00	Vermelho de fenol	10,00
L-isoleucina	52,00		
L-leucina	52,00		
L-lisina.HCl	72,00		
L-metionina	15,00		
L-fenilalanina	32,00		
L-prolina	11,50		
L-serina	10,50		

IMPORTANTE:
Todos os Meios Líquidos VITROCELL prontos para uso contém antibiótico/antimicótico
Sulfato de Gentamicina: 50 mg/L
Anfotericina B: 25 µg/ml

Composição Meio Neurobasal:

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75.0	30.0	0.4
L-Alanine	89.0	2.0	0.02247191
L-Arginine hydrochloride	211.0	84.0	0.39810428
L-Asparagine-H ₂ O	150.0	0.83	0.0055333334
L-Cysteine	121.0	31.5	0.2603306
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	210.0	42.0	0.2
L-Isoleucine	131.0	105.0	0.8015267

L-Leucine	131.0	105.0	0.8015267
L-Lysine hydrochloride	183.0	146.0	0.7978142
L-Methionine	149.0	30.0	0.20134228
L-Phenylalanine	165.0	66.0	0.4
L-Proline	115.0	7.76	0.06747826
L-Serine	105.0	42.0	0.4
L-Threonine	119.0	95.0	0.79831934
L-Tryptophan	204.0	16.0	0.078431375
L-Tyrosine	181.0	72.0	0.39779004
L-Valine	117.0	94.0	0.8034188
Vitamins			
Choline chloride	140.0	4.0	0.028571429
D-Calcium pantothenate	477.0	4.0	0.008385744
Folic Acid	441.0	4.0	0.009070295
Niacinamide	122.0	4.0	0.032786883
Pyridoxal hydrochloride	204.0	4.0	0.019607844
Riboflavin	376.0	0.4	0.0010638298
Thiamine hydrochloride	337.0	4.0	0.011869436
Vitamin B12	1355.0	0.0068	5.0184503E-6
i-Inositol	180.0	7.2	0.04
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl₂) (anhyd.)	111.0	200.0	1.8018018
Ferric Nitrate (Fe(NO₃)₃·9H₂O)	404.0	0.1	2.4752476E-4
Magnesium Chloride (anhydrous)	95.0	77.3	0.8136842
Potassium Chloride (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Sodium Bicarbonate (NaHCO₃)	84.0	2200.0	26.190475
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	4000.0	68.965515
Sodium Phosphate monobasic (NaH₂PO₄·H₂O)	138.0	125.0	0.9057971
Zinc sulfate (ZnSO₄·7H₂O)	288.0	0.194	6.736111E-4
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	4500.0	25.0
HEPES	238.0	2600.0	10.92437
Phenol Red	376.4	8.1	0.021519661
Sodium Pyruvate	110.0	25.0	0.22727273

Composição B27 (Confidencial) – Termofisher

Components	Concentration (mg/L)	mM
Biotin	confidential	n/a
DL Alpha Tocopherol Acetate	confidential	n/a
DL Alpha-Tocopherol	confidential	n/a
Vitamin A (acetate)	confidential	n/a
BSA, fatty acid free Fraction V	confidential	n/a
Catalase	confidential	n/a
Human Recombinant Insulin	confidential	n/a
Human Transferrin	confidential	n/a
Superoxide Dismutase	confidential	n/a
Corticosterone	confidential	n/a
D-Galactose	confidential	n/a
Ethanolamine HCl	confidential	n/a
Glutathione (reduced)	confidential	n/a
L-Carnitine HCl	confidential	n/a
Linoleic Acid	confidential	n/a
Linolenic Acid	confidential	n/a
Progesterone	confidential	n/a
Putrescine 2HCl	confidential	n/a
Sodium Selenite	confidential	n/a
T3 (triiodo-L-thyronine)	confidential	n/a