

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS

JULIANA OLIVEIRA MORAES

**MODELO EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA DE TIAMINA INDUZIDA POR
AMPRÓLIO EM CAMUNDONGOS**

Araguaína
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS

JULIANA OLIVEIRA MORAES

**MODELO EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA DE TIAMINA INDUZIDA POR
AMPRÓLIO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova

Araguaína

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M827m Moraes, Juliana Oliveira.

Modelo experimental de deficiência de tiamina induzida por amprólio em camundongos. / Juliana Oliveira Moraes. – Araguaína, TO, 2017.

72 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2017.

Orientador: Fabiano Mendes de Cordova

1. Polioencefalomálacia. 2. Vitamina B1. 3. Neurodegeneração. 4. Estresse oxidativo. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JULIANA OLIVEIRA MORAES

MODELO EXPERIMENTAL DE DEFICIÊNCIA DE TIAMINA INDUZIDA POR
AMPRÓLIO EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova

Aprovada em: 23/08/2017.

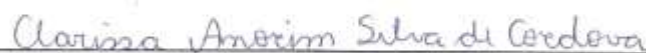
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova (Orientador)



Profa. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva



Profa. Dra. Clarissa Amorim Silva de Cordova

Ao meu esposo Willian e a minha filha
Helena, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser sempre o meu sustento nos momentos mais difíceis e por iluminar a minha caminhada.

Ao meu esposo Willian, pelo amor, companheirismo e por seu apoio incondicional. O seu incentivo foi fundamental para realização desse trabalho.

À minha filha Helena, luz da minha vida, por me ensinar que posso superar qualquer obstáculo.

Aos meus pais, Maria de Jesus e Raimundo Nonato por sempre estarem ao meu lado me incentivando quando mais precisei.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova por sua disponibilidade, paciência e simplicidade em repassar seus conhecimentos.

Aos meus colegas de mestrado, Maria Cirlene, Isaura, Fabiana, Helane, Osmar e Alessandro por compartilhar experiências e pela amizade que levarei para vida toda.

Às minhas colegas de trabalho Mara e Kelly por entenderem minha ausência durante o período de mestrado.

Aos professores do PPGSaspt pelo compartilhamento de experiências e pelos ensinamentos. Com certeza foram de grande valia.

À Secretaria Municipal de Saúde de Araguaína por ter me concedido liberação para realização desse mestrado.

A todos, que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

As doenças neurológicas são bastante variadas e de grande impacto econômico na pecuária. Os distúrbios do sistema nervoso central (SNC) podem ser causados por vários agentes etiológicos, como agentes biológicos e por distúrbios metabólicos. Neste caso, destaca-se a polioencefalomalácia (PEM) desencadeada por deficiência de tiamina (vitamina B1). A PEM tem sido descrita em várias regiões do Brasil, envolvendo bovinos, ovinos e caprinos. Entretanto, a deficiência de tiamina é importante também para carnívoros (paralisia de Chastek) e humanos (doença de Wernicke e síndrome de Wernicke-Korsakoff). As regiões do SNC envolvidas na PEM são variadas e contraditórias, mas são afetadas desde áreas corticais até regiões profundas como mesencéfalo e tálamo. Nestes locais, tipicamente há degeneração e necrose neuronal, com envolvimento adjacente de alterações astrocitárias e inflamatórias. Pouco ainda se conhece sobre os mecanismos moleculares e celulares da degeneração e morte dos neurônios, entretanto, considera-se que o processo relacionado à deficiência de tiamina se inicia por defeitos metabólicos na mitocôndria com conseqüente estabelecimento de estresse oxidativo. No presente trabalho objetivou-se determinar diferentes parâmetros relacionados à deficiência de tiamina no sistema nervoso central em um modelo *in vivo* com intuito de avaliar a ocorrência de morte celular e os mecanismos moleculares envolvidos, associação de alterações comportamentais nos animais-modelo e o delineamento de estratégias neuroprotetoras eficientes, caracterizando as áreas do SNC envolvidas na degeneração induzida por deficiência de tiamina. O modelo de deficiência dietética em associação com injeções do antagonista de tiamina, amprólio, foi utilizado no presente estudo. Os animais foram tratados por 15 ou 20 dias, divididos em 6 grupos de tratamento: controle (Cont), amprólio (Amp), amprólio e Trolox[®] (Amp+Tr), amprólio e DMSO (Amp+DmsO), Trolox[®] (Tr) e DMSO (DmsO). Os camundongos submetidos ao modelo de deficiência de tiamina (grupo Amp) exibiram redução significativa no ganho de peso corporal, após 15 e 20 dias de tratamento. À análise histopatológica, foi observado no grupo Amp esteatose hepática centrolobular em 15 dias e difusa quando tratados por 20 dias, além de proteinúria moderada. Trolox[®] e DMSO atenuaram acentuadamente a esteatose (grupos Amp+Tr e Amp+DmsO). Não foram observadas alterações histológicas no SNC em 15 ou em 20 dias de tratamento. Entretanto, a viabilidade celular do córtex cerebral reduziu significativamente no grupo Amp após 20 dias de tratamento; efeito que foi revertido nos grupos Amp+Tr e Amp+DmsO. Além disso, os animais deficientes (Amp) apresentaram alterações comportamentais como redução nas atividades de ambulação e exploratória e na coordenação motora e, de modo interessante, Trolox[®] e DMSO atenuaram estes efeitos. Estes dados sugerem que no modelo de deficiência de tiamina com amprólio os animais desenvolvem alterações neurológicas e metabólicas, associadas ao estresse oxidativo e, possivelmente, inflamação. Além disso, o modelo se mostra viável para estudo da deficiência da vitamina com estabelecimento de um processo progressivo gradual, sem ser acentuadamente agressivo, como no clássico modelo da piriamina.

Palavras-chave: Polioencefalomalácia, Vitamina B₁, Neurodegeneração, Neuroproteção, Estresse oxidativo, Esteatose hepática.

ABSTRACT

Neurological diseases are quite varied and have a great economic impact on livestock. Central nervous system (CNS) disorders may be caused by various etiologic agents, such as biological agents and by metabolic disorders. In this case, we highlight the polioencephalomalacia (PEM) triggered by thiamine deficiency (vitamin B1). PEM has been described in several regions of Brazil, involving cattle, sheep and goats. However, thiamine deficiency is important also for carnivores (Chastek's palsy) and humans (Wernicke disease and Wernicke-Korsakoff syndrome). The CNS regions involved in PEM are varied and contradictory, but are affected from cortical areas to deep regions such as the midbrain and thalamus. At these sites, there is typically neuronal degeneration and necrosis, with adjacent involvement of astrocytic and inflammatory changes. Little is known about the molecular and cellular mechanisms of degeneration and death of neurons. However, it is considered that the process related to thiamine deficiency is initiated by metabolic defects in the mitochondria with consequent establishment of oxidative stress. In the present work, we aimed to determine different parameters related to thiamine deficiency in the CNS in an *in vivo* model to evaluate the occurrence of cell death and the molecular mechanisms involved, association of behavioral changes and the design of efficient neuroprotective strategies, characterizing the CNS areas involved in thiamine deficiency-induced degeneration. The model of dietary deficiency in combination with injections of the thiamine antagonist, amprolium, was used in the present study. The animals were treated for 15 or 20 days and divided into 6 treatment groups: control (cont), amprolium (Amp), amprolium and Trolox[®] (Amp+Tr), amprolium and DMSO (Amp+DmsO), Trolox[®] (Tr) and DMSO (DmsO). Mice subjected to the thiamine deficiency model (Amp) exhibited a significant reduction in body weight gain after 15 and 20 days of treatment. The histopathological analysis revealed in the Amp group, centrolobular hepatic steatosis at 15-day and diffuse hepatic steatosis when treated for 20 days, in addition to moderate proteinuria. Trolox[®] and DMSO markedly attenuated steatosis (Amp+Tr and Amp+DmsO groups). No histological changes were observed in the CNS within 15 or 20 days of treatment. However, the cellular viability of the cerebral cortex significantly reduced in the Amp group after 20 days of treatment; which effect was reversed in the Amp+Tr and Amp+DmsO groups. In addition, deficient animals (Amp) presented behavioral changes such as reduction in ambulation and exploratory activities and in motor coordination and, interestingly, Trolox[®] and DMSO attenuated these effects. These data suggest that in the model of thiamine deficiency with amprolium the animals develop neurological and metabolic alterations, associated with oxidative stress and possibly inflammation. In addition, the model proves feasible for the study of vitamin deficiency with the establishment of a gradual progressive process, without being markedly aggressive, as in the classic model of pyridoxamine.

Keywords: Polioencephalomalacia, Vitamin B₁, Neurodegeneration, Neuroprotection, Oxidative stress, Hepatic steatosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Componentes-chave da cascata de eventos associados à vulnerabilidade focal na deficiência de tiamina	21
Figura 2. Delineamento experimental do modelo in vivo de deficiência de tiamina com amprólio com tempos de duração de 15 (A) ou 20 dias (B).....	31
Figura 3. Avaliação da viabilidade celular em fatias encefálicas de camundongos deficientes em tiamina com amprólio através do método colorimétrico de redução do TTC	33
Figura 4. Viabilidade celular no encéfalo de camundongos deficientes em tiamina com amprólio.....	38
Figura 5. Histopatologia do encéfalo de camundongos deficientes em tiamina com amprólio tratados por 15 dias	39
Figura 6. Histopatologia do encéfalo de camundongos deficientes em tiamina com amprólio tratados por 20 dias	40
Figura 7. Histopatologia de órgãos de camundongos deficientes em tiamina com amprólio tratados por 15 dias	41
Figura 8. Histopatologia de órgãos de camundongos deficientes em tiamina com amprólio tratados por 20 dias	42
Figura 9. Efeitos comportamentais em campo aberto nos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com amprólio tratados por 15 e 20 dias	44
Figura 10. Teste do rotarod realizado nos camundongos tratados por 15 ou 20 dias no modelo de deficiência de tiamina com amprólio	46
Quadro 1. Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos do modelo de deficiência de tiamina com amprólio, realizados durante 15 ou 20 dias.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ganho de peso corporal dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com amprólio	35
Tabela 2. Consumo de ração dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com amprólio.....	36
Tabela 3. Quantificação do grau de lesões histopatológicas, observadas no fígado, rim, pulmão, e coração dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com amprólio	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	amprólio
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BHE	barreira hematoencefálica
DMSO	dimetilsulfóxido
DT	deficiência de tiamina
EEB	encefalopatia espongiforme bovina
EET	encefalopatia espongiforme transmissível
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
GABA	ácido gama-aminobutírico (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
NO	óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
PEM	polioencefalomalácia
SNC	sistema nervoso central
TR	Trolox [®]
TTC	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Tiamina	15
2.2	Deficiência de tiamina e neurodegeneração	17
2.3	Vulnerabilidade regional do sistema nervoso central e lesões causadas pela deficiência de tiamina	20
2.4	Substâncias com ação antioxidante e anti-inflamatória	23
2.4.1	DmsO	23
2.4.2	Trolox	25
2.5	Modelos experimentais de deficiência de tiamina	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.1	Objetivos específicos	29
4	MÉTODOS	30
4.1	Animais	30
4.2	Tratamentos <i>in vivo</i> - modelo de deficiência de tiamina	30
4.3	Coleta de amostras e análise histopatológica	32
4.4	Determinação da viabilidade celular	32
4.5	Análise comportamental	33
4.6	Análise estatística	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Ganho de peso	35
5.2	Consumo de ração	36
5.3	Viabilidade celular	36
5.4	Histopatologia	39
5.5	Análise comportamental	43
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE A	72

1 INTRODUÇÃO

A importância das doenças com manifestação neurológica em bovinos cresceu desde o surgimento da encefalopatia espongiforme bovina (EEB), uma doença neurodegenerativa que acomete bovinos, e que faz parte do grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) (WELLS et al., 1987), tornando-se uma das principais barreiras sanitárias internacionais de bovinos e seus produtos (BARROS et al., 2006).

No Brasil, a enfermidade neurológica mais diagnosticada nos bovinos é a raiva, caracterizando a importância socioeconômica e de saúde pública das enfermidades que acometem o sistema nervoso central (SNC) (GALIZA et al., 2010). No entanto, para realização do diagnóstico diferencial das neuropatias devem-se incluir todas as causas possíveis de doença, inclusive as de origem em distúrbios metabólicos do SNC, como a polioencefalomalácia (PEM) (BARROS et al., 2006).

A PEM é descrita como um distúrbio metabólico desencadeado por deficiência de tiamina (vitamina B1) (SANT'ANA et al., 2009c). É caracterizada por necrose com amolecimento (malácia) da substância cinzenta (pólio) do encéfalo. A denominação de necrose cerebrocortical é utilizada para designar a mesma condição na Europa (EDWIN; JACKMAN, 1973).

PEM é descrita como uma doença nervosa e não infecciosa que afeta bovinos, ovinos, caprinos, bubalinos, caninos, felinos e humanos (RADOSTITS; ZACHARY, 2009; VETRENO et al., 2012). Apresenta distribuição mundial e perdas econômicas relevantes em vários países (APLEY, 2015). A deficiência de tiamina (DT) foi considerada por muito tempo a causa da PEM, que poderia ocorrer associada a determinadas condições alimentares, como altas quantidades de grãos (HAVEN; CALDWELL; JENSEN, 1983) e mudança de lotes de pastagens pobres para pastos jovens e tenros (JENSEN; GRINER; ADAMS, 1956).

Em humanos, a DT foi descrita pela primeira vez por Carl Wernicke no século XIX (THOMSON et al., 2008), sendo insuficiências dietéticas a causa atribuída. É denominada de beribéri e é frequentemente encontrada em indivíduos alcoolistas (LEMONS, 2003) e se relaciona com a encefalopatia de Wernicke e síndrome de Wernicke-Korsakoff, que são caracterizadas por disfunções motoras e de memória (FERREIRA-VIEIRA, 2009). Os primeiros sintomas são: imprecisão motora, perda de peso, fraqueza, edema e parestesias (MULHOLLAND, 2006).

A partir da década de 70 muitos pesquisadores observaram que a PEM pode ter outras causas, sendo elas: intoxicação por enxofre (GOULD, 1998), intoxicação por sal associada à privação de água (SCARRAT; COLLIN; SPONENBERG, 1985), intoxicação por chumbo (CHRISTIAN, 1971), administração de determinados anti-helmínticos, como levamisole e tiabendazole (LINKLATER; DYSON; MORGAN, 1977), administração de substâncias antagônicas da tiamina, como o amprólio (MORGAN, 1974), ingestão de cadáveres (PURISCO, 1982), ingestão de melado – provavelmente associada à intoxicação por enxofre (MELLA; PEREZ-OLIVA; LOEW, 1976), mudança brusca de pastos ruins para outros de ótima qualidade (MORO; NOGUEIRA; CARVALHO; MARQUES, 1994), ingestão de plantas ricas em tiaminases (ANDERTON et al., 1994) e infecção por herpesvírus bovino tipo V (CARRILLO et al., 1983).

No Brasil, PEM foi descrita em bovinos no Rio Grande do Sul (SANTOS; JARDIM FILHO; GRANDO, 1983), Minas Gerais (MORO; NOGUEIRA; CARVALHO; MARQUES, 1994), Pernambuco (VIEIRA et al., 2007), Mato Grosso do Sul, São Paulo (PURISCO, 1982; NAKAZATO; LEMOS; RIET-CORREA, 2000; GONÇALVES et al., 2001; LEMOS, 2005; SANT'ANA et al., 2009b), Paraíba, Pará (LEMOS, 2007), Mato Grosso e Goiás (LEMOS, 2005; SANT'ANA et al., 2009c). Em ovinos são relatados surtos de PEM nos estados de Pernambuco (NASCIMENTO, 2003; VIEIRA et al., 2007), Paraíba (LIMA et al., 2005) e no Distrito Federal (MOSCARDINI et al., 2003). Surtos da doença em caprinos são descritos na Paraíba (LIMA et al., 2005) e no Rio Grande do Sul (COLODEL et al., 1998).

A doença pode ocorrer na forma de surtos (NAKAZATO; LEMOS; RIET-CORREA, 2000) ou como casos isolados (LEMOS, 2005) e, na maioria das vezes não apresenta sazonalidade (NAKAZATO; LEMOS; RIET-CORREA, 2000). Apesar de que na grande maioria dos casos as causas da PEM não foram confirmadas, em vários focos observados houve resposta positiva ao tratamento de tiamina (LOW et al., 1996; NAKAZATO, 1998). É interessante observar que o uso do termo “polioencefalomalácia” gera confusão, pois é utilizado tanto para designar a doença quanto a lesão. A doença PEM abrange várias causas (intoxicação por sal associado à privação de água, intoxicação por enxofre, envenenamento por chumbo, deficiência de tiamina) onde, a lesão polioencefalomalácia (necrose da substância cinzenta do encéfalo), é característica de todas. Assim, o termo polioencefalomalácia usado para descrever a lesão não se limita apenas ao córtex

cerebral, sendo também utilizado para determinar a ocorrência de necrose em qualquer área do encéfalo onde há substância cinzenta (corpos neuronais) como, por exemplo, córtex cerebral, hipocampo, corpo estriado, globo pálido, cerebelo, núcleos do tronco e núcleos talâmicos.

Os sinais clínicos da PEM em ruminantes caracterizam-se por andar cambaleante e em círculos, incoordenação, decúbito lateral ou esternal, movimentos de pedalagem, atonia ruminal, tremores musculares, bruxismo, taquipneia, cegueira total ou parcial, opistótono, pressão da cabeça contra objetos, nistagmo, estrabismo, afastamento do rebanho, agressividade e excitação (LIMA et al., 2005). O curso clínico da doença varia em torno de 2 a 4 dias (SANT'ANA et al., 2009c), porém são relatados quadros agudos de evolução de 12 horas (SANT'ANA et al., 2009c) ou crônicos de até 25 dias (GONÇALVES et al., 2001; VIEIRA et al., 2007).

Macroscopicamente, o encéfalo está tumefeito por edema com achatamento dos giros cerebrais e herniação da porção caudal do telencéfalo, sob a tenda do cerebelo e do verme do cerebelo pelo forâmen magno. As lesões no córtex variam desde uma pequena alteração na cor (marrom-amarelada) da substância cinzenta afetada durante os estágios iniciais, até necrose caracterizada por amolecimento e alteração acentuada na cor dessa estrutura, com liquefação do tecido afetado, após 8-10 dias (BARROS, 2009). Microscopicamente, o córtex telencefálico apresenta necrose neuronal (neurônios vermelhos) frequentemente com distribuição laminar. Há também graus variáveis de edema perivascular e perineuronal tanto no córtex como na substância branca imediatamente subjacente e hipertrofia do endotélio. Com o tempo (após 8 a 10 dias), há necrose de liquefação do córtex telencefálico afetado que termina com remoção do tecido cortical necrótico por macrófagos espumosos, conhecidos no sistema nervoso como células gitter (BARROS, 2009).

Atualmente, o tratamento básico dos distúrbios relacionados à DT envolve a administração de altas doses da vitamina B1 (ABDOU; HAZELL, 2015; APLEY, 2015). Para humanos, a recomendação terapêutica padrão inclui a administração de tiamina em doses de 50-300 mg/dia (intravenosa, intramuscular ou oral) (KUMAR, 2007, 2010). Em casos de encefalopatia de Wernicke, doses ainda maiores podem ser necessárias e, em casos de beribéri infantil, são recomendados 5-20 mg de tiamina parenteral (KUMAR, 2010). Entretanto, devido às extensas e variadas alterações em vias metabólicas celulares, atualmente têm-se buscado novas estratégias terapêuticas que, juntamente com a terapia padrão com tiamina,

objetivam reduzir o surgimento de danos neurológicos permanentes (ABDOU; HAZELL, 2015). Nesse sentido, têm sido investigados, sob diversos aspectos, o uso de substâncias anti-inflamatórias (flunixinina meglumina, dimetilsulfóxido, dexametasona, nimesulida, minociclina), diuréticos (furosemida, manitol), antioxidantes (Trolox[®], dimetilsulfóxido, minociclina), substâncias que incrementam a captação de glutamato (ceftriaxona, composto NP031112), bloqueadores de receptores glutamatérgicos (flupirtina), terapia com células tronco (precursores neuronais) e uso de nanopartículas (com óxido de cério) (ABDOU; HAZELL, 2015; APLEY, 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A tiamina é um co-fator importante das enzimas piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, a qual está envolvida no metabolismo de carboidratos e da transcetolase, uma enzima importante da via das pentoses (BETTENDORFF; WINS, 2013). A deficiência de tiamina provoca a diminuição no metabolismo oxidativo, o que, eventualmente provoca a morte neuronal, pois, o cérebro depende principalmente deste para a síntese de ATP (VICTOR et al., 1971). Entretanto, o motivo pelo qual algumas regiões do encéfalo são mais sensíveis à deficiência de tiamina, comparadas com outras regiões cerebrais ainda permanece obscuro (HAZELL et al., 2013a). Em humanos a DT causa beribéri, embora existam evidências que fatores genéticos, a falta de vitamina B₁ é sem dúvida o fator principal (SANTOS et al., 2003; MULHOLLAND, 2006).

O estudo das disfunções associadas à deficiência da tiamina tem sido possível através da utilização de modelos experimentais, principalmente roedores. A deficiência da vitamina B₁ pode ser induzida diretamente nestes animais através da administração de uma dieta alimentar deficiente desta vitamina associada ou não (PIRES et al., 2001) à inibidores de enzimas responsáveis pela produção da forma ativa da tiamina (LANGLAIS; SAVAGE, 1995).

2.1 TIAMINA

A história da tiamina remonta ao século passado quando Funk (1911) estudou os efeitos do consumo de arroz polido em pombos e o aparecimento de polineurite, que era curada com a administração de uma substância que estava presente nos grãos de arroz ainda não polidos. Funk (1911) descreveu que a substância tinha a capacidade de curar beribéri nos humanos e polineurite em pombos. Esta substância foi então denominada de fator antineurítico.

A tiamina, ou vitamina B₁, é encontrada principalmente nos cereais e nas carnes, como peixe e porco. A tiamina é uma vitamina do complexo B, este sendo composto também por riboflavina, niacina, piridoxina, nicotinamida, ácido pantotênico, ácido p-aminobenzóico, inositol, biotina e ácido fólico (KUMAR, 2010).

Como nem todos os seres vivos têm a capacidade de sintetizá-la, a alimentação é a única forma de adquiri-la (PEKOVICH et al., 1998). A tiamina é uma

vitamina hidrossolúvel e pode ser encontrada em quatro formas diferentes: livre, monofosfatada (tiamina monofosfato), pirofosfatada (tiamina pirofosfato) e trifosfatada (tiamina trifosfato). A tiamina pirofosfato é a forma mais abundante e fisiologicamente ativa (RINDI, 2000). A tiamina é um composto dicíclico com anéis de tiazole e aminopirimidina, unidos por uma ponte de metileno. Há uma cadeia lateral de álcool no anel de tiazole e, na ativação da tiamina ao seu derivado cofator ativo, esta é esterificada com pirofosfato (BROWN, 2014).

A absorção da tiamina ingerida através da alimentação ocorre principalmente na porção proximal do intestino delgado, mas também pode ocorrer em menor quantidade no estômago e no cólon. A tiamina possui um valor máximo de absorção, ou seja, valores ingeridos acima de 2,5 miligramas por dia não são absorvidos e são eliminados pelo organismo. A forma pela qual a tiamina é absorvida é a não fosforilada, podendo a absorção ser tanto por transportadores com gasto de energia ou por difusão simples. A absorção ainda pode ser inibida por anóxia e baixas temperaturas (RINDI, 2000).

A tiamina possui papel central no metabolismo do tecido nervoso (MULHOLLAND, 2006; BUTTERWORTH, 2009). É cofator para várias enzimas envolvidas principalmente no catabolismo de carboidratos (piruvato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e transcetolase) e de aminoácidos de cadeia ramificada (complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada), que são importantes para a biossíntese de uma série de constituintes celulares, incluindo neurotransmissores (HAAS, 1988), produção de equivalentes redutores utilizados na defesa ao estresse oxidante (VETRENO et al., 2012) e cofator criticamente importante para geração de ATP mitocondrial via ciclo do ácido tricarbóxico (SUZUKI et al., 2017). Além disso, a tiamina é essencial para o bom funcionamento das membranas axoplasmáticas, mitocondriais e sinaptossomais, e atua contra agentes indutores de citotoxicidade e repara membranas localmente (BÂ, 2008). Também intervém na transmissão sináptica e atua na diferenciação celular, na formação de sinapses, no crescimento axonal e na mielinogênese (HAAS, 1988; BÂ, 2005, 2008; KUMAR, 2010).

2.2 DEFICIÊNCIA DE TIAMINA E NEURODEGENERAÇÃO

A DT, tanto em humanos quanto nos animais, acarreta sintomas neurológicos que, em parte, são revertidos pela administração de vitamina B1 (BUTTERWORTH, 1982). Essa deficiência resulta em disfunção das vias enzimáticas celulares relacionadas ao metabolismo energético, que são essenciais para as atividades e funções metabólicas da célula (BUTTERWORTH, 1993; BUTTERWORTH; KRIL; HARPER, 1993; SHEU et al., 1998).

Dada a importância da tiamina no organismo, uma redução na sua concentração tecidual pode interferir em numerosos mecanismos celulares, desencadeando processos neurodegenerativos, resultando em alterações nas funções cerebrais (MARTIN et al., 2003).

A tiamina atua como cofator importante para enzimas relacionadas ao metabolismo intermediário que são: a transcelotase, o complexo da piruvato desidrogenase e a α -cetoglutarato desidrogenase. A falta deste cofator resulta no mal funcionamento destas enzimas, que pode acarretar em alterações significativas do metabolismo energético nos diferentes órgãos. A alteração da produção de energia, a disfunção da produção de neurotransmissores, acidose láctica e espécies reativas de oxigênio (EROs) são apontadas como as principais causas de danos neurológicos que caracterizam a DT (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013).

Diversos possíveis mecanismos têm sido propostos para o desencadeamento da neuropatologia associada à PEM, tais como: alterações no metabolismo de neurotransmissores, como acetilcolina (GIBSON et al., 1984) e ácido gama-aminobutírico (GABA) (HÉROUX; BUTTERWORTH, 1988), alterações na utilização de glicose pelos neurônios (HAKIM; PAPPUS, 1983), estresse oxidativo (LANGLAIS et al., 1997; CALINGASAN; GIBSON, 2000; HAZELL; WANG, 2005), acidose láctica e diminuição do pH encefálico (HAKIM, 1984; NAVARRO et al., 2005), apoptose (MATSUSHIMA; MACMANUS; HAKIM, 1997), alterações no fluxo sanguíneo cerebral (HAKIM, 1986), processos inflamatórios (TODD; BUTTERWORTH, 1999; KE; BOWEN; GIBSON, 2006; VEMUGANTI et al., 2006) e excitotoxicidade (HAZELL; BUTTERWORTH; HAKIM, 1993). Porém, o estresse oxidativo tem sido considerado o mecanismo celular primário no processo (DESJARDINS;

BUTTERWORTH, 2005; HAZELL, 2009; VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013).

Os níveis de tiamina pirofosfato, coenzima necessária para a catálise de sistemas enzimáticos relacionados à utilização de glicose no SNC, são reduzidos pela DT (HÉROUX; BUTTERWORTH, 1995; MANCINELLI et al., 2003). Com a redução desses níveis ocorre a interrupção da formação de enzimas associadas, como a α -cetoglutarato desidrogenase e piruvato desidrogenase (GIBSON et al., 1984; BUTTERWORTH, 1986; SHEU et al., 1998; DESJARDINS; BUTTERWORTH, 2005). A diminuição da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase, que é um importante intermediário no ciclo do ácido tricarbóxico para produção de trifosfato de adenosina (ATP), leva à cessação da oxidação da glicose mitocondrial e morte celular (GIBSON et al., 1984).

O comprometimento da capacidade oxidativa das células, devido à DT, também aumentam a expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), levando à excessiva produção de óxido nítrico (NO) (CALINGASAN; GIBSON, 2000). O NO pode interagir com o radical livre superóxido e resultar na formação de peroxinitrito, que é um potente oxidante associado com toxicidade e dano celular (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009). É importante ressaltar que tanto o NO quanto o peroxinitrito podem inibir a atividade da α -cetoglutarato desidrogenase, que consequentemente pode exacerbar a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo (PARK et al., 1999; HAZELL; BUTTERWORTH, 2009). Portanto, a DT resulta em um ciclo vicioso, onde diminuições da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase catalisam excessiva produção de EROs, que por sua vez inibem a capacidade da α -cetoglutarato desidrogenase em regular o funcionamento do ciclo do ácido tricarbóxico (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

Vários trabalhos apontam que a DT pode causar alterações nos circuitos colinérgicos (ANZALONE et al., 2010), serotoninérgico (NAKAGAWASAI et al., 2007), dopaminérgico e noradrenérgico (MOUSSEAU et al., 1996; NAKAGAWASAI, 2005), glutamatérgico (TODD; BUTTERWORTH, 1998; KAWAKAMI; IKARASHI; KASE, 2010) e GABAérgico (FREITAS-SILVA et al., 2010; FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). Tem sido observado que as EROs podem interferir com a remoção do glutamato da fenda sináptica, através da inibição dos transportadores de alta afinidade (GLAST) (ERIKSON et al., 2007). O aumento dos níveis de glutamato extracelular é

potencialmente excitotóxico para os neurônios (XU; XU; DENG, 2010), o que sugere que as lesões neuronais na DT resultem, em grande parte, da excitotoxicidade (HAZELL et al., 1993; LANGLAIS; ZHANG, 1993; TODD; BUTTERWORTH, 1998). O glutamato é o principal aminoácido envolvido em respostas sinápticas excitatórias no SNC, onde se encontra distribuído de maneira ampla e uniforme (SALINSKA; STAFIEJ, 2003). De acordo com WATKINS e JANE (2006), a participação desse aminoácido em respostas excitatórias envolve sua capacidade de ativar, após sua liberação no espaço extracelular, uma variedade de receptores pós-sinápticos específicos, que em última instância, provocam a abertura de canais permeáveis aos íons cálcio e sódio (MELDRUN, 2000). O glutamato na fenda pode se ligar aos receptores ionotrópicos, acarretando um aumento nos níveis intracelulares de cálcio que pode ser captado pelas mitocôndrias, resultando em mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial e geração de EROs e estresse oxidativo (ROTH, 2009). Adicionalmente, a excitotoxicidade glutamatérgica e o estresse oxidativo também podem ativar várias vias de sinalização intracelular, incluindo as vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (GRANT et al., 2001; ZHANG et al., 2006; ZEPEDA et al., 2008; CHEN et al., 2009; RAMA RAO et al., 2010).

As principais MAPKs são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), c-Jun NH2-terminal cinases (JNK1/2) e as proteínas cinases ativadas por mitógenos de 38 kDa (p38^{MAPK}) (CHANG, L.; KARIN, 2001; THOMAS; HUGANIR, 2004; WAETZIG; HERDEGEN, 2004). A cascata de ERK1/2 é primariamente ativada por fatores de crescimento, regulando expressão gênica, embriogênese, proliferação, sobrevivência e morte celular e neuroplasticidade (CHEN et al., 2001; THOMAS; HUGANIR, 2004; SCHENK et al., 2005). As proteínas cinases JNK e p38^{MAPK}, também conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), são ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, estando frequentemente relacionadas a estresse e morte celular (MIELKE; HERDEGEN, 2000; COWAN; STOREY, 2003). Porém, JNK e p38^{MAPK} também regulam o desenvolvimento do SNC e a neuroplasticidade (WAETZIG; HERDEGEN, 2004).

Dessa forma, através das atividades coordenadas das vias de sinalização intracelular, podem ser regulados processos bioquímicos/funcionais relacionados ao desenvolvimento do SNC, à neuroplasticidade, à sobrevivência e morte celular e processos patológicos como as doenças neurodegenerativas (BRAZIL; YANG;

HEMMINGS, 2004; HADDAD, 2004; THOMAS; HUGANIR, 2004; AOUADI et al., 2006; SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, 2006; WAYMAN et al., 2006; NAGAI et al., 2007; WANG; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 2007).

2.3 VULNERABILIDADE REGIONAL DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E LESÕES CAUSADAS PELA DEFICIÊNCIA DE TIAMINA

Vários trabalhos demonstram que as lesões observadas em roedores DT são semelhantes às encontradas em humanos com a encefalopatia de Wernicke (HAKIM; PAPPUS, 1983). A deficiência ocasiona perdas celulares no hipocampo, cerebelo, amígdala, tálamo e colículo inferior (IRLE; MARKOWITSTSCH, 1983). Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo desencadeamento das lesões cerebrais que ocorrem na DT e a vulnerabilidade seletiva de regiões do cérebro a essas lesões não são bem conhecidos. Porém, estudos relacionam a morte neuronal da DT ao estresse oxidativo gerado por danos mitocondriais (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

A deficiência crônica de tiamina gera reduções nos níveis de enzimas dependentes dessa vitamina no cérebro (BUTTERWORTH, 1986). Durante a DT, ocorre uma cascata de eventos que culminam com diminuição da produção de ATP e piruvato desidrogenase e aumento da produção de lactato, em decorrência da inibição da descarboxilação oxidativa de piruvato e α -cetogluturato. A menos que a tiamina seja rapidamente suplementada, a acidose e morte celular podem ocorrer dentro de vinte e quatro horas (Figura 1) (HAZELL et al., 2013b).

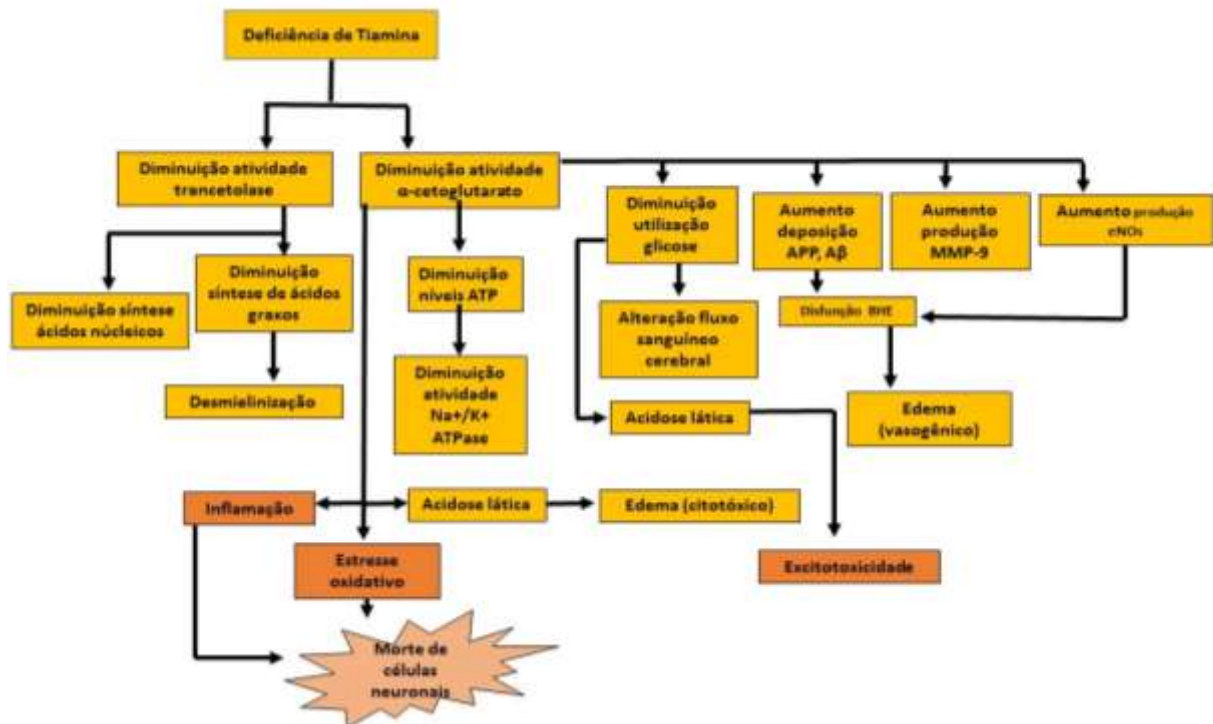


Figura 1. Componentes-chave da cascata de eventos associados à vulnerabilidade focal na deficiência de tiamina (Adaptado de HAZELL et al., 2013).

A excitotoxicidade provocada pelo aumento do glutamato extracelular também pode ter sérias consequências na bainha de mielina dos axônios, causando danos (LI et al., 1999). Este dano da substância branca também é uma característica observada em ambas as situações: DT experimental e encefalopatia de Wernicke (LANGLAIS; ZHANG, 1997). Além disso, sabe-se que a excitotoxicidade contribui para a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) em células endoteliais (GONSETTE, 2008).

Diversos estudos em animais com deficiência experimental de tiamina mostram consistentemente danos precoces às células gliais, em vez dos neurônios (HAZELL, 2009). Esses achados são consistentes com alterações patológicas que podem ser atribuídas à presença de um processo patogênico inflamatório (HAZELL et al., 2013b).

As lesões encontradas no SNC relacionadas à DT são muito amplas e afetam diferentes estruturas do SNC, podendo ser divergentes dependendo da espécie envolvida (VETRENO et al., 2012). Nos ruminantes, as alterações de necropsia variam de acordo com o grau de severidade e duração do quadro clínico. Quando a evolução for rápida, os achados podem estar ausentes (MOTTA et al., 1999;

NAKAZATO et al., 2000; SCHILD et al., 2005) ou, pode ser identificada basicamente pela tumefação do encéfalo, determinada pelo edema. Outro fator que deixa evidente o edema no encéfalo é o deslocamento caudal (herniação) do bulbo e do cerebelo no sentido do forame magno. Em casos mais avançados, pode ser visualizado achatamento das circunvoluções cerebrais, áreas amareladas, amolecidas, gelatinosas e deprimidas, hemorragias meníngeas e subcorticais, ou até mesmo, cavitações preenchidas por líquido amarelo (MORO, L.; NOGUEIRA, R.H.G.; CARVALHO, A.U.; MARQUES, 1994; MAXIE; YOUSSEF, 2007). As áreas mais afetadas nos ruminantes são primariamente limitadas ao córtex cerebral (LIMA et al., 2005; ZACHARY, 2009; CUNHA et al., 2011), localizadas principalmente nos sulcos das circunvoluções (NAKAZATO; LEMOS; RIET-CORREA, 2000). No entanto, diversos relatos demonstram que outras áreas do SNC dos ruminantes também podem ser envolvidas, como o tálamo, colículo rostral (LIMA et al., 2005; ZACHARY, 2009; CUNHA et al., 2011), núcleo caudado, corpo caloso, substância negra, ponte (LOW et al., 1996; LONERAGAN et al., 1998) e bulbo (LONERAGAN et al., 1998; CUNHA et al., 2011). Essas lesões apresentam fluorescência quando visualizadas com auxílio de lâmpada ultravioleta de 365 nm (JACKMAN; EDWIN, 1983). Essa característica ocorre em função da presença de metabólitos lipídicos em macrófagos ou de material semelhante a colágeno de alto peso molecular (MAXIE; YOUSSEF, 2007). Em casos crônicos pode haver estreitamento acentuado e até desaparecimento da substância cinzenta (MCALLISTER et al., 1997).

Nos carnívoros, as regiões mais afetadas são os núcleos do tronco encefálico, especialmente os colículos caudais e o núcleo periventricular, porém o córtex cerebral e o cerebelo também podem ser afetados (ZACHARY, 2009). Em roedores (ratos e camundongos utilizados em modelos experimentais de DT) a patologia mimetiza o distúrbio que acomete o humano. As lesões nestes animais normalmente são encontradas nos núcleos talâmicos, corpos mamilares, cerebelo, tectum, substância cinzenta periaquedutal e córtex frontal e parietal (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013).

Histologicamente, nos casos agudos em ruminantes há necrose laminar e segmentar dos neurônios corticais do telencéfalo, eosinofilia citoplasmática, cromatólise e picnose nuclear (neurônios vermelhos). Os neurônios necróticos não devem ser confundidos com os denominados “neurônios escuros”, os quais são artefatos pós-mortais que são formados comumente por manipulação excessiva do

encéfalo na retirada do crânio (CAMMERMEYER, 1960; JORTNER, 2006). Outra alteração comumente encontrada é o edema e consiste de aumento dos espaços perineuronais e perivasculares e formação de vários vacúolos no neurópilo (espongiose). A progressão dessa lesão pode, em alguns casos, ocasionar a formação de fendas entre as camadas de neurônios corticais ou entre as substâncias cinzenta e branca (BARROS et al., 2006; SANT'ANA et al., 2009b). A espongiose e o aumento dos espaços perineuronais e perivasculares são atribuídos ao edema de astrócitos, de acordo com estudos ultraestruturais (MORGAN, 1974). Outras lesões encontradas no SNC são degeneração de mielina, infiltração de células Gitter, infiltrado inflamatório e hipertrofia e hiperplasia de células endoteliais (CARLTON; MCGAVIN, 1998; LIMA et al., 2005; ZACHARY, 2009; VETRENO et al., 2012).

2.4 SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA

A utilização de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias como o Trolox[®] e o DMSO vem da necessidade de se caracterizar novas substâncias para serem usadas como coadjuvantes na terapia da DT, juntamente com a tiamina visando diminuir os efeitos deletérios neurodegenerativos causados pela DT. Além disso, essas substâncias com efeitos e funções conhecidas servem como ferramenta de estudo para elucidar mecanismos das doenças.

2.4.1 DMSO

O dimetilsulfóxido (DSMO) é uma substância orgânica química de fórmula C_2H_6SO (ROSENBAUM et al., 1965), peso molecular 78 (CARPENTER et al., 1994) e temperatura de congelamento de 18,5 °C (BRAYTON, 1986).

Em 1961, foi relatado pela primeira vez que o DMSO era capaz de proteger células, sistemas celulares e animais contra os efeitos letais e mutagênicos dos raios-x e dos efeitos nocivos do congelamento (ASHWOOD-SMITH, 1967). Uma ampla gama de efeitos farmacológicos exercidos pelo DMSO foi documentada em modelos experimentais de animais (JACOB; HERSCHLER, 1986), como o aumento da permeabilidade aos fármacos e o transporte através da membrana tecidual e aumento da diurese (FORMANEK; SUCKERT, 1966; CHIOU; VESELY, 1995).

O DMSO pode carrear diversas substâncias a ele associadas, transportando-as através das membranas biológicas (BLYTHE et al., 1986; BRAYTON, 1986). Em um estudo realizado para avaliar os efeitos comportamentais com diferentes veículos em roedores constatou-se que o DMSO utilizado como solvente diminuiu significativamente a distância percorrida dos animais (CASTRO et al., 1995).

A partir da década de 1980, a função anti-inflamatória do DMSO, como é conhecida, tem sido considerada muito eficiente (BLYTHE et al., 1986; BRAYTON, 1986). Os mecanismos pelos quais essa substância atua são múltiplos (ALSUP; DEBOWES, 1984), entre os quais são mencionados os antagonismos às substâncias originadas da cascata do ácido araquidônico (STONE, 1993) e ao fator de agregação plaquetária (BRAYTON, 1986). Adicionalmente, foi demonstrada a inibição da infiltração de polimorfonucleares (ALSUP; DEBOWES, 1984) e a remoção de radicais livres produzidos pelos neutrófilos, envolvidos na evolução do distúrbio circulatório que precede a necrose (BLYTHE et al., 1986). Contudo, mesmo com seus vários mecanismos, o DMSO é mais eficaz na inflamação aguda (KEDAR et al., 1983). Estudos posteriores demonstraram a ação antiinflamatória do DMSO via oral sobre o edema induzido experimentalmente na pata de roedores (COLUCCI et al., 2008).

O DMSO também possui ação analgésica, que ocorre indiretamente à sua propriedade anti-inflamatória e diretamente ao bloqueio químico da fibra C em nervos aferentes periféricos (STONE, 1993). Além disso, tem ação central exercida de maneira análoga à da morfina (ROSENBAUM; HERSCHLER; JACOB, 1965) mas, possivelmente, sem o envolvimento de opióides (BRAYTON, 1986).

O mecanismo pelo qual o DMSO reverte alterações neurológicas decorrentes de traumatismos cranianos com desenvolvimento de aumento da pressão intracraniana em pacientes normovolêmicos, sem alterações eletrolíticas, pode ser explicado pela propriedade diurética desse fármaco (BLYTHE et al., 1986). Em pacientes humanos que apresentaram aumento da pressão intracraniana e distúrbio circulatório que levaram à ocorrência de sinais neurológicos, o DMSO administrado por via intravenosa, provocou a estabilização do processo com eficiência superior à observada com o uso de furosemida (BLYTHE et al., 1986) ou do manitol (STONE, 1993).

Outra ação que o DMSO tem demonstrado possuir é a de liberação de histamina, sendo a propriedade vasodilatadora atribuída às ações histaminogênicas (BRAYTON, 1986; STONE, 1993) e anticolinesterásica (BRAYTON, 1986).

Quanto à administração, o DMSO pode ser administrado diretamente no local ou órgão que se pretende tratar (pele, áreas musculoesqueléticas, ouvidos, olhos, em articulações, uretra, bexiga) ou também pode ser administrado por vias sistêmicas como a oral, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa (SMITH; et al., 1967).

Os principais produtos da degradação do DMSO são a dimetilsulfona e o sulfato de metila (HUCKER et al., 1967). A principal via de excreção é a urinária, embora a via respiratória participando com menos de 3% pareça, pelo odor, ser a principal (BRAYTON, 1986). O forte odor, comparado ao de alho, é resultante da eliminação por via respiratória dos produtos de degradação do DMSO, persistindo aproximadamente por 48 horas após a administração do fármaco (ROSENBAUM; et al., 1965).

2.4.2 TROLOX

O Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-ácido carboxílico) é um análogo hidrossolúvel do tocoferol, que foi sintetizado por SCOTT et al. (1974) e indicado como preservante de óleos e gorduras. Esta substância apresenta propriedades antioxidantes e é eficaz tanto em gordura animal quanto vegetal, característica importante já que o tocoferol possui pouca atividade na preservação da peroxidação de óleos vegetais (SCOTT et al., 1974).

De acordo com Barclay et al. (1995), o Trolox[®] tem vantagem sobre os outros antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como a vitamina E. Devido a sua estrutura cromanol, que lhe confere atividade antioxidante, e ao grupo carboxila, que possui efeito hidrossolúvel moderado, o Trolox[®] pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração, tornando-o conveniente para estudos em sistemas biológicos naturais.

Wu et al. (1990) verificaram que o Trolox[®] teve efeito protetor nos miócitos, hepatócitos e eritrócitos contra radicais de oxigênio gerados artificialmente. Nesse estudo, os autores utilizaram hepatócitos humanos como modelo, com o objetivo de

explorar o mecanismo de ação do Trolox[®] na célula e sugeriram que seu comportamento foi consistente com o esperado para um antioxidante, ou seja atuou como removedor de EROs.

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DEFICIÊNCIA DE TIAMINA

Apesar da associação de fatores causais relacionados à PEM, ainda há muita contradição em relação às lesões e mecanismos celulares que ocorrem em diferentes estruturas do SNC. Nesse sentido, alterações cerebrais e comportamentais em decorrência da DT é uma área clinicamente relevante do estudo, com amplas implicações para uma vasta gama de indivíduos afetados (ruminantes, carnívoros e humanos). A necessidade da melhor compreensão da etiopatogenia da PEM tem estimulado no Brasil o estabelecimento de modelos experimentais em ruminantes (DAVID et al., 2007; SANT'ANA et al., 2009a; NOGUEIRA et al., 2010; CUNHA et al., 2011). Entretanto, as tentativas de reprodução experimental da PEM têm apresentado dificuldade, tanto com a utilização de análogos da tiamina quanto na intoxicação por enxofre (DAVID, 2002), uma vez que não são observados sinais clínicos em todos os animais experimentais. Além disso, o uso de animais de grande porte envolve tempos prolongados para a experimentação, maiores aportes financeiros e necessidade de grande espaço físico. Assim, a utilização de animais de laboratório (ratos e camundongos) e modelos de culturas de células minimiza estes fatores e otimiza a busca do conhecimento.

A utilização de modelos experimentais *in vitro* com cultura de células fornece uma abordagem direta sobre a célula alvo envolvida no distúrbio. Os modelos experimentais oferecem a oportunidade para investigação aprofundada para as bases celulares de distúrbios neurológicos que ocorrem nos animais e humanos. Modelos de DT em cultura de células podem proporcionar um interessante panorama para os déficits neuroquímicos associados à deficiência, além de apresentar alta eficiência de indução de alterações (WANG et al., 2000; CHORNY; PARKHOMENKO; CHORNA, 2007; KAWAKAMI; IKARASHI; KASE, 2010).

Entretanto, modelos *in vitro* com cultura de células são complexos de se estabelecer, por serem dispendiosos e exigirem estrutura física específica.

Os modelos experimentais para estudo *in vivo* em animais de laboratório oferecem a oportunidade para investigação aprofundada e experimental para as bases anatômicas, fisiológicas e celulares de distúrbios neurológicos que ocorrem nos animais e humanos. Modelos de DT em roedores podem proporcionar um panorama significativo para os déficits estruturais, neuroquímicos e cognitivos associados à DT, assim como se mostram úteis para uma maior compreensão das funções celulares no cérebro intacto, além de apresentar alta eficiência de indução de lesão no modelo (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). Em particular, estudos em roedores e humanos, por exemplo, tem demonstrado que a DT produz de forma similar morte celular neuronal e/ou neurodegeneração, ativação glial, inflamação e anormalidades no metabolismo oxidativo celular (VETRENO et al., 2012), sugerindo um papel idêntico para a tiamina no SNC de diferentes espécies animais (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). Dessa forma, o uso de roedores de laboratório para o estudo da DT *in vivo*, que ocorre em outras espécies animais, se caracteriza como um modelo experimental eficiente e com grande reprodutibilidade de alterações neurológicas (CALINGASAN et al., 1995; KE et al., 2003; RINDI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007; WANG et al., 2007).

Existem dois modelos experimentais bem determinados para roedores que são utilizados para o estudo da DT (VETRENO et al., 2012; NARDONE et al., 2013). O primeiro método induz a DT através da utilização de dietas livres de vitamina B1, por um período de tempo suficiente para depletar os estoques de tiamina corporal (3-4 semanas). O segundo modelo gera uma DT de forma mais rápida, combinando a alimentação com ração livre de tiamina com a administração (injeções intraperitoneais, i.p.) de piritiamina (inibidor da tiamina pirofosfocinase). Este segundo modelo, denominado DT induzida por piritiamina, induz uma progressão estereotipada dos sinais clínicos neurológicos e comportamentais que foram mapeados para alterações específicas na neuroanatomia e neuroquímica, mimetizando a patologia natural descrita para a DT (ZHANG et al., 1995; HAZELL; BUTTERWORTH, 2009). Além disso, estudos demonstram que as alterações neurológicas comportamentais em fase aguda observadas na DT nos modelos experimentais em roedores, também podem ser revertidas pelo tratamento com altas doses de tiamina (ZHANG et al., 1995). Portanto, a força desses modelos de

roedores vem da capacidade de manipular o período e a duração da deficiência, o momento e a natureza de intervenções terapêuticas, e o período em que os parâmetros anatômicos e/ou fisiológicos são avaliados (VETRENO et al., 2012). Adicionalmente, existem também estudos que utilizam outros análogos químicos da tiamina em roedores, como o amprólio (GREENWOOD; PRATT, 1985; RINDI et al., 2003). Entretanto, estes estudos abordam aspectos farmacológicos da substância, e seus mecanismos e efeitos não têm sido ainda bem caracterizados. Mas estudos sugerem que a ação *in vivo* do amprólio na indução de DT possa ser melhor que o clássico modelo com piritiamina (BUNIK; TYLICKI; LUKASHEV, 2013). Recentemente, um estudo de indução de DT com amprólio administrado via oral em camundongos, demonstrou o desenvolvimento de distúrbios psicomotores nos animais (PEREIRA et al., 2017).

Apesar do estabelecimento de modelos experimentais em laboratório com roedores, e da descrição das disfunções neurológicas e danos cerebrais que resultam da DT, os mecanismos precisos que conduzem às lesões características desse distúrbio permanecem obscuros. Ao longo de muitos anos, têm sido propostos vários processos que podem levar à morte celular neuronal focal nesta desordem neurológica. Mas, apesar dos esforços concentrados para relacionar esses processos a uma sequência clara de acontecimentos que culminam no desenvolvimento da neuropatologia, poucos resultados foram obtidos e atualmente muito pouco ainda se conhece sobre os mecanismos celulares envolvidos nos processos neurodegenerativos da PEM. Embora a fase aguda da PEM seja considerada facilmente tratável pela administração de tiamina, uma neuropatologia crônica e não responsiva a tratamento pode se desenvolver após repetidos ataques de deficiência subclínica (HARPER, 1983), sugerindo que a intervenção apropriada durante estes episódios tem o potencial para atrasar ou prevenir o desenvolvimento de grandes lesões no SNC. Essa intervenção, no entanto, só é possível e com probabilidade de sucesso, se a fisiopatologia subjacente a esta condição for bem compreendida, algo que continua seriamente carente no momento (HAZELL, 2009).

Assim, devido ao fato das lesões na DT serem controversas e do desconhecimento dos mecanismos precisos de morte celular envolvidos no processo, que não permitem uma abordagem terapêutica mais eficiente, e da necessidade de aumentar a produtividade da bovinocultura no país, que tem exigido a utilização de novas estratégias nutricionais como a utilização de dietas ricas em

energia e pobre em fibra associada ao uso de subprodutos da agroindústria, criam-se condições de risco para a ocorrência da PEM, seja pela maior exposição ao enxofre ou, principalmente, por distúrbios digestivos com conseqüente destruição da tiamina ruminal. Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de pesquisas com o uso de modelos experimentais viáveis que permitam melhor compreensão da patogenia da PEM.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é determinar diferentes parâmetros morfológicos, moleculares, comportamentais e metabólicos em camundongos experimentalmente submetidos à DT em um modelo *in vivo* inédito, com intuito de avaliar a ocorrência de alterações celulares e o delineamento de estratégias neuroprotetoras eficientes, a fim de determinar protocolos terapêuticos futuros.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer um protocolo experimental *in vivo* com o antagonista da tiamina, amprólio, para indução de DT em camundongos;
- b) Avaliar o perfil metabólico sistêmico dos animais submetidos ao modelo experimental de DT com amprólio, através da avaliação do consumo de ração, ganho de peso corporal, avaliação macroscópica e histopatológica das vísceras;
- c) Caracterizar as alterações comportamentais motoras e cognitivas nos camundongos submetidos à DT induzida por amprólio;
- d) Identificar e quantificar, dentro do modelo *in vivo* de DT com amprólio, as áreas encefálicas afetadas através do método de viabilidade celular da redução do TTC (cloreto de 2,3,5-trifenitetrazólio), utilizando fatias encefálicas dos camundongos tratados;
- e) Caracterizar a possível ação neuroprotetora do agente antioxidante Trolox® e do anti-inflamatório DMSO, no modelo *in vivo* de DT.

4 MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

No modelo experimental *in vivo* para o estudo da DT sobre o SNC, foram utilizados camundongos Swiss machos com idade pós-natal de 50 dias. Os animais foram produzidos em biotério próprio (Laboratório de Patologia Experimental, UFT) e mantidos, manipulados e eutanasiados de acordo com o código de ética de utilização de animais em pesquisa, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFT (CEUA-UFT, processo nº 23101.000284/2014-13).

4.2 TRATAMENTOS *IN VIVO* - MODELO DE DEFICIÊNCIA DE TIAMINA

Foi utilizado um modelo de deficiência dietética de tiamina em conjunto com injeções de amprólio, antagonista da tiamina. Camundongos foram separados em doze grupos e submetidos a diferentes tratamentos (Quadro 1), durante 15 (seis grupos de tratamento) ou 20 dias (seis grupos de tratamento). Dentre os grupos, seis eram grupos controle, que receberam solução salina (NaCl 0,9%) ou substâncias neuroprotetoras (Trolox[®] e dimetilsulfóxido) e seis eram grupos deficientes, que receberam amprólio seguido ou não de substâncias neuroprotetoras.

Quadro 1. Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos do modelo de deficiência de tiamina com amprólio, realizados durante 15 ou 20 dias.

GRUPO EXPERIMENTAL	TRATAMENTO
Grupo 1 – Controle (Cont)	Sol. salina
Grupo 2 – Deficiente (Amp)	Amprólio
Grupo 3 – Deficiente com Trolox (Apm+Tr)	Amprólio, associado ao Trolox [®]
Grupo 4 – Deficiente com DMSO (Amp+Dmso)	Amprólio, associado ao dimetilsulfóxido
Grupo 5 – Controle Trolox [®] (Tr)	Trolox [®]
Grupo 6 – Controle DMSO (Dmso)	Dimetilsulfóxido

Os grupos 1, 5 e 6 receberam ao longo de todo o tratamento ração padrão AIN-93M (PRAG Soluções Biociências, SP, Brasil), segundo o *American Institute of Nutrition* (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os grupos 2, 3 e 4 receberam ração deficiente em tiamina AIN-93DT (PRAG Soluções Biociências, SP, Brasil) durante os períodos de tratamento. Os constituintes da dieta DT eram idênticos aos da dieta padrão, exceto a falta da vitamina.

Os grupos receberam água e ração *ad libitum* e, diariamente, injeções intraperitoneais (i.p.) de solução salina (controles; Grupo 1), amprólio (deficientes, 80 mg/kg; Grupos 2, 3 e 4; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e/ou os neuroprotetores Trolox[®] (1 mg/kg; Grupos 3 e 5; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) ou DMSO (1 ml/kg em solução 10% em salina; Grupos 4 e 6). Os volumes injetados foram ajustados para 0,1 ml/10 g de peso corporal (CALINGASAN et al., 1996; CORDOVA et al., 2012).

Os doze grupos foram submetidos a tratamentos com duração de 15 (seis grupos de tratamento) ou 20 dias (seis grupos de tratamento) e, durante sua execução, foram controlados diariamente o ganho de peso e o consumo de ração (Figura 2).

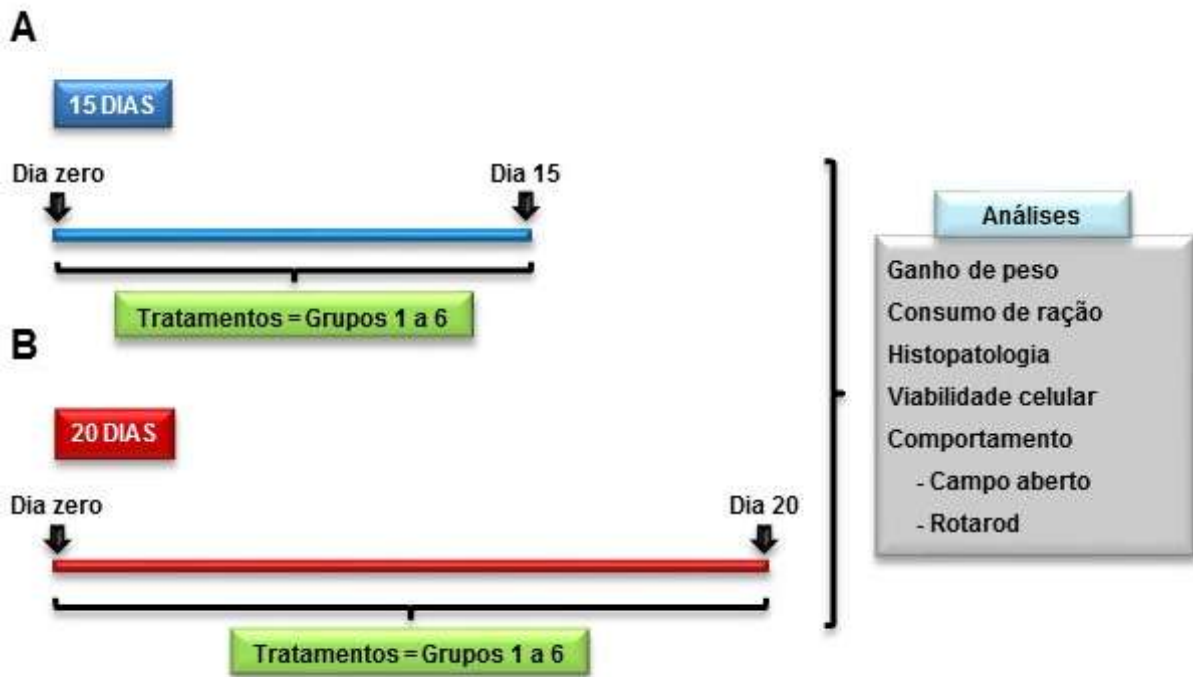


Figura 2. Delineamento experimental do modelo *in vivo* de deficiência de tiamina com amprólio com tempos de duração de 15 (**A**) ou 20 dias (**B**). Após os diferentes tratamentos (grupos 1 a 6) durante 15 ou 20 dias, foram realizadas as avaliações histopatológicas, de viabilidade celular e

comportamentais. Os ganhos de peso corporal e consumos de ração dos animais foram verificados diariamente, ao longo dos períodos de tratamento.

4.3 COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Realizado os tratamentos, fragmentos de fígado, rim, pulmão e coração e dos encéfalos dos camundongos foram coletados para avaliação histopatológica. As amostras foram obtidas durante exame pós-mortal dos animais e acondicionadas em frascos contendo formol tamponado a 10%. Após uma semana de fixação, as amostras foram encaminhadas para processamento histológico. Os tecidos foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol e embebidos em parafina, seguindo-se microtomia (espessura de 5 μm) e coloração por hematoxilina e eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada através de microscópio óptico trinocular Biotika B20T, acoplado a uma câmera digital ISH500 CMOS-5.0 colorida (Tucsen Photonics, Fujian, China). As imagens foram projetadas em monitor e capturadas pelo software ISCapture[®] v.3.6.7. (Tucsen Photonics, Fujian, China) em objetiva de 40x. As lesões encontradas foram graduadas em padrão de ausente (–) a acentuada (+++++) (n = 5).

4.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Foi utilizado o método colorimétrico de redução do TTC para o estudo da viabilidade e morte celular. Este método tem por objetivo determinar uma possível interferência da DT na viabilidade focando a mitocôndria. O TTC (um sal de tetrazólio) é reduzido a um pigmento insolúvel (formazan vermelho) por desidrogenases mitocondriais e assim, a quantidade de pigmento formado é diretamente proporcional à atividade metabólica celular (SHELLINE; WEI, 2006). As fatias foram preparadas conforme descrito por Cordova et al. (2004). Brevemente, os encéfalos dos camundongos tratados foram retirados a 4 °C e fatiados na espessura de 500 μm , utilizando-se matriz de corte para encéfalos de camundongos. Posteriormente, as fatias obtidas do encéfalo foram pré-incubadas em tampão HEPES-salina (124 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO₄, 25 mM de HEPES, 12 mM de glicose e 1 mM de CaCl₂, pH 7.4) em temperatura ambiente por

30 min e em seguida, incubadas no mesmo tampão por 30 min com TTC 1% a 37 °C (GAO, 2008). Após a incubação, o tampão foi removido e as fatias lavadas com solução salina (NaCl 0,9%) e em seguida fixadas em solução de paraformaldeído a 4%. As fatias foram escaneadas e a viabilidade celular foi determinada pela mensuração da densidade óptica (D.O) do cromógeno produzido nas estruturas de interesse – córtex cerebral, corpo estriado, tálamo e hipocampo – através do programa Image J (National Institute of Health, MD, EUA) (Figura 3). Os dados são expressos em porcentagens em relação ao controle (considerado 100%) e os valores são expressos como média \pm E.P.M (n = 5).

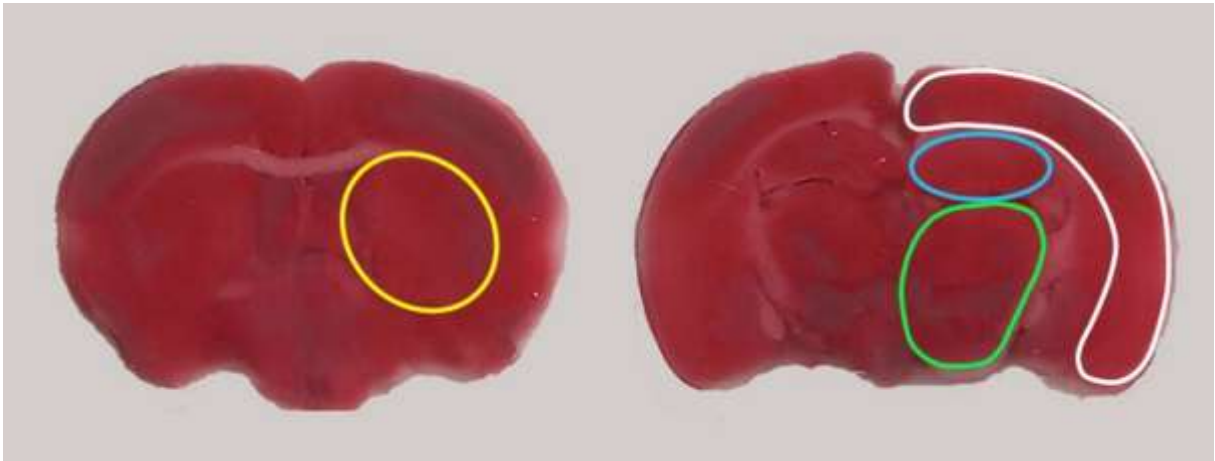


Figura 3. Avaliação da viabilidade celular em fatias encefálicas de camundongos deficientes em tiamina com amprólio através do método colorimétrico de redução do TTC. As áreas encefálicas de interesse foram delimitadas e avaliadas pela D.O. do cromógeno vermelho produzido. Foram analisados o corpo estriado (linha amarela), tálamo (linha verde), hipocampo (linha azul) e córtex cerebral (linha branca).

4.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Para os testes de comportamento os animais foram testados em campo aberto e no rotarod, para avaliar os efeitos dos tratamentos de DT e/ou substâncias neuroprotetoras (Trolox[®] e DMSO) nos comportamentos motor e cognitivo dos animais. O teste de rotarod em associação com o campo aberto representa a principal abordagem na caracterização fenotípica motora em modelos animais (BROOKS; DUNNETT, 2009). O campo aberto foi desenvolvido para o estudo comportamental de ratos e consiste em expor o animal a um novo ambiente, observando parâmetros como os movimentos locomotores, que são os

deslocamentos entre um ponto a outro da arena, os movimentos de exploração (ou não locomotores) que são aqueles que o animal pode realizar sem a necessidade de deslocamento, como por exemplo atividade de levantamento e autolimpeza. Em experimentos com roedores, estes comportamentos são essenciais para avaliar efeitos psicoestimulantes, ansiedade e depressão (PRUT; BELZUNG, 2003). Os animais foram habituados à sala de ensaio durante 1 h antes de iniciar os testes, que foram realizados durante a fase clara do ciclo circadiano (10h00-17h00).

Os testes de campo aberto foram realizados em arena circular de 300 mm de diâmetro, com base acrílica branca dividida em 12 quadrantes e parede cilíndrica de acrílico transparente (Bonther, SP, Brasil). Os testes tiveram duração de 10 min e foram avaliados os seguintes parâmetros: distância percorrida (número de quadrantes ultrapassados com os quatro membros), número de bolos fecais, número de levantamentos (*rearing*; levantamentos completos dos dois membros anteriores) e número de movimentos de limpeza (*grooming*) (AGUIAR et al., 2009; CORDOVA et al., 2012). Os ensaios de campo aberto foram realizados em duas etapas. A primeira etapa (dia zero) foi realizada no primeiro dia de tratamento dos animais e, a segunda (dia 15 ou 20), realizada 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados obtidos são expressos em porcentagem das aferições dos dias 15 ou 20 em relação ao dia zero (100%) \pm E.P.M (n = 12).

O teste do rotarod, que teve por objetivo avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a coordenação motora dos animais, consistiu em duas etapas: condicionamento (treino) e teste (JIANG et al., 2004; CORDOVA et al., 2012). Primeiramente, os animais foram condicionados no cilindro estacionário durante 30 s, seguido por um período de 90 s no cilindro com rotação fixa em 5 RPM. Os animais que falharam nesta primeira etapa, foram submetidos à no máximo duas sessões adicionais de condicionamento. A falha na terceira sessão foi critério de exclusão para as sessões de teste. Trinta minutos após a última sessão de condicionamento, os animais foram testados no rotarod e o tempo de latência para queda foi gravado para determinar o grau de coordenação motora. O teste consistiu de duas sessões diárias do rotarod com duração máxima de 5 min, intervalos de 30 minutos entre as duas sessões, iniciando à velocidade de 5 RPM e com aumento de 0,1 RPM/s. Os resultados obtidos são expressos em segundos \pm E.P.M (n = 4).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média \pm E.P.M. e a significância estatística foi determinada pela análise de variância, seguida do teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado (CORDOVA et al., 2012). Os resultados são considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 GANHO DE PESO

Os animais que receberam a dieta deficiente em tiamina em associação com a administração do antagonista amprólio (grupo Amp), apresentaram significativa redução no ganho de peso corporal comparados ao controle (Tabela 1), após 15 dias de tratamento ($p = 0,001$). Ambas as substâncias protetoras, Trolox[®] e DMSO, não impediram a redução do ganho peso nesses animais (Amp+Tr; $p = 0,845$; Amp+DmsO, $p = 0,184$; comparados ao grupo Amp).

Nos animais tratados por 20 dias (Tabela 1), os animais do grupo Amp também apresentaram significativa redução no ganho de peso corporal comparados ao controle ($p = 0,001$). Do mesmo modo, o antioxidante Trolox[®] (Amp+Tr; $p = 0,912$, comparado ao grupo Amp) não impediu a diminuição no ganho de peso. De forma interessante, os animais do grupo Amp+DmsO apresentaram queda acentuada do ganho de peso ao longo do tratamento ($p = 0,00005$, em relação ao grupo Cont; $p = 0,038$, em relação ao grupo Amp). Porém, Trolox[®] e DMSO *per se* não influenciaram no ganho de peso tanto em 15 (Tr, $p = 0,636$; DmsO, $p = 0,731$; comparados ao controle) quanto em 20 dias de tratamento (Tr, $p = 0,746$; DmsO, $p = 0,512$; comparados ao controle).

Tabela 1. Ganho de peso corporal dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com amprólio.

	Tratamento de 15 dias			Tratamento de 20 dias		
	Peso (g) Dia zero	Peso (g) Dia 15	Ganho de peso (g)	Peso (g) Dia zero	Peso (g) Dia 20	Ganho de peso (g)
Cont	37,72 ± 1,29	42,29 ± 1,50	4,58 ± 0,55	39,96 ± 0,99	45,17 ± 1,30	5,21 ± 0,49
Amp	39,25 ± 0,80	39,83 ± 0,78	0,58 ± 0,65 *	41,08 ± 0,90	41,02 ± 1,10	-0,06 ± 1,03 *
Amp+Tr	40,66 ± 0,88	41,02 ± 1,26	0,36 ± 0,62 *	39,49 ± 1,41	39,59 ± 1,77	0,11 ± 1,10 *
Amp+DmsO	40,53 ± 1,06	42,63 ± 1,27	2,10 ± 0,82 *	39,51 ± 1,88	36,25 ± 1,91	-3,26 ± 1,51 *
Tr	38,39 ± 1,27	42,43 ± 1,63	4,04 ± 0,67	40,78 ± 0,70	46,49 ± 0,98	5,71 ± 0,58
DmsO	41,83 ± 1,09	46,80 ± 1,18	4,97 ± 0,64	39,14 ± 1,55	45,43 ± 1,35	6,29 ± 1,48

* $p \leq 0,05$ em relação ao controle.

5.2 CONSUMO DE RAÇÃO

Durante os períodos de tratamento, os animais deficientes (grupo Amp) apresentaram redução no consumo de ração em relação aos controles (Tabela 2), tanto em 15 dias ($p = 0,019$), quanto em 20 dias ($p = 0,004$). O Trolox[®] (grupo Amp+Tr) não interferiu na redução do consumo de ração nos animais tratados por 15 e 20 dias, em comparação do grupo Amp (15 dias, $p = 0,770$; 20 dias, $p = 0,382$). O DMSO (Amp+DmsO) não impediu a queda do consumo de ração nos animais tratados por 20 dias ($p = 0,525$, comparado ao grupo Amp). Entretanto, no grupo Amp+DmsO tratado por 15 dias houve uma inibição parcial da queda de consumo de ração ($p = 0,118$, comparado ao grupo Cont; $p = 0,359$, comparado ao grupo Amp).

O Trolox[®] não interferiu no consumo de ração dos animais, em ambos os períodos de tratamento, comparados aos controles (15 dias, $p = 0,901$; 20 dias, $p = 0,996$). Da mesma forma, o DMSO (grupo DmsO) administrado por 20 dias, não alterou o consumo de ração dos animais ($p = 0,665$, em relação ao controle). Porém, em 15 dias de tratamento, o DMSO *per se* (grupo DmsO) aumentou a ingestão de ração pelos animais ($p = 0,035$, comparado ao controle).

Tabela 2. Consumo de ração dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com amprólio.

	Tratamento de 15 dias			Tratamento de 20 dias		
	Consumo (g) Dia zero	Consumo (g) Dia 15	Varição (g)	Consumo (g) Dia zero	Consumo (g) Dia 20	Varição (g)
Cont	5,61 ± 0,32	4,52 ± 0,25	-1,09 ± 0,39	5,19 ± 0,30	4,02 ± 0,20	-1,17 ± 0,28
Amp	5,52 ± 0,37	2,78 ± 0,22	-2,74 ± 0,35 *	5,77 ± 0,27	2,83 ± 0,28	-2,95 ± 0,41 *
Amp+Tr	5,46 ± 0,38	2,90 ± 0,27	-2,56 ± 0,38 *	5,19 ± 0,30	2,74 ± 0,27	-2,46 ± 0,28 *
Amp+DmsO	5,27 ± 0,34	3,14 ± 0,48	-2,13 ± 0,32	5,13 ± 0,41	1,83 ± 0,16	-3,30 ± 0,29 *
Tr	5,56 ± 0,27	4,40 ± 0,18	-1,16 ± 0,40	5,69 ± 0,42	4,52 ± 0,09	-1,17 ± 0,48
DmsO	4,85 ± 0,27	5,11 ± 0,17	0,26 ± 0,41 *	5,43 ± 0,36	4,50 ± 0,07	-0,93 ± 0,29

* $p \leq 0,05$ em relação ao controle.

5.3 VIABILIDADE CELULAR

Foi avaliada a viabilidade celular no SNC dos camundongos expostos ao modelo experimental de DT baseado em dieta com ausência da vitamina associado

a injeções diárias de amprólio, antagonista de tiamina. O teste de viabilidade celular baseia-se na mensuração de cromógeno produzido por desidrogenases mitocondriais, a partir da redução do TTC (SHELLINE; WEI, 2006; GAO et al., 2008). O resultado baseia-se na relação direta entre atividade mitocondrial (viabilidade da célula) e a quantidade de pigmento gerado. Nesse sentido, não foram observadas alterações na viabilidade celular no SNC dos camundongos DT (grupo Amp) tratados por 15 dias, em comparação ao grupo controle, em nenhuma das estruturas nervosas avaliadas: córtex cerebral ($p = 0,128$), hipocampo ($p = 0,654$), corpo estriado ($p = 0,413$) e tálamo ($p = 0,744$) (Figura 4A).

Nos animais do grupo Amp tratados por um período mais longo, de 20 dias (Figura 4B), foi observada queda de viabilidade celular de 9,99% no córtex cerebral ($p = 0,00007$, comparado ao controle). O Trolox[®] (grupo Amp+Tr) protegeu parcialmente a queda da viabilidade celular do córtex cerebral, com diminuição de viabilidade de 5,51% em relação ao controle ($p = 0,007$, em relação ao grupo Cont; $p = 0,021$ em relação ao grupo Amp). Por outro lado, o DMSO (grupo Amp+Dms) bloqueou de modo significativo a queda da viabilidade celular nessa estrutura, em relação ao grupo Amp ($p = 0,001$), com redução de viabilidade de 3,36% em relação ao controle ($p = 0,076$). Além disso, nos animais tratados por 20 dias, também não foram observadas alterações na viabilidade celular do hipocampo ($p = 0,475$), corpo estriado ($p = 0,934$) e tálamo ($p = 0,411$).

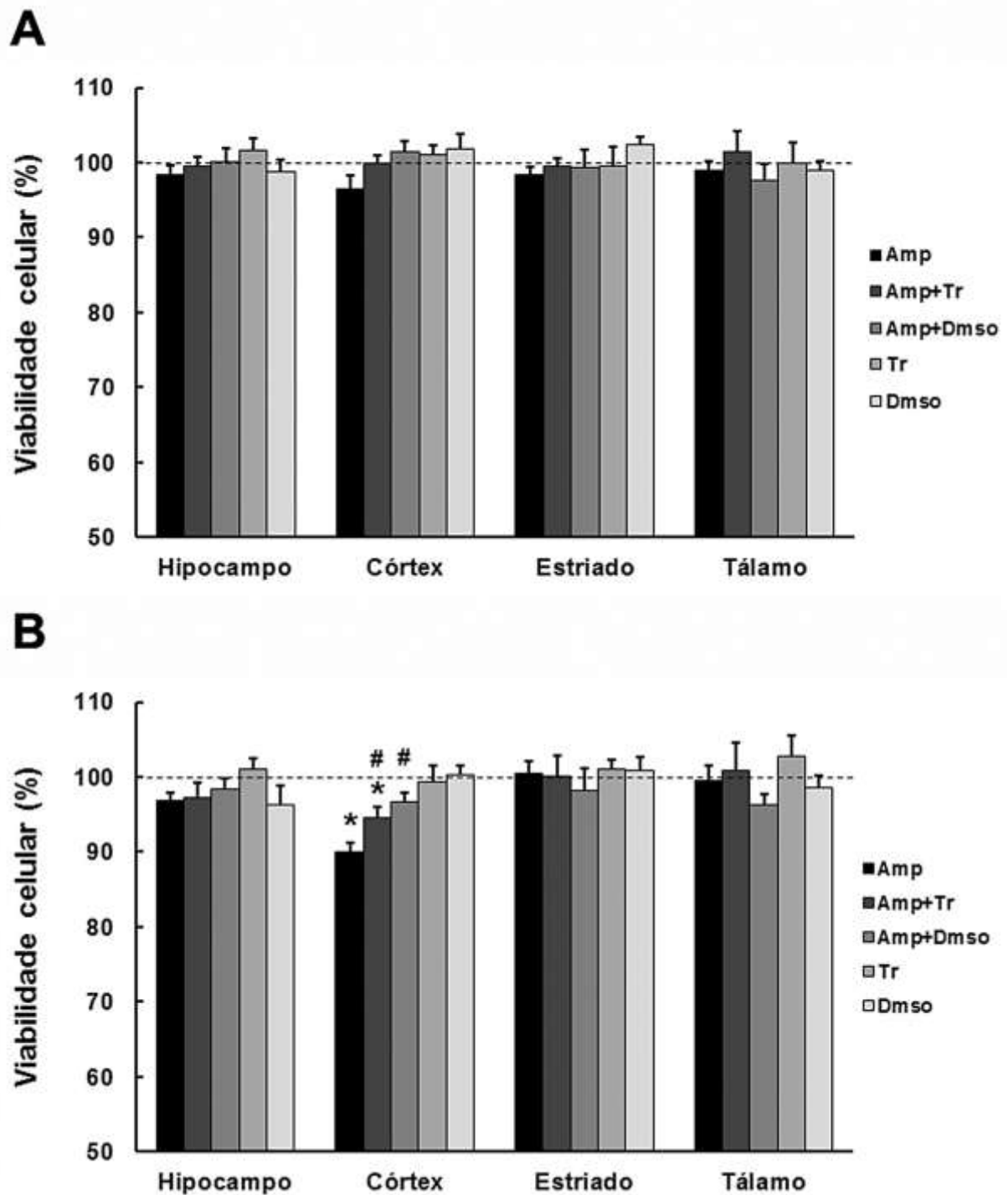


Figura 4. Viabilidade celular no encéfalo de camundongos deficientes em tiamina com amprólio. Os painéis mostram a viabilidade celular das diferentes regiões encefálicas de camundongos tratados por 15 (A) ou 20 dias (B) com ração AIN-93M e salina (controle; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox® (Amp+Tr), ração AIN-93DT e amprólio com DMSO (Amp+DmsO), ração AIN-93M e Trolox® (Tr) e ração AIN-93M e DMSO (DmsO). As fatias foram incubadas com TTC por 30 min, escaneadas e as densidades ópticas (D.O.) das regiões encefálicas foram mensuradas por programa específico. Resultados representam a média \pm E.P.M das porcentagens das D.O. em relação ao controle (considerado 100%), derivados de 5 experimentos independentes. Resultados analisados por ANOVA seguido do teste de Duncan. * $p \leq 0,05$ comparado ao controle; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Amp.

5.4 HISTOPATOLOGIA

Apesar da queda da viabilidade celular observada no córtex cerebral dos camundongos expostos ao modelo de DT com amprólio (Figura 4), não foram observadas alterações histológicas tanto em 15 (Figura 5), quanto em 20 dias de tratamento (Figura 6), nas diferentes regiões encefálicas dos camundongos.

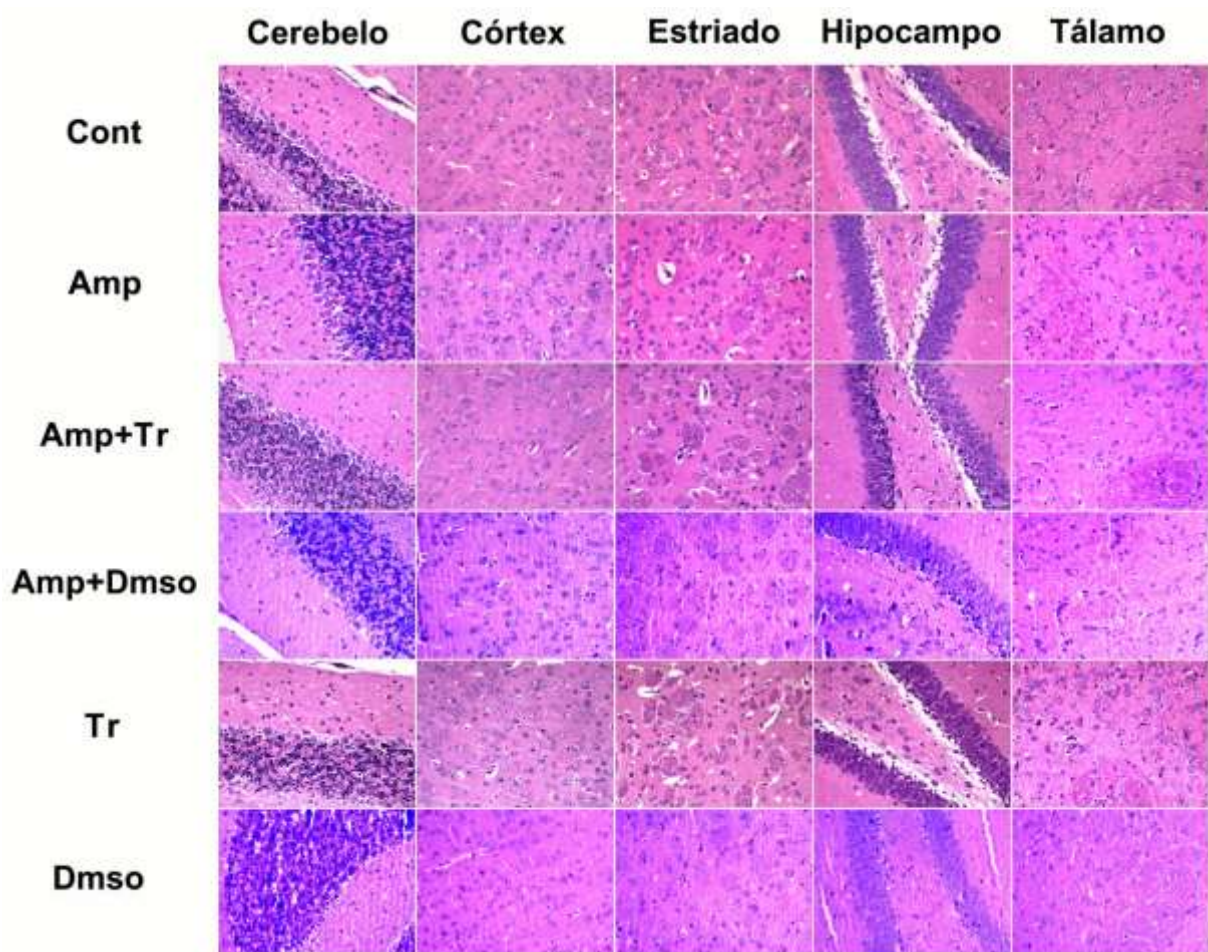


Figura 5. Histopatologia do encéfalo de camundongos deficientes em tiamina com amprólio tratados por 15 dias. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas de cerebelo, córtex cerebral parietal, estriado, hipocampo e tálamo de camundongos tratados por 15 dias com ração AIN-93M e salina (controle; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox[®] (Amp+Tr), ração AIN-93DT e amprólio com DMSO (Amp+Dmso), ração AIN-93M e Trolox[®] (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dmso). HE, 40x.

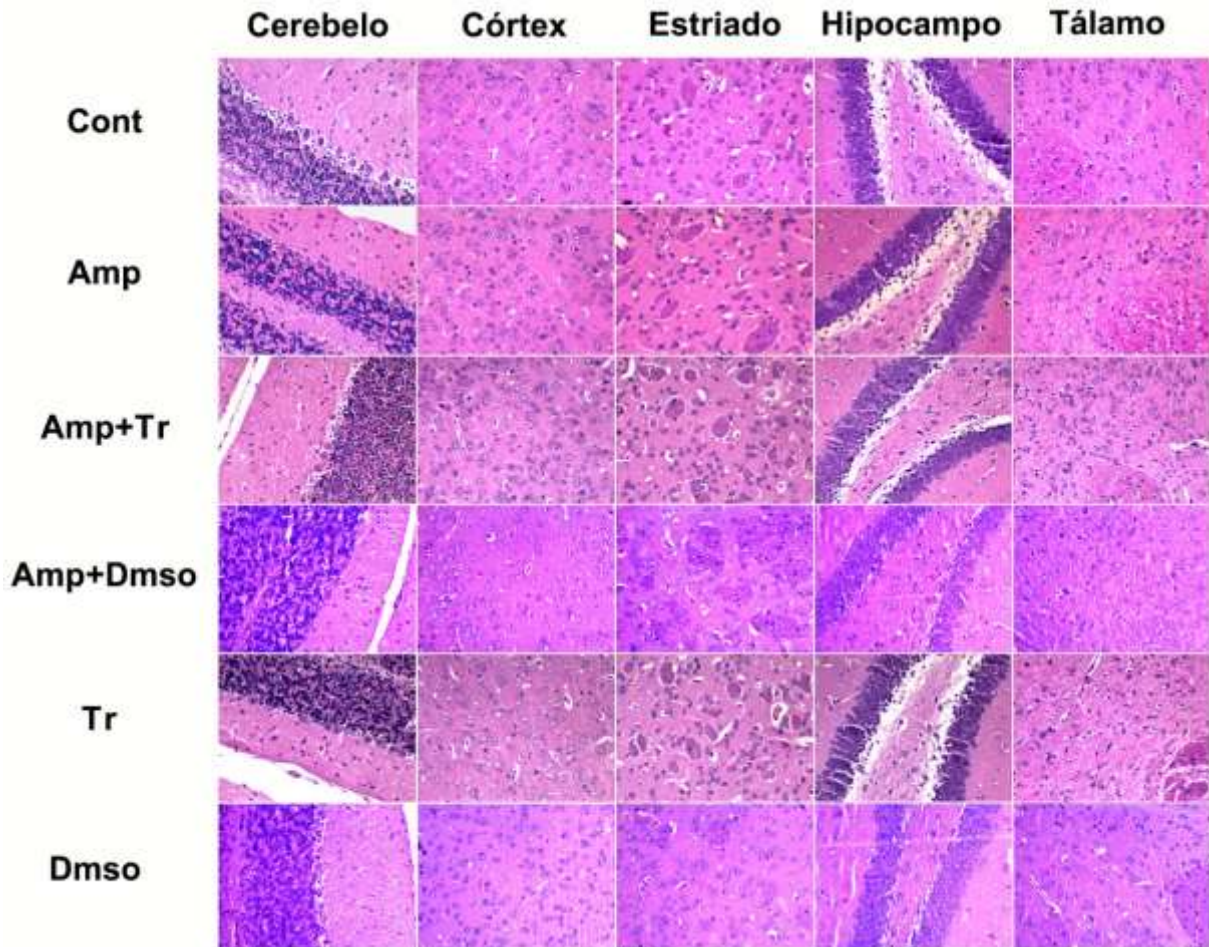


Figura 6. Histopatologia do encéfalo de camundongos deficientes em tiamina com amprólio tratados por 20 dias. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas de cerebelo, córtex cerebral parietal, estriado, hipocampo e tálamo de camundongos tratados por 20 dias com ração AIN-93M e salina (controle; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox[®] (Amp+Tr), ração AIN-93DT e amprólio com DMSO (Amp+Dmsso), ração AIN-93M e Trolox[®] (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dmsso). HE, 40x.

À histopatologia os animais do grupo Amp desenvolveram esteatose hepática macrovacuolar, com distribuição multifocal centrolobular nos camundongos tratados por 15 dias (Figura 7) e difusa quando tratados por 20 dias (Figura 8). Diferentemente, os animais do grupo Amp+Tr apresentaram redução acentuada do quadro, manifestando esteatose discreta em alguns hepatócitos esparsos nos animais tratados por 15 dias e esteatose microvacuolar difusa em 20 dias. Nos camundongos do grupo Amp+Dmsso foi observada uma diminuição considerável da esteatose tanto em 15 quanto em 20 dias. Entretanto, DMSO *per se* ocasionou discreta esteatose nos animais, tanto em 15 quanto em 20 dias. Além disso, o Trolox[®] (grupo Tr) também produziu esteatose, porém de forma microvacuolar difusa

nos animais tratados por 20 dias, mas reduziu a lesão quando comparado ao grupo Amp (Tabela 3).

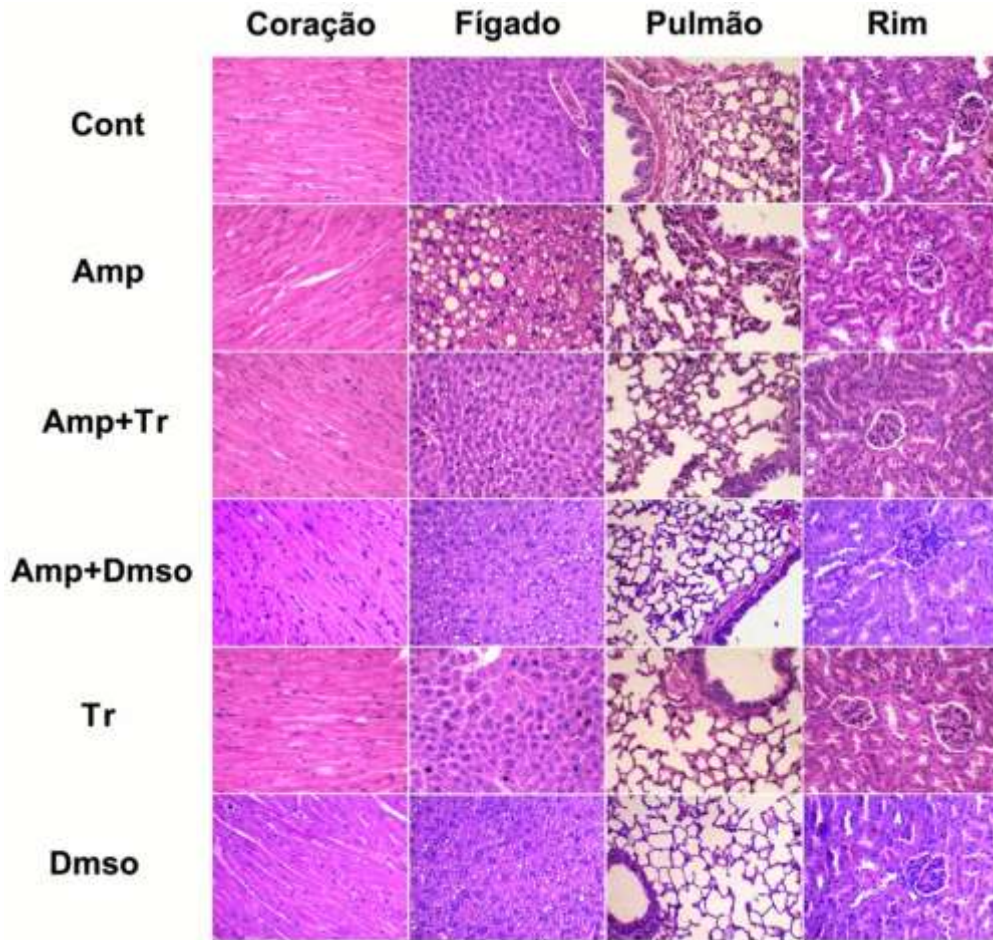


Figura 7. Histopatologia de órgãos de camundongos deficientes em tiamina com amprólio tratados por 15 dias. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas do coração, fígado, pulmão e rim de camundongos tratados por 15 dias com ração AIN-93M e salina (controle; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox[®] (Amp+Tr), ração AIN-93DT e amprólio com DMSO (Amp+DmsO), ração AIN-93M e Trolox[®] (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (DmsO). HE, 40x.

Os animais dos grupos Amp e Amp+Tr 20 dias, desenvolveram moderada proteinúria (Figura 8), determinada pelo encontro de material proteináceo eosinofílico nos lúmens tubulares renais, sugerindo que um tratamento por um período mais longo com amprólio poderia iniciar lesão renal glomerular. Nos demais órgãos (coração e pulmão) não foram observadas alterações em ambos os tempos de tratamento (Tabela 3).

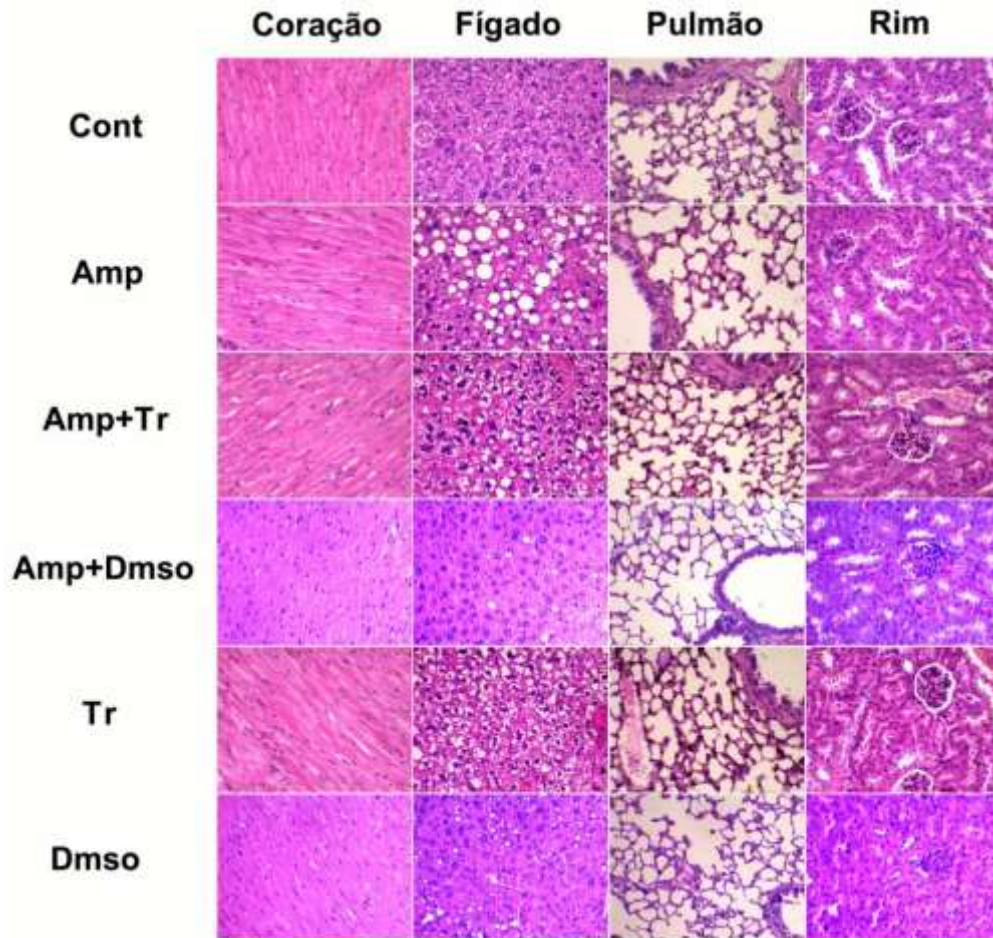


Figura 8. Histopatologia de órgãos de camundongos deficientes em tiamina com amprólio tratados por 20 dias. O painel mostra imagens representativas de secções histológicas do coração, fígado, pulmão e rim de camundongos tratados por 20 dias com ração AIN-93M e salina (controle; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox[®] (Amp+Tr), ração AIN-93DT e amprólio com DMSO (Amp+Dmsso), ração AIN-93M e Trolox[®] (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dmsso). HE, 40x.

Tabela 3. Quantificação do grau de lesões histopatológicas, observadas no fígado (esteatose), rim (proteinúria), pulmão, e coração dos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com amprólio.

	Tratamento de 15 dias				Tratamento de 20 dias			
	Fígado	Rim	Pulmão	Coração	Fígado	Rim	Pulmão	Coração
Cont	-	-	-	-	-	-	-	-
Amp	++++	-	-	-	+++++	+++	-	-
Amp+Tr	+	-	-	-	++++	+++	-	-
Amp+Dmsso	+	-	-	-	+	-	-	-
Tr	-	-	-	-	++++	-	-	-
Dmsso	+	-	-	-	+	-	-	-

– = ausente; + = leve; ++ = leve a moderada; +++ = moderada; ++++ = moderada a acentuada; +++++ = acentuada.

5.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Na avaliação de campo aberto, os camundongos DT (grupo Amp) tratados por 15 dias apresentaram uma redução de 36,94% na distância percorrida quando comparados aos controles ($p = 0,009$) e redução de 31,86% nas atividades de levantamento ($p = 0,016$; Figura 9A). Porém, os animais DT que foram tratados com Trolox[®] (grupo Ampr+Tr) apresentaram valores desses parâmetros próximos ao controle, com diminuição de 4,26% na distância percorrida em relação ao controle ($p = 0,020$ em relação ao grupo Amp) e aumento de 4,74% nos levantamentos em relação ao controle ($p = 0,006$ em relação ao grupo Amp) (Figura 9A).

O DMSO (grupo Amp+DmsO) não apresentou efeito contra a redução das atividades de levantamento em 15 dias (Figura 9A), com redução de 31,82% em relação ao controle ($p = 0,014$). Além disso, o grupo Amp+DmsO apresentou reversão parcial sobre a distância percorrida ($p = 0,082$, comparado ao controle; $p = 0,324$, comparado ao grupo Amp).

Nos animais tratados por 20 dias, o grupo Amp apresentou redução de 48,98% na distância percorrida ($p = 0,00007$) e 47,71% na atividade de levantamento ($p = 0,0001$), em relação ao controle (Figura 9B). O Trolox[®] (grupo Amp+Tr) não amenizou estes efeitos nos camundongos tratados por 20 dias, com redução de 34,27% na distância percorrida ($p = 0,176$, em relação ao grupo Amp) e de 35,93% nas atividades de levantamento ($p = 0,207$ em relação ao grupo Amp), comparados ao controle. Da mesma forma, o DMSO (grupo Amp+DmsO) não amenizou a redução de distância percorrida em 20 dias, com queda de 34,22% em relação ao controle ($p = 0,003$). Porém, produziu proteção parcial nas atividades de levantamento dos animais tratados por 20 dias ($p = 0,049$, em relação ao Cont; $p = 0,038$, em relação ao grupo Amp).

As atividades de limpeza e produção de bolos fecais não foram alteradas pelos tratamentos, tanto em 15 quanto em 20 dias (Figura 9).

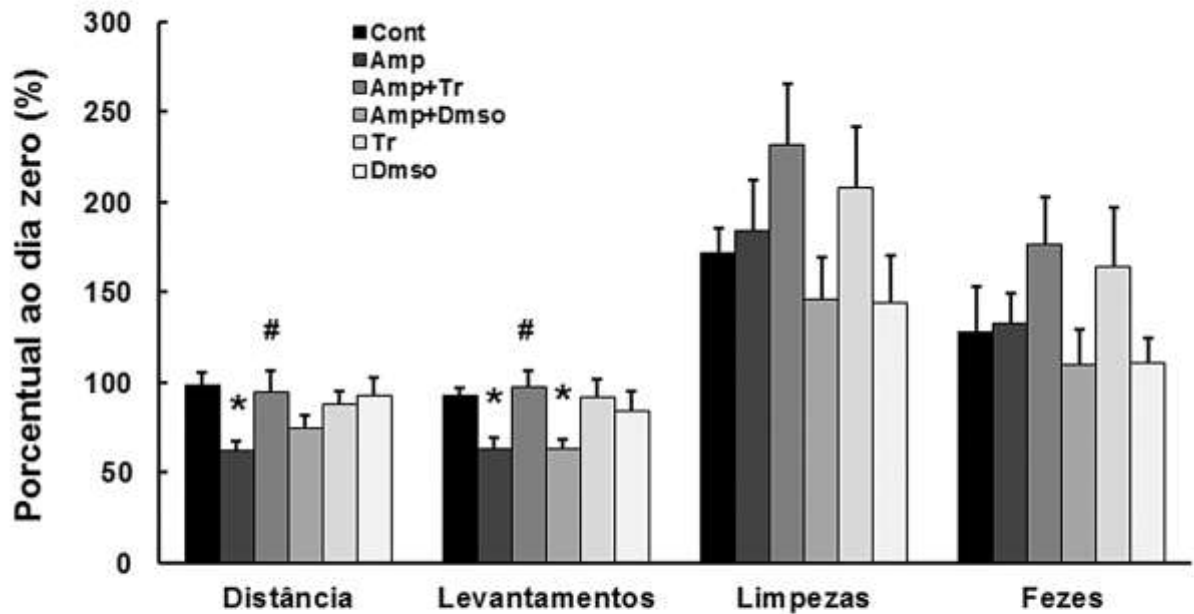
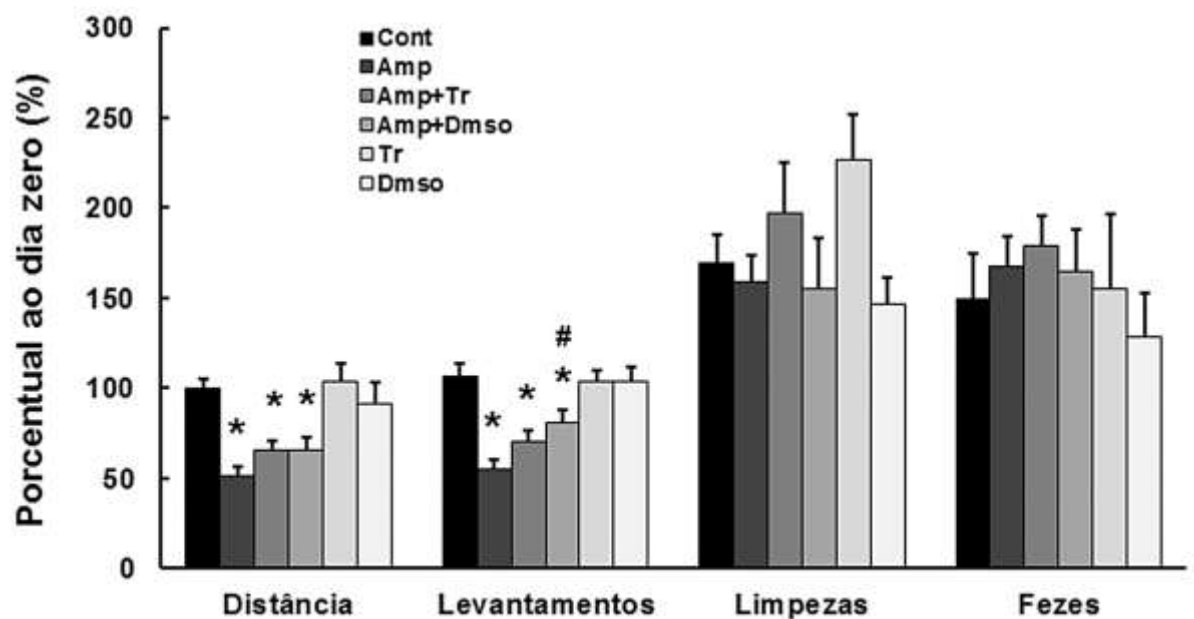
A**B**

Figura 9. Efeitos comportamentais em campo aberto nos camundongos no modelo de deficiência de tiamina com amprólio tratados por 15 e 20 dias. Os animais foram testados no campo aberto para avaliação de distância percorrida, levantamentos, frequência de limpezas e eliminação de bolos fecais. Os camundongos foram tratados por 15 (**A**) ou 20 dias (**B**) com ração AIN-93M e salina (Cont; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox® (Amp+Tr), ração AIN-93DT com DMSO (Amp+Dms0), ração AIN-93M e Trolox® (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dms0). Resultados representam a média \pm E.P.M. das porcentagens das avaliações realizadas nos dias 15 ou 20 em relação ao dia zero (100%), derivados de 12 experimentos independentes. Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. * $p \leq 0,05$ comparado ao controle, # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Amp.

No teste do rotarod, os animais tratados por 15 dias não apresentaram alterações (Figura 10A). Por outro lado, o grupo Amp tratado por 20 dias demonstrou redução no tempo de latência para queda, com média de $142,29 \text{ s} \pm 4,80$, comparado ao controle, com média de $183,11 \text{ s} \pm 7,24$ ($p = 0,006$; Figura 10B). De forma interessante, tanto o Trolox[®] (grupo Amp+Tr, $181,50 \text{ s} \pm 11,69$, $p = 0,008$ comparado ao grupo Amp) quanto o DMSO (grupo Amp+Dmso, $170,50 \text{ s} \pm 10,81$, $p = 0,035$ comparado ao grupo Amp) reverteram os efeitos de diminuição de coordenação motora observados nos animais Amp (Figura 10B).

Adicionalmente, o antioxidante Trolox[®] e o anti-inflamatório DMSO não influenciaram a coordenação motora durante os tratamentos de 15 ou 20 dias (Figura 10).

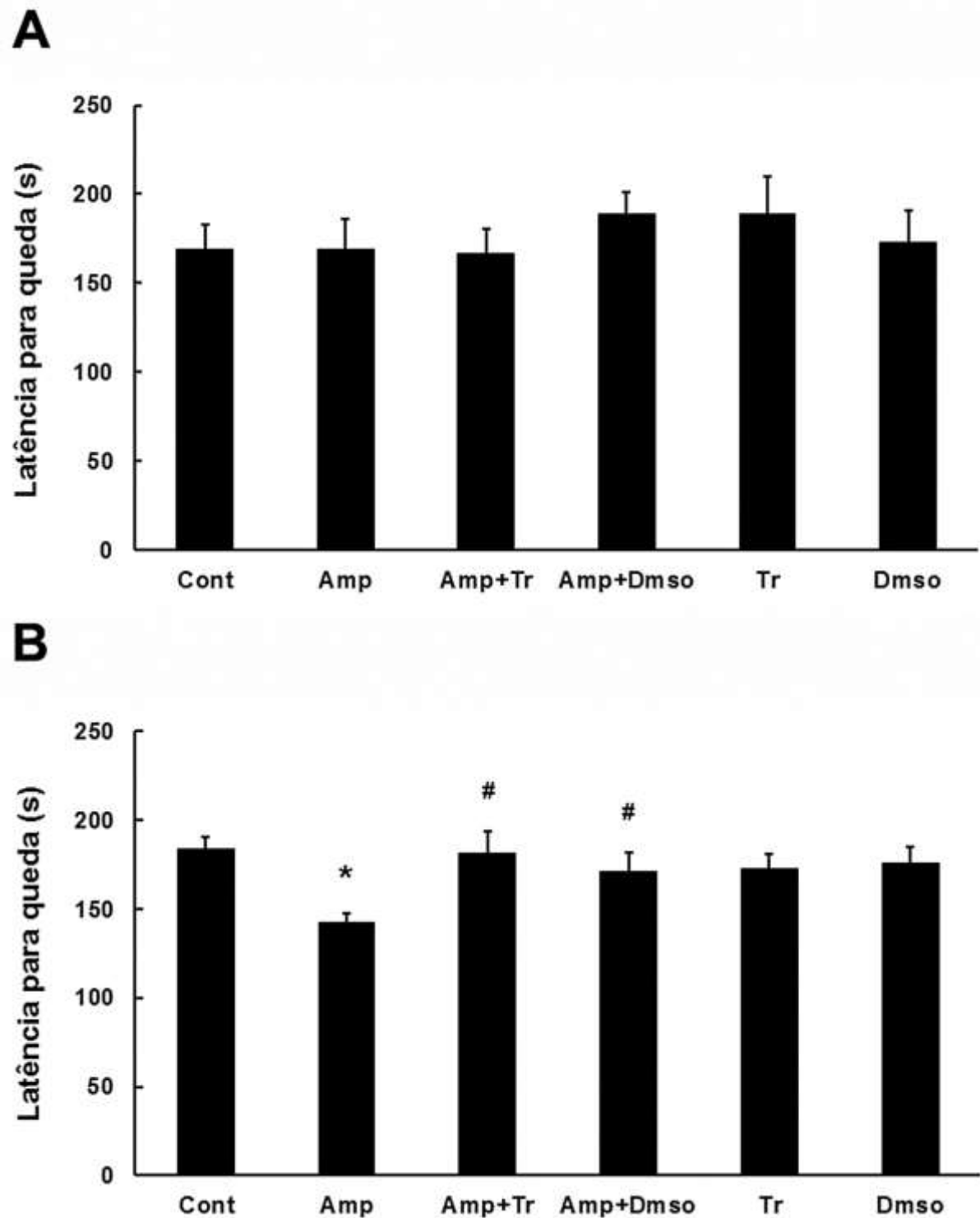


Figura 10. Teste do rotarod realizado nos camundongos tratados por 15 ou 20 dias no modelo de deficiência de tiamina com amprólio. Os animais foram testados no cilindro com rotação inicial de 5 RPM, com aceleração de 0,1 RPM/s. Os camundongos foram tratados com ração AIN-93M e salina (Cont; NaCl 0,9%), ração AIN-93DT e amprólio (Amp), ração AIN-93DT e amprólio com Trolox® (Amp+Tr), ração AIN-93DT e amprólio com DMSO (Amp+Dms), ração AIN-93M e Trolox® (Tr) ou ração AIN-93M e DMSO (Dms). Paineis (A) mostra o desempenho dos animais tratados por 15 dias e (B) os animais tratados por 20 dias. Resultados representam a média \pm E.P.M. dos tempos (em segundos) das avaliações realizadas 24 h após os últimos dias de tratamento, derivados de 5 experimentos independentes. Análise por ANOVA seguida do teste Duncan. * $p \leq 0,05$ comparado ao controle, # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Amp.

6 DISCUSSÃO

A DT leva a uma série de alterações em animais relacionadas com complicações no desenvolvimento do sistema nervoso, no metabolismo energético, na digestão, na proliferação celular e na atividade do ciclo celular em muitos processos no organismo (MANZETTI; ZHANG; VAN DER SPOEL, 2014). No presente estudo, os camundongos deficientes em tiamina apresentaram queda significativa no ganho de peso e no consumo de ração. O antioxidante Trolox[®] e o DMSO não foram capazes de induzir o efeito de proteção para reversão desses quadros. Foi demonstrado que a restrição dietética de tiamina reduz a ingestão de alimentos e o ganho de peso, efeitos revertidos em três dias após restauração da tiamina na dieta (BÂ, 2012). Esses dados sugerem que a tiamina tem papel fisiológico crucial na programação da homeostase de peso corporal, incremento e ponto de ajuste em roedores (BÂ, 2012). De forma interessante, o DMSO *per se* estimulou o aumento da ingestão de ração nos animais tratados por 15 dias, fato não observado em outro estudo realizado com a utilização do DMSO em cães saudáveis, onde os parâmetros de ingestão de água e ração mantiveram-se sem alterações (ORLATO, 2006).

Observamos uma melhora significativa nos testes comportamentais em campo aberto nos animais do grupo Amp+Tr (15 dias). A não reversão da redução da distância percorrida no grupo Amp+Tr tratado por 20 dias é sugestivo de alterações bioquímicas mais severas em outras vias metabólicas celulares, nas quais o Trolox[®] não tem capacidade de exercer proteção. FREEMAN et al. (1987) relataram em um dos seus estudos, através do teste de campo aberto com camundongos como modelo experimental de DT, uma diminuição do comportamento exploratório dos animais deficientes, tanto no que diz respeito à distância percorrida quanto ao número de levantamentos sobre as patas traseiras. Um fator interessante observado foi a atuação do DMSO (grupo Amp+DmsO) nos animais tratados por 20 dias. Esse fármaco conferiu uma proteção parcial em relação às atividades de levantamento, sugerindo uma provável alteração subclínica funcional. A privação crônica de tiamina é acompanhada por diminuições seletivas e regionais nos níveis de enzimas dependentes de tiamina no cérebro (BUTTERWORTH, 1986). As alterações de aprendizado e memória resultante da DT estão relacionadas às lesões em estruturas diencefálicas e corticais, como o tálamo e hipocampo. Há relação

entre a severidade do déficit no aprendizado e memória espacial e o grau de lesão (LANGLAIS, et al., 1992; LANGLAIS; SAVAGE, 1995).

Em relação ao teste do rotarod, verificamos que o uso do antioxidante Trolox[®] (grupo Amp+Tr) aumentou o tempo de latência para queda dos animais DT, para tempos próximos aos animais controle. O baixo desempenho no rotarod, de animais que são expostos à DT pode ser explicado, pelo menos em parte, pela vulnerabilidade seletiva à deficiência de tiamina, de algumas estruturas encefálicas (LAVOIE; BUTTERWORTH, 1995). Outra possível hipótese para os déficits de equilíbrio e coordenação motora observados nos animais seria a perda de ou redução na comunicação excitatória do cerebelo com outras estruturas encefálicas relacionadas com a motricidade, principalmente o estriado. Por causa da existência de conexões do cerebelo com esta estrutura, via núcleos talâmicos (ICHNOHE; SHOUMURA, 2000) é possível que danos na estrutura cerebelar provoquem interrupção da comunicação excitatória glutamatérgica (UUSISAARI et al., 2007). Do mesmo modo, o DMSO também melhorou o desempenho dos animais DT no rotarod, o que possivelmente sugere que esse fármaco atue na transmissão sináptica do glutamato, auxiliando na locomoção dos animais (TSVYETLYNSKA et al., 2005). Alguns estudos apontam importantes alterações neuroquímicas em animais DT, envolvendo prejuízos da síntese e/ou liberação de neurotransmissores (VETRENO et al., 2012), principalmente nos sistemas glutamatérgicos (TODD; BUTTERWORTH, 1999).

Verificamos que o efeito deletério da DT na viabilidade celular no encéfalo dos camundongos, no nosso modelo, foi observado apenas no córtex cerebral, sem envolvimento de outras regiões. De maneira interessante, a ausência de alteração na viabilidade celular incluiu o tálamo, uma vez que na DT as lesões são primariamente encontradas nos núcleos talâmicos, tanto roedores quanto em humanos (VETRENO et al., 2012). Observamos que o antioxidante Trolox[®] atuou parcialmente impedindo a queda da viabilidade celular, ao contrário do DMSO, que apresentou uma melhor eficácia, agindo totalmente contra a queda da viabilidade celular. Devido às suas propriedades de eliminação de radicais hidroxílicos e capacidade de melhorar a fosforilação oxidativa mitocondrial, o DMSO pode atuar neutralizando os efeitos citotóxicos dos radicais livres formados após isquemia mitocondrial (SCHLAFER; KANE; KIRSCH, 1982), além de possuir propriedades neuroprotetoras contra isquemia cerebral (MCGRAW, 1977; SHIMIZU; SIMON;

GRAHAM, 1997). Adicionalmente, apesar da queda da viabilidade celular no córtex cerebral (Figura 2B), não observamos alterações morfológicas celulares ou tissulares em nenhuma área do SNC dos camundongos, inclusive no córtex. Esses dados são sugestivos de que as lesões neurais desenvolvidas no nosso modelo experimental de DT com amprólio, nos tempos de tratamento utilizados, são aparentemente brandas e exclusivamente funcionais, envolvendo aspectos bioquímicos mitocondriais, não suficientes para induzir processos degenerativos ou morte celular. Porém, é importante ressaltar que os estudos de DT em roedores realizados até hoje, utilizam uma substância diferente para indução de deficiência, que é o modelo que combina a alimentação com ração livre de tiamina com a administração (injeções intraperitoneais) de piritiamina (um inibidor da tiamina pirofosfocinase). À parte da avaliação da viabilidade celular induzida por dieta e amprólio, investigamos a possível participação do estresse oxidativo como mecanismo das alterações por DT nos camundongos. De forma interessante, o Trolox[®] reverteu a queda de desempenho psicomotor em campo aberto e no rotarod, sugerindo que estes efeitos no modelo de DT com amprólio estão associados ao estresse oxidativo. Foi demonstrada evidência considerável para o desenvolvimento do estresse oxidativo na DT, incluindo a presença de aumento da produção de EROs (HAZELL et al., 2013b). Além disso, esse aumento de EROs é efeito classicamente relatado em estudos com a utilização de piritiamina (LANGLAIS et al., 1997).

A DT reduz os níveis de tiamina pirofosfato (TPP), necessária para utilização de glicose no SNC (MANCINELLI, 2003). A tiamina é transportada para o cérebro e fosforilada pela tiamina pirofosfocinase. A inibição desta enzima ocorre por antagonistas como a piritiamina, resultando na diminuição da síntese de TPP (DESJARDINS; BUTTERWORTH, 2005). Tratamento de animais experimentais com piritiamina acarreta redução generalizada das concentrações de TPP ao longo do encéfalo e uma perda seletiva precoce na atividade de α -cetogluturato desidrogenase em regiões como o tálamo, onde há manifestação de perda seletiva de células neuronais na DT (HÉROUX; BUTTERWORTH, 1995). A diminuição da atividade da α -cetogluturato desidrogenase após o tratamento com piritiamina está associada à diminuição da síntese de aminoácidos excitatórios e inibitórios derivados de glicose, incluindo glutamato, aspartato e GABA, com aumento

concomitante de lactato (BUTTERWORTH; HEROUX, 1989), consistente com diminuição do fluxo de carbono através do ciclo do ácido tricarbóxico. Diminuições na atividade da α -cetoglutarato desidrogenase levam à cessação da oxidação da glicose mitocondrial e morte celular (GIBSON et al., 1984).

Paralelamente às alterações do SNC, avaliamos os aspectos anatomopatológicos das vísceras dos animais tratados. A esteatose encontrada sugere que a DT induzida por amprólio no nosso modelo modifica o metabolismo energético do organismo, como sugerido por Bâ (2012), sobrecarregando o fígado com ácidos graxos. Porém, os animais tratados com Trolox[®] demonstraram melhora do quadro em 15 dias, sugerindo que também há envolvimento de estresse oxidativo na disfunção hepática dos animais DT (BELO et al., 2012; CHEN; YEE; GIACOMINI, 2015; PORTARI et al., 2016). Ao avaliarmos os resultados utilizando DMSO, constatamos que o mesmo possivelmente tenha atuado como antioxidante e anti-inflamatório, diminuindo consideravelmente a esteatose hepática em ambos os períodos de tratamentos. Estudos com a utilização de metformina (medicamento para tratar diabetes tipo 2) comprovam que a DT resulta em esteatose hepática, pois esse medicamento inibe competitivamente a absorção de tiamina (CHEN; YEE; GIACOMINI, 2015). A leve esteatose observada no grupo DmsO pode ser resultado da metabolização parcial desse fármaco por enzimas microsomais hepáticas e, embora uma quantidade significativa de DMSO possa ser eliminada na bile, a maior parte sofre circulação entero-hepática (WONG; REINERTSON, 1984). Além disso, os animais dos grupos Amp e Amp+Tr tratados por 20 dias, desenvolveram moderada proteinúria, determinada pelo encontro de material proteináceo eosinofílico nos lúmens tubulares renais, sugerindo que um tratamento mais prolongado de DT com amprólio pode iniciar lesão renal glomerular. De forma interessante, estudos demonstram que a tiamina previne lesão glomerular e subsequente desenvolvimento de albuminúria (KARACHALIAS et al., 2010; RABBANI; THORNALLEY, 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo com a utilização do antagonista da tiamina, amprólio, demonstraram alterações metabólicas sistêmicas que culminaram com a redução do ganho de peso, consumo de ração, surgimento de esteatose e proteinúria. Em condições normais, a tiamina mantém a atividade celular e o metabolismo necessários para função dos órgãos, para regeneração dos tecidos e para atividade neuronal (BETTENDORFF, 1993). Adicionalmente, a DT induzida por

amprólio nesse estudo, ocasionou alterações comportamentais significativas, principalmente redução das atividades locomotora e exploratória. A DT afeta estruturas encefálicas relacionadas à modulação e controle motor (BUTTERWORTH, 1982). A atuação do antioxidante Trolox[®] e do anti-inflamatório DMSO foi significativa, e promoveu efeitos protetores melhorando de forma considerável as atividades comportamentais dos animais, reforçando assim, suas ações em distúrbios que geram estresse oxidativo e processos inflamatórios.

Apesar do estabelecimento de modelos experimentais em laboratório com roedores, e da descrição das disfunções neurológicas e danos cerebrais que resultam da DT, os mecanismos precisos que conduzem às lesões características desse distúrbio permanecem obscuros. Ao longo de muitos anos, têm sido propostos vários processos que podem levar à morte celular neuronal focal nesta desordem neurológica. Mas, apesar dos esforços concentrados para relacionar esses processos a uma sequência clara de acontecimentos que culminam no desenvolvimento da neuropatologia, poucos resultados foram obtidos e atualmente muito pouco ainda se conhece sobre os mecanismos celulares envolvidos nos processos neurodegenerativos da DT. Na encefalopatia de Wernicke, a disfunção inicial para partes-chave do sistema límbico, que pode progredir rapidamente para danos estruturais, resulta em complicações graves e muitas vezes fatais para as pessoas afetadas por este distúrbio (ABDOU; HAZELL, 2015). Embora as alterações de fase aguda da DT sejam consideradas facilmente tratáveis pela administração de tiamina, e que a administração da vitamina permanece o remédio para muitos dos problemas metabólicos relacionados à DT, uma neuropatologia crônica e não responsiva a tratamento pode se desenvolver após repetidos ataques de deficiência (HARPER, 1983; ABDOU; HAZELL, 2015), sugerindo que uma intervenção apropriada durante estes episódios tem o potencial para atrasar ou prevenir o desenvolvimento de grandes lesões no SNC. Essa intervenção, no entanto, só é possível e com probabilidade de sucesso, se a fisiopatologia subjacente a esta condição for bem compreendida, algo que continua seriamente carente (HAZELL; BUTTERWORTH, 2009).

Vale ressaltar ainda que não há relatos até o presente momento, sobre estudos de DT induzida por amprólio em roedores. Portanto, a partir dos dados obtidos no presente trabalho é possível desenvolver pesquisas futuras com o intuito de elucidar melhor a ação do amprólio, bem como desenvolver e/ou aprimorar

protocolos de tratamentos *in vivo* mais adequados para o estudo dos mecanismos neurodegenerativos e atenuação de sequelas neurológicas associados à DT.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, concluímos que a DT induzida por amprólio em camundongos:

1. Ocasinou alterações metabólicas, verificadas através da diminuição do ganho de peso e consumo de ração tanto em 15 quanto em dias de tratamento, não revertidas pela ação do Trolox[®] e DMSO;
2. Promoveu queda da viabilidade celular do córtex parietal observado pelo método da redução do TTC em 20 dias de tratamento, sendo que o Trolox[®] e o DMSO atuaram de forma a proteger contra a queda da viabilidade celular nessa região;
3. Promoveu redução da atividade exploratória (distância percorrida e atividades de levantamento) dos animais em 15 dias, porém o antioxidante Trolox[®] foi capaz reverter esse quadro;
4. Promoveu alterações hepáticas como esteatose em ambos os períodos de tratamento, atenuadas pela utilização do Trolox[®] e DMSO;
5. Promoveu redução no tempo de latência para queda dos animais após 20 dias de tratamento, a qual foi revertida pelo tratamento com Trolox[®] e DMSO;
6. Desenvolveu proteinúria moderada nos animais tratados por 20 dias e o uso do antioxidante Trolox[®] não reverteu esse quadro;
7. Ressalta-se que a utilização do Trolox[®] *per se*, por um período prolongado provocou esteatose hepática nos animais;
8. O anti-inflamatório DMSO apresentou melhores resultados, comparado ao Trolox[®], na análise histopatológica das vísceras em relação a diminuição da esteatose hepática e da proteinúria observadas em ambos os períodos de tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, E.; HAZELL, A. S. Thiamine Deficiency: An Update of Pathophysiologic Mechanisms and Future Therapeutic Considerations. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 2, p. 353–361, 2015.
- AGUIAR JR. et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 452–457, 2009.
- ALSUP, E.; DEBOWES, R. Dimethyl sulfoxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, p. 1011–1014, 1984.
- ANDERTON, N. et al. Identification of a toxin suspected of causing death in livestock grazing Phalaris pastures. **CAB International, Farnham Royal**, 1994.
- ANZALONE, S. et al. Cortical cholinergic abnormalities contribute to the amnesic state induced by pyrithiamine-induced thiamine deficiency in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 5, p. 847–858, 2010.
- AOUADI, M. et al. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1091–8, set. 2006.
- APLEY, M. D. Consideration of evidence for therapeutic interventions in bovine polioencephalomalacia. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 151–161, 2015.
- ASHWOOD-SMITH, M. . Radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. **Ann NY Acad Sci**, v. 141, p. 45–62, 1967.
- BÂ, A. Functional vulnerability of developing central nervous system to maternal thiamine deficiencies in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 47, n. 4, p. 408–14, dez. 2005.
- BÂ, A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, n. 7, p. 923–31, nov. 2008.
- BÂ, A. Effects of thiamine deficiency on food intake and body weight increment in adult female and growing rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, n. 5 and 6, p. 575–581, 2012.

- BARCLAY, L. R. .; ARTZ, J.; MOWAT, J. J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: 14C tracer and product studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 77–85, 1995.
- BARROS, C. S. L. Neuropatias bovinas emergentes. **Ciência Animal Brasileira**, p. 1–17, 2009.
- BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. dos S.; LEMOS, R. A. A. de. **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**. 1. ed. Montes Claros: Vallée, 2006.
- BELO, M. A. A. et al. Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 3, p. 155–165, 2012.
- BETTENDORFF, L., et al. Thiamin and derivatives as modulators of rat brain chloride channels. **Neuroscience**, v. 52, p. 1009–1017, 1993.
- BETTENDORFF, L.; WINS, P. **Biochemistry of thiamine and thiamine phosphate compounds**. vol. 1 ed. Oxford: Encyclopedia of biological chemistry, 2013.
- BLYTHE, L. et al. Pharmacokinetic disposition of dimethyl sulfoxide administered intravenously to horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 1739–1743, 1986.
- BRAYTON, C. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinarian**, v. 76, p. 76–90, 1986.
- BRAZIL, D. P.; YANG, Z.-Z.; HEMMINGS, B. a. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. **Trends in biochemical sciences**, v. 29, n. 5, p. 233–42, maio 2004.
- BROOKS, S.P.; DUNNETT, S. B. Assess motor phenotype in mice: a user’s guide. **Nat Rev Neurosci**, p. 519–529, 2009.
- BROWN, G. Defects of thiamine transport and metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 37, n. 4, p. 577–585, 2014.
- BUNIK, V. I.; TYLICKI, A.; LUKASHEV, N. V. Thiamin diphosphate-dependent enzymes: From enzymology to metabolic regulation, drug design and disease

models. **FEBS Journal**, v. 280, n. 24, p. 6412–6442, 2013.

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

BUTTERWORTH, R. F. Neurotransmitter function in thiamine-deficiency encephalopathy. **Neurochemistry International**, v. 4, p. 449–464, 1982.

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

BUTTERWORTH, R. F. Pathophysiologic mechanisms responsible for the reversible (thiamine-responsive) and irreversible (thiamine non-responsive) neurological symptoms of Wernicke's encephalopathy. **Drug and Alcohol Review**, v. 12, n. 3, p. 315–322, 1993.

BUTTERWORTH, R. F. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 189–96, mar. 2009.

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

CALINGASAN, N. Y. et al. Accumulation of amyloid precursor protein-like immunoreactivity in rat brain in response to thiamine deficiency. **Brain research**, v. 677, n. 1, p. 50–60, 1995.

CALINGASAN, N. Y. et al. Novel neuritic clusters with accumulations of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 immunoreactivity in brain regions damaged by thiamine deficiency. **The American journal of pathology**, v. 149, n. 3, p. 1063–1071, 1996.

CALINGASAN, N. Y.; GIBSON, G. E. Vascular Endothelium Is a Site of Free Radical Production and Inflammation in Areas of Neuronal Loss in Thiamine-deficient Brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 903, n. 1, p. 353–356, 2000.

CAMMERMEYER, J. The post-mortem origin and mechanism of neuronal hyperchromatosis and nuclear pyknosis. **Experimental Neurology**, v. 2, p. 379–405,

1960.

CARLTON, W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998.

CARPENTER, R.; ANGEL, M.; MORGAN, R. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. **Otolaryngology Head Neck Surgery**, v. 16, p. 1625–1626, 1994.

CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DHAME, E. Pathology of a bovine necrotizing encephalitis in Argentina. **Veterinarmed.Reihe**, v. 30, p. 161–168, 1983.

CASTRO, C. A. et al. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 521–526, 1995.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, p. 37–40, 2001.

CHEN, J. et al. GluR6-containing KA receptor mediates the activation of p38 MAP kinase in rat hippocampal CA1 region during brain ischemia injury. **Hippocampus**, v. 19, n. 1, p. 79–89, 2009.

CHEN, L.; YEE, S. W.; GIACOMINI, K. M. OCT1 in hepatic steatosis and thiamine disposition. **Cell Cycle**, v. 14, n. 3, p. 283–284, 2015.

CHEN, Z. et al. MAP Kinases. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2449–2476, ago. 2001.

CHIOU, S.; VESELY, D. Dimethyl sulfoxide inhibits renal Na⁺-K⁺-ATPase at a site different from ouabain and atrial peptides. **Life Sci**, v. 57, p. 945–955, 1995.

CHORNY, S.; PARKHOMENKO, J.; CHORNA, N. Thiamine deficiency caused by thiamine antagonists triggers upregulation of apoptosis inducing factor gene expression and leads to caspase 3-mediated apoptosis in neuronally differentiated rat PC-12 cells. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 2, p. 315–322, 2007.

CHRISTIAN, R. G.; T. L. Lead poisoning in cattle: brain lesion and hematologic changes. **J. Vet. Res.**, v. 32, p. 203–216, 1971.

COLODEL, E.M. et al. Polioencefalomalacia em caprinos associada à ingestão dos de *Hovenia dulcis* (uva do japão). **Boletim do laboratório Regional de**

Diagnóstico, p. 35–42, 1998.

COLUCCI, M. et al. New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 6, p. 419–425, 2008.

CORDOVA, F. M. et al. In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.

CORDOVA, F. M. et al. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Research**, v. 998, n. 1, p. 65–72, 2004.

COWAN, K. J.; STOREY, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 7, p. 1107–1115, abr. 2003.

CUNHA, P. et al. Polioencefalomalacia experimental em bovinos induzida por toxicose por enxofre. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 41–52, 2011.

DAVID, N. **Associação da meningoencefalite por herpesvírus bovino-5 com polioencefalomalacia**. 2002. Universidade de Pelotas, 2002.

DAVID, N. et al. Reactivation of latent bovine herpesvirus type 5 in cattle with polioencephalomalacia induced by ammonium sulphate 1. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 435–441, 2007.

DESJARDINS, P.; BUTTERWORTH, R. F. Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of selective neuronal loss in Wernicke's encephalopathy. **Molecular Neurobiology**, v. 31, n. 1–3, p. 17–25, 2005.

EDWIN, E.E.; JACKMAN, R. Ruminal Thiaminase and tissue thiamine in cerebrocortical necrosis. **Veterinary Record**, v. 92, p. 369–377, 1973.

ERIKSON, K. M. et al. Manganese Neurotoxicity: A Focus on the Neonate. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 2, p. 369–377, 2007.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. **Restrição de tiamina no período perinatal, induz, em animais na idade adulta, déficits motores e alterações em parâmetros centrais GABAérgicos e glutamatérgicos**. 2009. Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. Perinatal thiamine restriction affects central GABA and glutamate concentrations and motor behavior of adult rat offspring.

Neuroscience Letters, v. 617, p. 182–187, 2016.

FORMANEK, K.; SUCKERT, R. **Diuretische Wirkung von DMSO**. [s.l.: s.n.].

FREEMAN, G.B.; NIELSEN, P.E. & GIBSON, G. E. Effect age on behavioral and enzymatic changes during thiamin deficiency. **Neurobiol Aging**, p. 429–434, 1987.

FREITAS-SILVA, D. M. et al. Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 211, n. 1, p. 33–40, 2010.

FUNK, C. On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished Rice. **Bio-chemical Department, Lister Institute of Preventive Medicine**, v. 43, p. 395–400, 1911.

GALIZA, G. J. et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 267–276, 2010.

GAO, X. et al. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. **Journal of neurochemistry**, v. 105, n. 3, p. 943–55, maio 2008.

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

GONÇALVES, R. C. et al. Aspectos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos da polioencefalomalácia em bovinos, na região de Botucatu, SP. **Veterinária Notícias**, v. 7, n. 2, p. 53–57, 2001.

GONSETTE, R. E. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. **J.Neurol.**, p. 48–53, 2008.

GOULD, D. . Polioencephalomalacia. **J. Anim.Sci.**, v. 76, p. 309–314, 1998.

GRANT, E. R. et al. Protection against glutamate toxicity through inhibition of the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in neuronally differentiated P19 cells². **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 283–296, ago. 2001.

GREENWOOD, J.; PRATT, O. E. **Comparison of the effects of some thiamine**

analogues upon thiamine transport across the blood-brain barrier of the rat. *The Journal of Physiology*, dez. 1985. .

HAAS, R. H. Thiamin and the brain. *Annual Review of Nutrition*, v. 8, p. 483–515, 1988.

HADDAD, J. J. Mitogen-activated protein kinases and the evolution of Alzheimer's: a revolutionary neurogenetic axis for therapeutic intervention? *Progress in neurobiology*, v. 73, n. 5, p. 359–77, ago. 2004.

HAKIM, A.M.& PAPPUS, H. M. Sequence of metabolic, clinical and histological events in experimental thiamine deficiency. *Ann. Neuol.*, v. 13, p. 365–375, 1983.

HAKIM, A. M. The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. *Annals of Neurology*, v. 16, n. 6, p. 673–679, 1984.

HAKIM, A. M. Effect of Thiamine Deficiency and Its Reversal on Cerebral Blood Flow in the Rat. Observations on the Phenomena of Hyperperfusion, [ldquo]No Reflow,[rdquo] and Delayed Hypoperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 6, n. 1, p. 79–85, fev. 1986.

HARPER, C. The incidence of Wernicke's encephalopathy in Australia: a neuropathological study of 131 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v. 46, n. 7, p. 593–598, 1983.

HAVEN, T.R.; CALDWELL D.R E JENSEN, R. Role of predominant rumen bacteria in the cause of polioencephalomalacia in cattle. *J. Vet. Res.*, v. 44, p. 1451–1455, 1983.

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

HAZELL, A. S.; BUTTERWORTH, R. F. Update of Cell Damage Mechanisms in Thiamine Deficiency: Focus on Oxidative Stress, Excitotoxicity and Inflammation. *Alcohol and Alcoholism*, v. 44, n. 2, p. 141–147, 2009.

HAZELL, A. S.; BUTTERWORTH, R. F.; HAKIM, A. M. Cerebral vulnerability is associated with selective increase in extracellular glutamate concentration in experimental thiamine deficiency. *Journal of Neurochemistry*1, v. 61, n. 3, p. 1155–1158, 1993.

- HAZELL, A. S. et al. The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: a multifactorial targeting issue. **Neurochem Int**, v. 62, p. 796–802, 2013a.
- HAZELL, A. S. et al. The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: A multifactorial targeting issue. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 796–802, 2013b..
- HAZELL, A. S.; WANG, C. Downregulation of complexin I and complexin II in the medial thalamus is blocked by N-acetylcysteine in experimental Wernicke's encephalopathy. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1–2, p. 200–207, jan. 2005.
- HÉROUX, M.; BUTTERWORTH, R. F. Reversible alterations of cerebral gamma-aminobutyric acid in pyriethamine-treated rats: implications for the pathogenesis of Wernicke's encephalopathy. **Journal of Neurochemistry**, v. 51, n. 4, p. 1221–1226, 1988.
- HÉROUX M.; BUTTERWORTH R.F. Regional alterations of thiamine phosphate esters and of thiamine diphosphate-dependent enzymes in relation to function in experimental Wernicke's encephalopathy. **Neurochemistry Res.**, v. 20, p. 87–93, 1995.
- HUCKER, H. et al. Studies in the absorption, excretion and metabolism of dimethyl sulfoxide (DMSO) in man. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 155, p. 309–319, 1967.
- ICHINOHE, N. MORI, F. & SHOUMURA, K. A di-synaptic projection from the lateral cerebellar nucleus to the laterodorsal part of the striatum via the central lateral nucleus of the thalamus in the rat. **Brain Research**, v. 880, p. 191–197, 2000.
- IRLE, E.; MARKOWITZSCH, H. Widespread neuroanatomical damage and learning deficits following chronic alcohol consumption or vitamin B1 (thiamine) deficiency in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 277–294, 1983.
- JACKMAN, R; EDWIN, E. E. Cerebral autofluorescence and thiaminase deficiency in cerebrocortical necrosis. **Vet.Rec.**, p. 548–550, 1983.
- JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Pharmacology of DMSO. **Cryobiology**, v. 23, n. 1, p. 14–27, 1986.
- JENSEN, R.; GRINER, L.A.; ADAMS, O. R. Polioencephalomalacia of cattle and

sheep. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 129, p. 311–321, 1956.

JIANG, C. et al. Dopaminergic Properties and Experimental Anti-Parkinsonian Effects of IPX750 in Rodent Models of Parkinson Disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 27, n. 2, 2004.

JORTNER, B. S. The return of the dark neuron. A histologic artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. **Neuro Toxicology**, v. 27, p. 628–634, 2006.

KARACHALIAS, N. et al. Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. **Diabetologia**, v. 53, n. 7, p. 1506–1516, 2010.

KAWAKAMI, Z.; IKARASHI, Y.; KASE, Y. Glycyrrhizin and its metabolite 18 beta-glycyrrhetic acid in glycyrrhiza, a constituent herb of yokukansan, ameliorate thiamine deficiency-induced dysfunction of glutamate transport in cultured rat cortical astrocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 626, n. 2–3, p. 154–8, 2010.

KE, Z.-J.; BOWEN, W. M.; GIBSON, G. E. Peripheral inflammatory mechanisms modulate microglial activation in response to mild impairment of oxidative metabolism. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 5, p. 548–556, out. 2006.

KE, Z.-J.; DEGIORGIO, L.; VOLPE, B. T.; GIBSON, G. E. Reversal of thiamine deficiency-induced neurodegeneration. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 62, n. 2, p. 195–207, fev. 2003.

KEDAR, I.; JACOB, E.; BAR-NATAN, N.; RAVID, M. Dimethyl sulfoxide in acute ischemia of the kidney. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 411, p. 131–134, 1983.

KUMAR, N. Nutritional neuropathies. **Neurologic Clinics**, v. 25, n. 1, p. 209–55, fev. 2007.

KUMAR, N. Neurologic presentations of nutritional deficiencies. **Neurologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 107–70, fev. 2010.

LANGLAIS, P. J.; ZHANG, S. Cortical and subcortical white matter damage without Wernicke's encephalopathy after recovery from thiamine deficiency in the rat. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 21, p. 434–443, 1997.

LANGLAIS, P.; MANDEL, R.; MAIR, R. Diencephalic lesions, learning impairments, and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. **Behav Brain Res**, v. 48, p. 177–185, 1992.

LANGLAIS, P.; SAVAGE, L. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks which correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. **Behav. Brain Res**, v. 68, p. 75–89, 1995.

LANGLAIS, P. J. et al. Increased cerebral free radical production during thiamine deficiency. **Metabolic Brain Disease**1, v. 12, n. 2, p. 137–143, jun. 1997.

LANGLAIS, P. J.; ZHANG, S. X. Extracellular glutamate is increased in thalamus during thiamine deficiency-induced lesions and is blocked by MK-801. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 6, p. 2175–2182, 1993.

LAVOIE, J. & BUTTERWORTH, R. . Reduced Activities of Thiamine- Dependent Enzymes in Brains of Alcoholics in the absence of Wernicke's Encephalopathy. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 19, p. 1073–1077, 1995.

LEMOS, A. F. A. **Absorção intestinal de tiamina: caracterização e modulação nutricional**. 2003. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, 2003.

LEMOS, R. **Enfermidades Do Sistema Nervoso De Bovinos De Corte Das Regiões Centro-Oeste E Sudeste Do Brasil. Tese de doutorado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal**, p. 149, 2005.

LEMOS, R. A. A. . R.-C. F. **Polioencefalomalacia**. 3^o ed. Santa Maria, 2007.

LI, S. MEALING. G.A.; MORLEY, P.; STYS, P. K. Novel injury mechanism in anoxia an trauma of spinal cord white matter glutamate release via reverse Na dependent glutamate transport. **Neuroscience**, v. 19, 1999.

LIMA, E. F.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; DANTAS, A. F. M.; MEDEIROS, J. M.; SUCUPIRA JÚNIOR, G. Polioencefalomalacia em caprinos e ovinos na região semi-árida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 9–14, 2005.

LINKLATER, K.A, DYSON, D.A; MORGAN, K. . Faecal thiaminase in clinically normal sheep associated with outbreaks of polioencefalomalacia. **Res.Vet.Sci.**, v. 22, p. 308–312, 1977.

LONERAGAN, G. H. et al. Association of excess sulfur intake and an increase in hydrogen sulfide concentrations in the ruminal gas cap of recently weaned beef calves with polioencephalomalacia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**1, v. 213, n. 11, p. 1599–1604, 1998.

LOW, J. C. et al. Sulphur-induced polioencephalomalacia in lambs. **Veterinary Record**, v. 138, n. 14, p. 327–329, 1996.

MANCINELLI, R. et al. Simultaneous liquid chromatographic assessment of thiamine, thiamine monophosphate and thiamine diphosphate in human erythrocytes: a study on alcoholics. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 789, n. 2, p. 355–63, jun. 2003.

MANCINELLI, et al. Simultaneous liquid chromatographic assessment of thiamine, thiamine monophosphate and thiamine diphosphate in human erythrocytes: a study on alcoholics. **Journal of Chromatography B.**, v. 789, 2003.

MANZETTI, S.; ZHANG, J.; VAN DER SPOEL, D. Thiamin function, metabolism, uptake, and transport. **Biochemistry**, v. 53, n. 5, p. 821–835, 2014.

MARTIN, P. R.; SINGLETON, C.K.; HILLER- STURMHOFEL, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Res. Health**, v. 27, p. 134–142, 2003.

MATSUSHIMA, K.; MACMANUS, J. P.; HAKIM, A. M. Apoptosis is restricted to the thalamus in thiamine-deficient rats. **NeuroReport**, v. 8, n. 4, p. 867–870, 1997.

MAXIE, M. G.; YOUSSEF, S. Nervous system. In: MAXIE, M. G. (Ed.). **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 281–457.

MCALLISTER, M. M. et al. Evaluation of ruminal sulfid concentrations and seasonal outbreaks of polioencephalomalacia in beef cattle in feedlot. **J.Am.Vet.Med.Assoc**, v. 211, p. 1275–1279, 1997.

MCGRAW, C. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cerebral infarction in the Mongolian gerbil. **Acta Neurol Scand**, p. 160–161, 1977.

MELDRUN, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1007–1015, 2000.

MELLA, C.M.; PEREZ-OLIVA, O.; LOEW, F. Induction of bovine poliocephalomalacia

with a feeding system based on molasses and urea. **Can.J.Comp.Med.**, v. 40, p. 104–110, 1976.

MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 45–60, 2000.

MORGAN, K. T. Amprolium poisonin of preruminant lambs. An ultrastructural study of the cerebral malacia and the nature of the inflammatory response. **J.Path.**, v. 112, p. 229–236, 1974.

MORO, L.; NOGUEIRA, R.H.G.; CARVALHO, A.U.; MARQUES, D. . Relato de três casos de polioencefalomalacia em bovinos. **Arqu.Bras.Med.Vet.Zoot**, v. 46, p. 409–416, 1994.

MOSCARDINI, A.R.C. et al. Doenças com sinais neurológicos em ovinos no DF e Entorno. **Congresso Latinoamericano de Buiatria, Salvador**, p. p.19, 2003.

MOTTA, A. et al. Polioencefalomalácia em bovinos. In: 9º Enapave, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: 1999.

MOUSSEAU, D. D.; RAO, V. L. R.; BUTTERWORTH, R. F. Vesicular dysfunction during experimental thiamine deficiency is indicated by alterations in dopamine metabolism. **European Journal of Pharmacology**, v. 317, n. 2–3, p. 263–267, dez. 1996.

MULHOLLAND, P. J. Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. **Cerebellum**, v. 5, n. 1, p. 55–63, 2006.

NAGAI, H. et al. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 1–6, jan. 2007.

NAKAGAWASAI, O. Behavioral and neurochemical alterations following thiamine deficiency in rodents: relationship to functions of cholinergic neurons. **Yakugaku Zasshi**, v. 125, p. 549–554, 2005.

NAKAGAWASAI, O. et al. Enhanced Head-Twitch Response to 5-HT-Related Agonists in Thiamine-Deficient Mice. **Journal of Neural Transmission**, v. 114, n. 8, p. 1003–1010, 2007.

NAKAZATO, L.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F. Polioencefalomalacia em

bovinos. **Nutr.Rep.Int**, p. 95–104, 2000.

NAKAZATO, L. **Polioencefalomalacia em bovinos nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo**. 1998. Universidade Federal de Pelotas, 1998.

NAKAZATO, L.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F. Polioencefalomalacia em bovinos nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 119–125, 2000.

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

NASCIMENTO, I. A. Polioencefalomalácia em ovinos. In: Anais do 5^o Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, Recife. **Anais**.Recife: 2003.

NAVARRO, D.; ZWINGMANN, C.; HAZELL, A. S.; BUTTERWORTH, R. F. Brain lactate synthesis in thiamine deficiency: A re-evaluation using 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1–2, p. 33–41, jan. 2005.

NOGUEIRA, A. P. A. et al. Polioencefalomalacia experimental induzida por amprólio em bovinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 631–636, 2010.

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

ORLATO, D. Efeitos do DMSO (dimetilsulfóxido), administrado por via intravenosa, sobre as funções renal e hepática, perfil hidrossalino e hemograma de cães sadios. 2006. **Universidade Estadual Paulista**, 2006.

PARK, L. C. H. et al. Metabolic Impairment Induces Oxidative Stress, Compromises Inflammatory Responses, and Inactivates a Key Mitochondrial Enzyme in Microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 5, p. 1948–1958, maio 1999.

PEKOVICH, S. R.; MARTIN, P. R.; SINGLETON, C. K. Thiamine Deficiency Decreases Steady-State Transketolase and Pyruvate Dehydrogenase but not α -Ketoglutarate Dehydrogenase mRNA Levels in Three Human Cell Types. **J. Nutr.**, v. 128, n. September 1997, p. 683–687, 1998.

PEREIRA, L. M. et al. Amprolium-induced thiamine deficiency in mice: evaluation of a practical model by oral administration. **Acta Veterinaria Brasilica**, p. in press, 2017.

PIRES, R. G. W. et al. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rat's open-field performance impairment. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 70, p. 227–235, 2001.

PORTARI, G. V. et al. Protective effect of treatment with thiamine or benfotiamine on liver oxidative damage in rat model of acute ethanol intoxication. **Life sciences**, v. 162, p. 21–24, 2016.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. v. 3, p. 33, 2003.

PURISCO, E. **Ocorrência de polioencefalomalacia em bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul**. 1982. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 1982.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Emerging role of thiamine therapy for prevention and treatment of early-stage diabetic nephropathy. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 13, n. 7, p. 577–83, 2011.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C. C. . H. K. C. **Veterinary Medicine**. [s.l: s.n.]

RAMA RAO, K. V. et al. Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. **Glia**, v. 58, n. 12, p. 1490–1499, set. 2010.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939–1951, 1993.

RINDI, G. L. U. Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. **Proc Soc Exp BiolMed**, v. 224, p. 246–255, 2000.

RINDI, G.; PATRINI, C.; NAUTI, A.; BELLAZZI, R.; MAGNI, P. Three thiamine analogues differently alter thiamine transport and metabolism in nervous tissue: An in vivo kinetic study using rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 18, n. 4, p. 245–263, 2003.

ROSENBAUM, E.; HERSCHLER, R.; JACOB, S. Dimethyl sulfoxide in

musculoskeletal disorders. **Journal of the American Medical Association**, v. 192, p. 309–313, 1965.

ROTH, J. Are There Common Biochemical and Molecular Mechanisms Controlling Manganism and Parkinsonism. **NeuroMolecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 281–296, 2009.

SALINSKA, E.; STAFIEJ, A. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release. **Neurochem. Int.**, v. 43, p. 469–474, 2003.

SANT'ANA, F. J. F. et al. Polioencefalomalacia experimental induzida por amprólio em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 747–752, set. 2009a.

SANT'ANA, F. J. F. et al. Polioencefalomalacia em bovinos: Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões no encéfalo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 487–497, 2009b.

SANT'ANA, F. J. F. et al. Polioencefalomalacia em ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 681–694, set. 2009c.

SANTOS, M. N.; JARDIM FILHO, J. O.; GRANDO, F. A. Polioencefalomalacia em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 37–39, 1983.

SANTOS, N. C. et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035–1041, 2003.

SCARRAT, W.K.; COLLIN, T.J. E SPONENBERG, D. Water deprivation-sodium chloride intoxication in a group of feeder lambs. **J.Am.Vet.Med.Assoc**, v. 186, p. 977–978, 1985.

SCHENK, U. et al. A Novel Pathway for Presynaptic Mitogen-Activated Kinase Activation via AMPA Receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 7, p. 1654–1663, fev. 2005.

SCHILD, A.L.; FERREIRA, J.L.M; SOARES, M. P. Polioencefalomacia em bovinos. p. 32–34, 2005.

SCHLAFER, M.; KANE, P.; KIRSCH, M. Effects of dimethyl sulfoxide on the globally

ischemic heart: possible general relevance to hypothermic organ preservation. .
Cryobiology, v. 19, p. 61–69, 1982.

SCOTT, J. et al. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Jornal of the American Oil Chemist's Society**, v. 51, p. 200–203, 1974.

SHELINE, C.T.; WEI, L. Free radical-mediated neurotoxicity may be caused by inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. **Neuroscience**, v. 140, n. 1, p. 235–46, jun. 2006.

SHEU, K.-F. R. et al. Immunochemical Characterization of the Deficiency of the α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex in Thiamine-Deficient Rat Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 3, p. 1143–1150, 1998.

SHIMIZU, S.; SIMON, R.; GRAHAM, S. Dimethylsulfoxide(DMSO)treatmentreduces infarction volume after permanent focal cerebral ischemia in rats. **Neurosci Lett**, v. 239, p. 125–127, 1997.

SMITH, E.; HADIDIAN, Z.; MASON, M. The single and repeated dose toxicity of dimethyl sulfoxide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 141, p. 96–109, 1967.

STONE, R. Clinical uptates on the use of dimethyl silfoxide. **Canine Practice**, v. 18, p. 16–19, 1993.

SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. **Neuroscience**, v. 138, p. 1055–1065, 2006.

SUZUKI, K. et al. High-dose thiamine prevents brain lesions and prolongs survival of Slc19a3 -deficient mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0180279, 2017.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 173–83, 2004.

THOMSON, A.D. et al. Wernicke's encephalopathy revisited: translation of the case history section of the original manuscript by Carl Wernicke "Lehrbuch der Gehirnkrankheiten fur Aerzte and Studirednd". **Alcohol and Alcoholism**, v. 43, p. 174–179, 2008.

TODD, K.; BUTTERWORTH, R. F. Mechanisms of selective neuronal cell death due

to thiamine deficiency. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 893, n. 1, p. 404–411, 1999.

TODD, K. G.; BUTTERWORTH, R. F. Evaluation of the Role of NMDA-Mediated Excitotoxicity in the Selective Neuronal Loss in Experimental Wernicke Encephalopathy. **Experimental Neurology**, v. 149, n. 1, p. 130–138, jan. 1998.

TSVYETLYNSKA, N. A. et al. Role of AMPA Receptor Desensitization and the Side Effects of a DMSO Vehicle on Reticulospinal EPSPs and Locomotor Activity. p. 3951–3960, 2005.

UUSISAARI, M.; OBATA, K.; KNÖPFEL, T. Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 1, p. 901–11, jan. 2007.

VEMUGANTI, R. et al. Gene expression changes in thalamus and inferior colliculus associated with inflammation, cellular stress, metabolism and structural damage in thiamine deficiency. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 5, p. 1172–1188, 2006.

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

VICTOR, M.; ADAMS, R. D.; COLLINS, G. The Wernicke-Korsakoff syndrome. A clinical and pathological study of 245 patients, 82 with post-mortem examinations. **Contemp. Neurol. Ser.**, v. 7, p. 1–206, 1971.

VIEIRA, A.C.S. et al. Estudo epidemiológico, clínico e patológico em ruminantes com polioencefalomalacia no agreste meridional de Pernambuco. **Rev. Bras. Med. Vet.**, p. 65–68, 2007.

VIEIRA, A. C. S. et al. Estudo epidemiológico, clínico e patológico em ruminantes com polioencefalomalacia no agreste meridional de Pernambuco. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, p. 65–68, 2007.

WAETZIG, V.; HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1–3, p. 64–7, 2004.

WANG, J.-Z.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Kinases and phosphatases and tau

sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. **The European journal of neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 59–68, jan. 2007.

WANG, J. J. et al. JNK1 is inactivated during thiamine deficiency-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 4, p. 208–15, 2000.

WANG, X. et al. Thiamine deficiency induces endoplasmic reticulum stress in neurons. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 1045–56, fev. 2007.

WATKINS, J. C.; JANE, D. E. The glutamate story. **British Journal of Pharmacology**, p. 122–130, 2006.

WAYMAN, G. et al. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. **Neuron**, v. 50, n. 6, p. 897–909, jun. 2006.

WELLS, G. H. et al. A novel progressive spongiforme encephalopathy in cattle. **Veterinary Record**, v. 121, p. 419–420, 1987.

WONG, L. K.; REINERTSON, E. L. Clinical considerations of dimethylsulfoxide. Iowa State University Veterinarian. **Des Moines**, v. 46, p. 89–95, 1984.

WU, T.-W. et al. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. **Biochemical Cell Biology**, v. 68, p. 1189–1194, 1990.

XU, B.; XU, Z.-F.; DENG, Y. Protective effects of MK-801 on manganese-induced glutamate metabolism disorder in rat striatum. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 4, p. 381–390, 2010.

ZACHARY, J. F. Sistema nervoso. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Ed.). **Bases da Patologia em Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 833–972.

ZEPEDA, R. et al. Glutamate-Dependent Transcriptional Regulation in Bergmann Glia Cells: Involvement of p38 MAP Kinase. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 7, p. 1277–1285, 2008.

ZHANG, S. X. et al. Excitotoxic Cytopathology, Progression, and Reversibility of Thiamine Deficiency-induced Diencephalic Lesions. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 54, n. 2, p. 255–267, mar. 1995.

ZHANG, Y. et al. Intracellular zinc release and ERK phosphorylation are required upstream of 12-lipoxygenase activation in peroxynitrite toxicity to mature rat oligodendrocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 14, p. 9460–70, abr. 2006.

APÊNDICE A – PERSPECTIVAS FUTURAS

TRABALHOS EM ANDAMENTO PARA CONCLUSÃO DOS ESTUDOS PRELIMINARES DO PROJETO

A proposta fundamental deste projeto vislumbra a elucidação dos mecanismos moleculares dos processos neurodegenerativos associados à deficiência de tiamina (DT). Neste aspecto, o foco principal é a investigação do envolvimento de vias de sinalização intracelular na patogênese dos distúrbios causados pela DT, e sua correlação com o possível desencadeamento de estresse oxidativo e inflamação.

Os mecanismos celulares precisos associados à neurodegeneração causada pela DT são desconhecidos até o momento. Particularmente, muito pouco se sabe sobre a modulação de vias de sinalização, provavelmente responsáveis em induzir os processos de morte celular. A grande maioria dos poucos estudos na área, demonstra o envolvimento de algumas vias enzimáticas na DT em modelos *in vitro*, com culturas de células.

Assim, objetivamos demonstrar a possível modulação das vias das MAPKs em modelos *in vivo* de DT. Porém, diversos percalços não permitiram a realização destes estudos a tempo para ser incluídos nesta dissertação. Contudo, estas análises continuam em andamento em nosso Laboratório, e devem fazer parte das publicações, em um futuro próximo:

- Avaliação da modulação de ERK1/2 e de p38^{MAPK} em diferentes regiões do sistema nervoso central dos camundongos expostos ao modelo de DT induzida por amprólio;
- Avaliação da expressão de heme oxigenase-1 (HO-1, marcador de estresse oxidativo) no modelo de DT com amprólio;

- Avaliação da possível modulação das MAPKs (ERK1/2 e p38^{MAPK}) e da expressão de HO-1, via mecanismos de estresse oxidativo e/ou inflamação, através do uso de antioxidantes e anti-inflamatórios (Trolox[®] e DMSO).