

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA HUMANA**

**RUAN CARLOS MACÊDO DE MORAES**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE BENFOTIAMINA, UM ANÁLOGO  
SINTÉTICO DA VITAMINA B1, SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO  
NEURONAL E PROGRESSÃO DA NEURODEGENERAÇÃO EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.*

**RUAN CARLOS MACÊDO DE MORAES**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE BENFOTIAMINA, UM ANÁLOGO  
SINTÉTICO DA VITAMINA B1, SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO  
NEURONAL E PROGRESSÃO DA NEURODEGENERAÇÃO EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.*

*Área de concentração: Fisiologia Humana*

*Orientadora: Profª Dra. Andréa da Silva Torrão*

*Versão original*

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Moraes, Ruan Carlos Macêdo de  
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE BENFOTIAMINA, UM  
ANÁLOGO SINTÉTICO DA VITAMINA B1, SOBRE O  
METABOLISMO ENERGÉTICO NEURONAL E PROGRESSÃO DA  
NEURODEGENERAÇÃO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE  
DOENÇA DE ALZHEIMER / Ruan Carlos Macêdo de Moraes;  
orientadora Andréa da Silva Torrão. -- São Paulo,  
2020.

103 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Doença de Alzheimer. 2. Benfotiamina. 3.  
Metabolismo. 4. Neurodegeneração. I. Torrão, Andréa  
da Silva, orientador. II. Título.

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Efeitos da suplementação de Benfotiamina, um análogo sintético da vitamina B1, sobre o metabolismo energético neuronal e progressão da neurodegeneração em um modelo experimental de doença de Alzheimer*", registrado sob o protocolo nº **23/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **14/05/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Andréa da Silva Torrão**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Ruan Carlos Macedo de Moraes (Pós-graduando), Andressa Pereira Costa (Técnica de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/index.php?option=com\\_content&view=article&id=702](http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/index.php?option=com_content&view=article&id=702). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Effects of Benfotiamine supplementation, a synthetic analogue of vitamin B1, on energy metabolism and neuronal progression of neurodegeneration in an experimental model of Alzheimer's disease*", protocol nº **23/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **5/14/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Andréa da Silva Torrão**


- Team members: *Ruan Carlos Macedo de Moraes (Graduate Student), Andressa Pereira Costa (Laboratory Technician)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Macho/Male	350 g	200

São Paulo, 17 de maio de 2016.

  
Prof. Dra. Luciane Valéria Sita  
Vice-coordenadora CEUA-ICB/USP

  
Prof. Dr. Francimilson Goulart da Silva  
Vice-secretária CEUA-ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

*À minha avó, dona Maria de Jesus (inmemoriam), que foi levada  
aos poucos pela Doença de Alzheimer, e esqueceu-se de se despedir*

## Agradecimentos

À minha orientadora Andréa Torrão, que desde o início acreditou no meu potencial, na minha ideia, e fomentou meu crescimento como cientista, me apoiando e me incentivando em minhas decisões, como todo bom orientador deveria fazer. Aprimorei com sua ajuda não apenas meus conceitos de ciência, mas de ética, moral, respeito e profissionalismo. Agradeço à Universidade de São Paulo, que contribuiu de maneira marcante no meu senso crítico, político e de coletividade, nas minhas habilidades técnicas, profissionais e interpessoais. Com certeza minha vivência na USP me moldou um cidadão mais consciente do poder que tenho agora em minhas mãos para mudar a realidade de quem financia meu trabalho.

À Andressa Costa, por todo o apoio técnico provido para que eu faça pesquisa de qualidade, e também pelos puxões de orelha quando me faltava atenção. Com ela aprendi a cuidar do laboratório com muito mais responsabilidade. Agradeço também a todos os colegas de laboratório que tive ao longo desta jornada. À Fernanda Crunfli, Fernanda Prieto e Talita Vrechi por me receberem no laboratório e compartilharem suas experiências comigo. À Gabriely e à Daniela por me ajudarem durante o ano mais produtivo do meu doutorado, e à Giovanna, Paulina, Yandara e Camila, por me receberem de volta calorosamente após mais de um ano de ausência, e por confiarem em mim e no meu apoio para começarem suas próprias jornadas.

À amizade dos nossos vizinhos, que fazem a jornada ser bem mais leve e feliz. Não conseguiria cumprir minhas missões sem tantos cafés na companhia da Monique Singulani, do José Francis, do Roberto e dos almoços no bandejão com o pessoal do LabCachexia.

Ao povo brasileiro que, através da CAPES e do CNPq, financia a ciência nacional e usufrui, merecedoramente, dos frutos de nosso trabalho. Esta tese é fruto de um esforço não só meu, mas de milhões de brasileiros que creditam em nós, cientistas, a habilidade de transformar o futuro de todos. Nesta tese, deposito todo o meu reconhecimento e gratidão por tudo que em mim foi investido até agora, e o compromisso de sempre valorizar o investimento que nos permite fazer ciência de qualidade em uma universidade pública.

À minha mãe Maria de Nazaré, e meus irmãos Rodrigo e Rafael, que sempre me financiaram em momentos difíceis, me apoiaram em minhas decisões, torceram por minha carreira científica e entenderam minha ausência nos momentos de tristeza e felicidade em família que abdiquei em nome de meu sonho de ser cientista. O primeiro doutor na história da família.

Agradeço ao meu amigo Thiago Botelho, que em um período de incertezas quanto à disponibilidade de bolsas, mobilizou secretamente uma campanha de crowdfunding para me manter em São Paulo mesmo sem bolsa e conseguir ficar o tempo necessário até a concessão de minha bolsa de estudos. Eu sempre soube que poderia contar com ele em momentos difíceis, mas este em específico ficará guardado em um lugar especial de minha memória.

Agradeço aos professores Alex Ferraz e Guilherme Portari, que mesmo em meio à falta de recursos físicos adequados, me proporcionaram uma grande formação

científica que posso disfrutar como um diferencial em minha carreira. Com certeza a sorte de encontra-los por acaso pelos corredores da UFPI e da UFTM me trouxeram até onde estou.

Ich bedanke mich bei Professor André Kleinridders und bei der Forschungsgruppe Zentrale Regulation des Stoffwechsels (CRM) für die Begrüßung am Deutschen Institut für Ernährungsforschung und all das, was ich gelernt habe. Ich bedanke mich für die arbeitsintensiven und lehrreichen Tage, die wir zum Feierabend mit Bier und Capirinha begossen haben. Ich bedanke mich auch bei Berit, Johanna, Tanina und Frederike, die meine Arbeit im Labor viel lustiger und familiärer gestaltet haben. Je remercie également Antoine Leboucher, qui a contribué à ce que je ne me sente pas loin de chez moi dans ces moments agréables à Berlin. Vous êtes un grand ami que j'ai eu la chance de rencontrer.



O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo nº 168466/2017-1 e do Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo nº 2017/10801-1.

*Uma chama não perde nada  
ao acender outra chama*

– PROVÉRBIOS AFRICANOS

## RESUMO

MORAES, R. C. M. **Efeitos da suplementação de benfotiamina, um análogo sintético da vitamina b1, sobre o metabolismo energético neuronal e progressão da neurodegeneração em um modelo experimental de doença de Alzheimer.** 2020. 102 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Estudos sugerem que distúrbios no metabolismo energético e na sinalização da insulina cerebral estão associados com a progressão da doença de Alzheimer (DA) e o déficit cognitivo. A tiamina é um co-fator enzimático limitante para a atividade das piruvato e alfa-cetoglutarato desidrogenases, sendo ambas críticas para a eficiência do metabolismo de glicose na mitocôndria. Na DA, estas enzimas têm sua atividade reduzida. Nesse sentido, a utilização de Benfotiamina (BFT), um composto capaz de aumentar a disponibilidade de tiamina no cérebro tem-se mostrado uma potencial alternativa de tratamento da DA, podendo melhorar o metabolismo de glicose e atividade mitocondrial. Estudos recentes também sugerem que a benfotiamina está associada a melhoras em proteínas da via de sinalização de insulina. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da benfotiamina nas alterações comportamentais, na função mitocondrial e na sinalização de insulina em um modelo experimental de AD induzido por estreptozotocina (STZ). Para tal, induzimos ratos wistar a um modelo experimental de DA por injeção intracerebroventricular (ICV) de STZ e tratamos por 30 dias com Benfotiamina, dividindo em quatro grupos: animais que receberam citrato de sódio ICV (veículo) tratados com carboximetilcelulose (CMC, veículo) (Controle = CTL); animais que receberam STZ ICV tratados com CMC (STZ); animais que receberam citrato de sódio ICV tratados com BFT (CTLB); animais que receberam STZ ICV tratados com Benfotiamina (STZB). Após o período de suplementação, foi coletado no cérebro o hipocampo, córtex entorrinal e hipotálamo, para dosagem de tiamina, expressão proteica das proteínas relacionadas à sinalização de insulina, transporte de tiamina, astrogliose, e apoptose. Além disso, avaliamos a atividade hipocampal de piruvato desidrogenase e citocromo c oxidase. Em um segundo experimento, avaliamos os efeitos da STZ ICV e do tratamento com BFT no metabolismo, e as alterações provocadas pela STZ no metabolismo celular de uma cultura de neurônios hipotalâmicos. Os resultados demonstraram que apesar de não haver uma diminuição marcante da quantidade de tiamina e seus metabólitos no grupo STZ, observou-se aumentos no córtex entorrinal e no hipocampo do grupo CTLB e no hipocampo do grupo STZB, provocados pela suplementação de benfotiamina. O tratamento também foi capaz de melhorar as alterações na via de sinalização de insulina resultantes da injeção de STZ, além de diminuir marcadores de inflamação e resultar em uma reversão dos distúrbios observados nos testes comportamentais. Além de melhoras cognitivas, a BFT também foi capaz de provocar melhoras metabólicas no modelo experimental. Estes resultados foram complementados com estudos *in vitro*, que mostraram um aumento da sensibilidade à insulina e melhora na respiração mitocondrial em neurônios hipotalâmicos quando submetidos à toxicidade da STZ na presença de benfotiamina. Os dados demonstram que o tratamento com benfotiamina melhora a capacidade de absorção de tiamina, alterando não só a atividade mitocondrial, mas também resultando em efeitos na sinalização de insulina, revertendo o déficit cognitivo no modelo experimental proposto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tiamina, Estreptozotocina, doenças neurodegenerativas.

## ABSTRACT

MORAES, R. C. M. **Effects of supplementation with benfotiamine, a synthetic analog of vitamin b1, on neuronal energy metabolism and progression of neurodegeneration in an experimental model of Alzheimer's disease.** 2020. 102 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Studies suggest that disturbances in energy metabolism and cerebral insulin signaling are associated with the progression of Alzheimer's disease (AD) and with cognitive deficit. Thiamine is a limiting enzyme cofactor for the activity of pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenases, both of which are critical for the efficiency in glucose metabolism in the mitochondria. In AD, these enzymes have reduced activity. In this sense, the use of benfotiamine (BFT), a compound capable of increasing the availability of thiamine in the brain has been shown to be a potential alternative for the treatment of AD by improving glucose metabolism and mitochondrial activity. Recent studies also suggest that the use of BFT is associated with improvements in proteins of the insulin signaling pathway. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of benfotiamine on behavioral changes, mitochondrial function and insulin signaling in an streptozotocin-induced experimental model of AD. For this, heterogeneous wistar rats were used, induced to an experimental model of AD by intracerebroventricular (ICV) injection of STZ and treatment for 30 days with BFT, divided into four groups: animals that received ICV sodium citrate (vehicle) treated with carboxymethylcellulose (vehicle) (Control = CTL); animals that received STZ ICV treated with carboxymethylcellulose (STZ); animals receiving ICV sodium citrate treated with BFT (CTLB); animals receiving STZ ICV treated with BFT (STZB). After the supplementation period, the animals were euthanized and the hippocampus, entorhinal cortex and hypothalamus were collected for brain thiamine measurement, protein expression of proteins related to the insulin signaling pathway, thiamine transport, astrogliosis, and apoptosis. In addition, the hippocampal activity of pyruvate dehydrogenase and cytochrome c oxidase was evaluated. In a second experiment, we evaluated the effects of STZ, and the treatment with BFT on the metabolism of animals, and the changes caused by STZ in aspects related to the cellular metabolism of an in vitro culture of hypothalamic neurons. The results showed that although there was no marked decrease in the amount of thiamine and its phosphate esters in the STZ group, there were increases in the entorhinal cortex and hippocampus in the CTLB group and in the hippocampus in the STZB group, caused by benfotiamine supplementation. The treatment was also able to improve the changes in proteins of the insulin signaling pathway resulting from the injection of STZ, in addition to decreasing inflammation markers and resulting in a reversal of the disorders observed in the behavioral tests. In addition to cognitive improvements, BFT was also able to cause metabolic improvements in the experimental model. These results were complemented by in vitro studies, which showed an increase in insulin sensitivity and improvement in mitochondrial respiration in neurons when subjected to STZ toxicity in the presence of benfotiamine. The data demonstrate that treatment with benfotiamine improves the absorption capacity of thiamine, altering not only mitochondrial activity, but also resulting in effects on insulin signaling, reversing the cognitive deficit in the proposed experimental model.

**KEYWORDS:** Thiamine, Streptozotocin, neurodegenerative diseases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DA TIAMINA (C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS) .....	24
FIGURA 2. EXPRESSÃO GÊNICA CEREBRAL EM DIFERENTES TIPOS CELULARES DOS TRANSPORTADORES DE TIAMINA THTR-1 (A) E THTR-2 (B), FONTE: MAPA INTERATIVO <i>TABULA MURIS</i> (HTTPS://TABULA-MURIS.DS.CZBIOHUB.ORG/). (C) CORTE HISTOLÓGICO MOSTRANDO A EXPRESSÃO GÊNICA DE THTR-1, AS SETAS EVIDENCIAM A EXPRESSÃO NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, HIPOCAMPO E HIPOTÁLAMO, FONTE: <i>ALLEN MOUSE BRAIN MAP</i> (HTTP://MOUSE.BRAIN-MAP.ORG/GENE/SHOW/78221). .....	26
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DA S-BENZOILTAMINA O-MONOFOSFATO (C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> PS). FONTE: PUBCHEM.NCBI.NLM.NIH.GOV (CID: 3032771).....	28
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL. ....	35
FIGURA 5. LINHA DO TEMPO UTILIZADA PARA ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS CLU183 (A) EXPOSTAS A ESTREPTOZOTOCINA E/OU BENFOTIAMINA EM MEIO DE CULTURA SEM TIAMINA E (B) ESTIMULADAS COM TIAMINA POR 2H, 4H E 6H APÓS 24H DE EXPOSIÇÃO À STZ. ....	44
FIGURA 6. LINHA DO TEMPO UTILIZADA PARA ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS CLU183 EXPOSTAS A ESTREPTOZOTOCINA E/OU BENFOTIAMINA E ESTIMULADAS COM INSULINA POR 5 MINUTOS.....	46
FIGURA 7. ESQUEMATIZAÇÃO DO EXPERIMENTO DE MITOSTRESS PARA ANÁLISE DE RESPIRAÇÃO CELULAR EM UM APARELHO SEAHORSE. ....	49
FIGURA 8. NÍVEIS SANGUÍNEOS DE (A) TIAMINA, (B) TIAMINA MONOFOSFATO E (C) TIAMINA DIFOSFATO MEDIDOS EM SANGUE TOTAL ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HPLC, NORMALIZADOS PELOS NÍVEIS TOTAIS DE HEMOGLOBINA E NÍVEIS SÉRICOS DE (D) FOLATO (VITAMINA B9) E (E) COBALAMINA (VITAMINA B12) .....	52
FIGURA 9. QUANTIFICAÇÃO DE TIAMINA, TIAMINA MONOFOSFATO (TMP), E TIAMINA DIFOSFATO (TDP) NO HIPOCAMPO E NO CÓRTEX ENTORRINAL ANALISADOS POR TÉCNICA DE HPLC .....	53
FIGURA 10. EXPRESSÃO DE MRNA E PROTEÍNA DO TRANSPORTADOR DE TIAMINA THTR-1 (SLC19A2) NO HIPOCAMPO E NO CÓRTEX ENTORRINAL .....	54
FIGURA 11. EXPRESSÃO DE MRNA DO TRANSPORTADOR DE TIAMINA TRIFOSFATO MTPPTR (SLC25A19) NO HIPOCAMPO E NO CÓRTEX ENTORRINAL. ....	55
FIGURA 12. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PIRUVATO DESIDROGENASE (PDH) NO HIPOCAMPO (A) E AUMENTO TEMPORAL DAS CONCENTRAÇÕES DE NADH (B) OBSERVADOS ATRAVÉS DE ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA. ....	56
FIGURA 13. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CITOCROMO C OXIDASE (COX IV) NO HIPOCAMPO (A) E OXIDAÇÃO DE CITOCROMO C REDUZIDO DETERMINADA COLORIMETRICAMENTE PELA ALTERAÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 550NM (B) OBSERVADOS ATRAVÉS DE ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA. ....	56
FIGURA 14. ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO BASEADO NO TEMPO DE EXPLORAÇÃO DE OBJETOS DURANTE O TESTE DE (A) MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO, UMA HORA APÓS A PRIMEIRA EXPOSIÇÃO AOS OBJETOS E (B) LONGA DURAÇÃO, 24 HORAS APÓS PRIMEIRA EXPOSIÇÃO AOS OBJETOS. ....	57
FIGURA 15. EXPRESSÃO PROTEICA DO CANAL DE CÁLCIO NMDA SUBUNIDADE 2B (GLUN2B) DETECTADA POR IMMUNOBLOTTING NO CÓRTEX ENTORRINAL (A) E NO HIPOCAMPO (B).....	58
FIGURA 16. ANÁLISE DE CAMPO ABERTO, CONTENDO AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE ELEVAÇÕES (A), DA MUDANÇA DE QUADRANTES (B) E DO TEMPO NA PERIFERIA DO CAMPO (C) .....	59
FIGURA 17. PROTEÍNAS RELACIONADAS À VIA DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA NO HIPOCAMPO DETECTADO POR IMMUNOBLOTTING. CONTEÚDO TOTAL DE RECEPTOR DE INSULINA (A) E DE RECEPTOR DE INSULINA FOSFORILADO EM TIROSINA 1150 E 1151 (B); PI3K TOTAL (C); AKT FOSFORILADA EM SERINA 473, ERK FOSFORILADA EM TREONINA 202 E TIROSINA 204; GSK-3 FOSFORILADA EM SERINA 21 E 9. .	60
FIGURA 18. PROTEÍNAS RELACIONADAS À VIA DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA NO CÓRTEX ENTORRINAL, DETECTADO POR IMMUNOBLOTTING. CONTEÚDO TOTAL DE RECEPTOR DE INSULINA (A); PI3K TOTAL (B); AKT FOSFORILADA EM SERINA 473 (C); GSK-3 FOSFORILADA EM SERINA 21 E 9 (D); ERK FOSFORILADA EM TREONINA 202 E TIROSINA 204 (E) .....	61
FIGURA 19. EXPRESSÃO GÊNICA DE GLUT'S 1 E 2 NO HIPOCAMPO E NO CÓRTEX ENTORRINAL APÓS INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA E/OU TRINTA DIAS DE SUPLEMENTAÇÃO COM BENFOTIAMINA. ....	62
FIGURA 20. QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DETECTADO POR IMMUNOBLOTTING (A) DO CONTEÚDO TOTAL DE PROTEÍNA GFAP, (B) DA PROTEÍNA TAU FOSFORILADA EM SERINA 396 E (C) DA RELAÇÃO BCL-2/BAX NO HIPOCAMPO E NO CÓRTEX ENTORRINAL.....	63
FIGURA 21. (A) PESO CORPORAL SEMANAL E (B) GANHO DE PESO [A] = DIF. PARA CTL; [B] = DIF. PARA CTLB; [C] = DIF. PARA STZB COM SIGNIFICÂNCIA P <0,05. (C) ÁREA SOB CURVA DE 30 DIAS DE GANHO DE PESO (UNIDADES ARBITRÁRIAS). ....	64

FIGURA 22. PESO DAS CAMADAS DE GORDURA ABDOMINAL (A) RETROPERITONEAL, (B) MESENTÉRICO, (C) EPIDIDIMAL E (D) A SOMA DOS TRÊS TECIDOS, APRESENTADOS COMO GORDURA VISCERAL. ....	65
FIGURA 23. CONSUMO CUMULATIVO DE ALIMENTOS NA PRIMEIRA SEMANA (A), CONSUMO DIÁRIO DE ALIMENTOS (B), PESO VISCERAL DO DEPÓSITO DE GORDURA 7 DIAS APÓS A CIRURGIA (C) E PESO CORPORAL DIÁRIO (D) NA PRIMEIRA SEMANA APÓS A INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA. ....	66
FIGURA 24. EXPRESSÃO DE MRNA DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE GLUT1 (A) E GLUT2 (B). EXPRESSÃO PROTEICA DO MARCADOR DE ASTRÓCITOS REATIVOS GFAP (C) E DO MARCADOR DE SINALIZAÇÃO APOPTÓTICA PELA RAZÃO BCL-2 / BAX (D). ....	67
FIGURA 25. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA NO HIPOTÁLAMO DETECTADA POR IMMUNOBLOTTING. (A) CONTEÚDO TOTAL DE RECEPTORES DE INSULINA E (B) PI3K TOTAL; (C) AKT FOSFORILADA EM SERINA 473, (D) GSK-3A/B FOSFORILADA EM SERINA 21 E 9; (E) ERK FOSFORILADA EM TREONINA 202 E TIROSINA 204. ....	69
FIGURA 26. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR COM (MTT) APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE (A) STZ E (B) BFT EM CÉLULAS HIPOTALÂMICAS DA LINHAGEM CLU183. ....	70
FIGURA 27. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR COM (MTT) APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO À STZ E/OU BFT EM CÉLULAS NOCAUTE PARA RECEPTOR DE INSULINA (IRKO). ....	71
FIGURA 28. EXPRESSÃO GÊNICA, MOSTRADA COMO $\Delta\Delta Ct^2$ , DO TRANSPORTADOR DE TIAMINA THTR-1 (SLC19A2) E DO TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL DE DIFOSFATO (PIROFOSFATO) DE TIAMINA MTPPTr (SLC25A19) NO HIPOTÁLAMO APÓS EXPOSIÇÃO À ESTREPTOZOTOCINA (STZ) E TRATAMENTO COM BENFOTIAMINA (STZB) OU TIAMINA (STZT). ....	72
FIGURA 29. CONCENTRAÇÕES DE TIAMINA LIVRE, MONOFOSFATO DE TIAMINA (TMP) E DIFOSFATO DE TIAMINA (TDP) APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO À ESTREPTOZOTOCINA E / OU BENFOTIAMINA NA LINHA CELULAR HIPOTALÂMICA CLU183. ....	73
FIGURA 30. CAPTAÇÃO DE TIAMINA, MONOFOSFATO DE TIAMINA (TMP) E DIFOSFATO DE TIAMINA (TDP) APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO À STZ EM UM MEIO DE CULTURA DEFICIENTE EM TIAMINA. OS GRÁFICOS MOSTRAM (A) AS CURVAS DE 1, 2 E 4 HORAS DE SUPLEMENTAÇÃO DE TIAMINA E (B) A ÁREA SOB AS CURVAS DE CADA COMPOSTO DE TIAMINA. ....	73
FIGURA 31. (A) ESTIMULAÇÃO DA INSULINA DAS CÉLULAS CLU183 APÓS 21 H DE EXPOSIÇÃO À TIAMINA E BENFOTIAMINA EM UM MEIO DEFICIENTE EM TIAMINA. (B) PROTEÍNAS CARBONILADAS DETECTADAS POR OXYBLOT APÓS 21 H DE EXPOSIÇÃO À TIAMINA E BENFOTIAMINA EM MEIOS DEFICIENTES EM TIAMINA. ....	74
FIGURA 32 ESTIMULAÇÃO DA INSULINA DAS CÉLULAS CLU183 APÓS EXPOSIÇÃO A STZ E/OU BFT. APÓS A ESTIMULAÇÃO, FOI AVALIADA A FOSFORILAÇÃO DE IRS-1 EM TIROSINA 612 E AKT EM SERINA 473 POR IMMUNOBLOTTING. ....	75
FIGURA 33. EXPRESSÃO DE (A) PROTEÍNA E (B) MRNA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À RESPOSTA AO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO. ....	76
FIGURA 34. (A) MRNA E (B) CONTEÚDO PROTEICO DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO MITOCONDRIAL HSP60 E HSP10 APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO À ESTREPTOZOTOCINA, EM COMBINAÇÃO (STZ + B) OU NÃO (STZ), COM BENFOTIAMINA. ....	77
FIGURA 35. RESPIRAÇÃO MITOCÔNDRIA DE CÉLULAS CLU 183 APÓS EXPOSIÇÃO À ESTREPTOZOTOCINA (STZ) E / OU BENFOTIAMINA (BFT) EM UM MEIO DE CULTURA COM OU SEM TIAMINA. OS PARÂMETROS MEDIDOS SÃO (A) RESPIRAÇÃO BASAL, (B) RESPIRAÇÃO MÁXIMA E (C) PRODUÇÃO DE ATP. ....	79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DETALHAMENTO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NA TÉCNICA DE IMUNODETECÇÃO POR WESTERN BLOT NOS EXPERIMENTOS IN VIVO E IN VITRO.....	36
TABELA 2. GENES DE RATTUS NORVEGICUS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE RT-QPCR, NÚMERO DOS GENES NA PLATAFORMA GENBANK™ ( <a href="http://www.ncbi.nih.gov/gene">HTTP://WWW.NCBI.NIH.GOV/GENE</a> ) E SEQUENCIAS GÊNICAS DE PRIMERS FORWARD E REVERSE DE CADA GENE ESTUDADO. ....	40
TABELA 3. GENES DE MUS MUSCULUS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE RT-QPCR, NÚMERO DOS GENES NA PLATAFORMA GENBANK™ ( <a href="http://www.ncbi.nih.gov/gene">HTTP://WWW.NCBI.NIH.GOV/GENE</a> ) E SEQUENCIAS GÊNICAS DE PRIMERS FORWARD E REVERSE DE CADA GENE ESTUDADO. ....	47

## LISTA DE SÍMBOLOS

- AgRP** – *Agouti-related peptide*, peptídeo relacionado à Agouti
- AKT** – *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*, RAC-alfa serina/treonina-proteína quinase
- AMPK** – *AMP-activated protein kinase*, Proteína quinase ativada por AMP
- AP** – Anteroposterior
- APP** – *Amyloid precursor protein*, proteína precursora amilóide
- ATF4** - *Activating transcription factor 4*, fator de transcrição de ativação 4
- BAX** - *Bcl-2-associated X protein*, proteína X associada a BCL-2
- BCL-2** – *B-cell lymphoma 2*, linfoma 2 de células B
- BFT** – Benfotiamina
- BIP** – *Binding immunoglobulin protein*, Proteína de imunoglobulina de ligação
- CA** – Teste de campo aberto
- cDNA** – *complementary deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico complementar
- CEUA** – Comitê de ética em uso de animais
- CHOP** – *C/EBP homologous protein*, proteína homóloga C/EBP
- CID** – *Compound Identifier*, Identificador do Composto
- CONCEA** – Conselho nacional de controle de experimentação animal
- COXIV** – *Cytochrome c oxidase - complex IV*, Citocromo c oxidase – complexo IV
- CTL** – Controle
- CTLB** – Controle tratado com benfotiamina
- DA** – Doença de Alzheimer
- DIFE** - *Deutsches Institut für Ernährungsforschung*, Instituto Alemão de Nutrição Humana
- DM** – *Diabetes Mellitus*
- DNA** – Deoxyribonucleic acid, Ácido desoxirribonucleico
- DT** – Deficiência de tiamina
- DV** – Dorsoventral
- E** – Eutanásia
- EIF2 $\alpha$**  – *Eukaryotic Initiation Factor 2  $\alpha$* , fator de iniciação eucariótico 2  $\alpha$
- ERK1/2** – *Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2*, quinases reguladas por sinais extracelulares
- EST** – Cirurgia estereotáxica
- F** – Familiarização
- GABA** – *Gamma-AminoButyric Acid*, ácido gama-aminobutírico
- GAPDH** – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GFAP** – *Glial fibrillary acidic protein*, proteína ácida fibrilar glial
- GluN2b** - *N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B*, subtipo 2B do receptor *N*- metil-D-aspartato
- GSK3** – *Glycogen synthase kinase 3*, glicogênio sintase quinase 3
- HPLC** – *High-pressure liquid chromatography*; cromatografia líquida de alta pressão
- HSP** – *Heat Shock Protein*, Proteína de choque térmico
- IGF-1** – *Insulin-like Growth Factor 1*, fator de crescimento semelhante à insulina
- IR** – *Insulin receptor*, receptor de insulina



**IRS-1** – *Insulin Receptor Substrate 1*, substrato 1 do receptor de insulina

**LTP** – *Long-term potentiation*; potenciação de longa duração

**MCD** – Memória de curta duração

**ML** – medio-lateral

**MLD** – Memória de longa duração

**MSR** – *Mitochondria stress response*, resposta mitocondrial ao stress

**mTPPTR** – *Mitochondria thiamine pyrophosphate transporter*; transportador mitocondrial de tiamina pirofosfato

**NADPH** – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido

**NMDA** – *N-methyl D-aspartate*, *N*- metil-D-aspartato

**NOR** – *New object recognition test*; teste de reconhecimento de objeto

**NOX** – NADPH oxidase

**PDH** – Piruvato desidrogenase

**PI3K** – *phosphatidylinositol 3-kinase*, fosfatidilinositol 3-quinase

**RE** – retículo endoplasmático

**RNA** – *Ribonucleic acid*; ácido ribonucleico

**RT-qPCR** – *Real time quantitative polymerase chain reaction*; Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

**SDS-PAGE** – Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

**SPF** – *Specific pathogen-free*; livre de patógenos específicos

**STZ** – Estreptozotocina

**STZB** – submetido à injeção de estreptozotocina e tratado com benfotiamina

**STZ-ICV** – Estreptozotocina Intracerebroventricular

**TBP** – *TATA-box binding protein*, proteína de ligação à caixa TATA

**TDP** – Tiamina difosfato (pirofosfato)

**TH** – *Thiamine Hydrochloride*; Cloridrato de Tiamina

**THTR** – *Thiamine transporter*, transportador de tiamina

**TMP** – Tiamina monofosfato

**XBP1** – *X-box binding protein 1*, proteína 1 de ligação à X-box

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1. Doença de Alzheimer, Sinalização de Insulina e Hipótese Mitocondrial</b> 20	
<b>1.2. Déficits cognitivos e o metabolismo de tiamina</b> .....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>3. OBJETIVO</b> .....	31
<b>3.1. Objetivos Específicos:</b> .....	31
3.1.1 <i>Experimento 1: Efeitos da benfotiamina em aspectos cognitivos relacionados a DA.</i> .....	31
3.1.2 <i>Experimento 2: Efeitos da benfotiamina em aspectos metabólicos relacionados a DA.</i> .....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
<b>4.1. Avaliação dos efeitos da STZ e do tratamento com Benfotiamina em aspectos cognitivos, moleculares e metabólicos in vivo</b> .....	32
<b>4.1.1. Injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ)</b> .....	32
<b>4.1.2. Suplementação com benfotiamina</b> .....	33
<b>4.1.3. Teste comportamental de reconhecimento de objeto novo.</b> .....	33
<b>4.1.4. Delineamento Experimental</b> .....	34
<b>4.1.5. Eutanásia</b> .....	35
4.1.5.1 Coleta dos tecidos adiposos viscerais .....	35
<b>4.1.6. Quantificação do conteúdo proteico no encéfalo por Immunoblotting</b> .....	35
<b>4.1.7. Atividade Enzimática de Piruvato Desidrogenase e Citocromo c Oxidase</b> .....	37
<b>4.1.8. Quantificação de Tiamina e seus Ésteres Fosfatados</b> .....	37
<b>4.1.9. Quantificação de expressão gênica por RT-qPCR no encéfalo</b> .....	38
4.1.9.1. Extração e quantificação de RNA total .....	38
4.1.9.2 Expressão Genica por RT-qPCR em amostra de encéfalo.....	39
<b>4.2. Avaliação dos efeitos da STZ e do tratamento com BFT em neurônios hipotalâmicos da linhagem CLU183</b> .....	42
<b>4.2.1. Análise da influência do receptor de insulina na neuroproteção após exposição à STZ</b> .....	42
4.2.1.1. <i>Nocaute do receptor de insulina</i> .....	42
4.2.1.2. <i>Teste de Viabilidade celular com brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] - MTT</i> .....	43
<b>4.2.2. Análise dos efeitos da STZ na absorção celular de tiamina</b> .....	44

4.2.2.1. Análise da concentração celular de tiamina por HPLC.....	44
<b>4.2.3. Análise de carbonilação proteica por Oxyblot .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.4. Estimulação com Insulina .....</b>	<b>46</b>
4.2.4.1. Estimulação em deficiência de tiamina.....	46
<b>4.2.5. Quantificação de mRNA por RT-qPCR em amostra celular.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.6 Análise de respiração celular através da técnica de Seahorse .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3. Análise Estatística .....</b>	<b>49</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Efeitos da suplementação de tiamina nas alterações metabólicas e cognitivas resultantes da injeção ICV de estreptozotocina. ....</b>	<b>51</b>
5.1.1 <i>A suplementação de Benfotiamina altera as concentrações sanguíneas e teciduais de tiamina e seus ésteres fosfatados.....</i>	<i>51</i>
5.1.2. <i>A suplementação com benfotiamina altera a expressão do transportador de tiamina THTR-1 no Hipocampo e Córtex Entorrinal.....</i>	<i>53</i>
5.1.3. <i>A STZ-ICV diminui a expressão gênica do transportador mitocondrial de tiamina trifosfato.....</i>	<i>54</i>
5.1.4. <i>A suplementação de benfotiamina aumenta a atividade enzimática de piruvato desidrogenase e citocromo c oxidase.....</i>	<i>55</i>
5.1.5 <i>A suplementação de benfotiamina melhora o déficit cognitivo induzido por STZ-ICV. ....</i>	<i>57</i>
5.1.6. <i>STZ-ICV provoca alterações na via de sinalização de insulina no hipocampo e no córtex entorrinal.....</i>	<i>59</i>
5.1.7. <i>A STZ-ICV diminui a expressão gênica de GLUT 1 no hipocampo e no córtex entorrinal .....</i>	<i>61</i>
5.1.8. <i>A benfotiamina reverte parcialmente a modulação de marcadores da progressão da doença de Alzheimer no hipocampo e córtex entorrinal induzidos por STZ-ICV.....</i>	<i>62</i>
5.2.1 <i>A exposição ao STZ-ICV provoca alterações no peso, composição da gordura corporal e comportamento alimentar .....</i>	<i>63</i>
5.2.2. <i>Alterações hipotalâmicas após exposição ao STZ-ICV e tratamento BFT</i>	<i>66</i>
5.2.3. <i>Efeitos do tratamento com STZ e benfotiamina na viabilidade de uma cultura de células neuronais hipotalâmicas.....</i>	<i>69</i>
5.2.4 <i>Influencia do receptor de insulina na toxicidade da estreptozotocina.....</i>	<i>70</i>
5.2.5. <i>A exposição à estreptozotocina perturba a captação neuronal de tiamina</i>	<i>71</i>
5.2.6. <i>A benfotiamina, mas não a tiamina, aumenta a sensibilidade à insulina nos neurônios hipotalâmicos .....</i>	<i>74</i>
5.2.7. <i>Exposição à estreptozotocina leva a uma disfunção da resposta ao estresse do retículo endoplasmático .....</i>	<i>75</i>

5.2.8. <i>A Benfotiamina reverte a diminuição da proteína mitocondrial de choque térmico HSP60 induzida por STZ</i> .....	76
5.2.9. <i>A benfotiamina reverte a disfunção mitocondrial induzida pela estreptozotocina</i> .....	78
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	80
6.1. <i>Efeito da Benfotiamina em aspectos funcionais e moleculares da memória e progressão da Doença de Alzheimer</i> .....	80
6.2. <i>Efeito da benfotiamina em alterações metabólicas e hipotalâmicas resultantes da injeção de STZ intracerebroventricular</i> .....	84
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	89
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90
<b>APÊNDICES</b> .....	100
<b>ANEXOS</b> .....	101

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é um mal crônico e degenerativo que, exponencialmente, cresce entre a população idosa. Estima-se que aproximadamente 24 milhões de pessoas sejam afetadas por demência na atualidade, gerando custos a saúde pública em torno de U\$172 bilhões por ano, sendo a DA sua principal causa. Com o desenvolvimento tecnológico e a concomitante maior expectativa de vida, cerca de 4,6 milhões de novos casos surgem a cada ano e estima-se que estes números dobrem a prevalência da doença a cada 20 anos até 2040 (REITZ; BRAYNE; MAYEUX, 2011).

A histopatologia da DA é caracterizada pelo acúmulo de placas constituídas pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide e de emaranhados neurofibrilares constituídos da proteína tau hiperfosforilada, que resultam na diminuição das sinapses e degeneração neuronal principalmente nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, como o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral (YARDIN, 2007). Apesar das principais teorias sugerirem que o peptídeo  $\beta$ -amiloide (Hipótese amiloide) e alterações neuroquímicas específicas (Hipótese colinérgica) fazem parte da etiologia da DA, diversas outras propostas têm surgido nos últimos anos na tentativa de explicar sua causa e origem, como estresse oxidativo, aumento da atividade de quinases, hiperfosforilação da tau, disfunção mitocondrial, príons, deficiência de fatores tróficos, alterações da homeostasia de  $Ca^{2+}$ , e alterações do metabolismo energético (SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2010).

### 1.1. Doença de Alzheimer, Sinalização de Insulina e Hipótese Mitocondrial

Uma perturbação no metabolismo de glicose, principal fonte de energia do sistema nervoso pode ser a base para muitos distúrbios cerebrais. Um dos primeiros sinais da DA é uma redução no metabolismo da glicose cerebral (MERGENTHALER *et al.*, 2013). Estudos em seres humanos e em modelos animais sugerem que distúrbios no metabolismo da glicose e da sinalização da insulina cerebral estão associados à progressão da DA e aos déficits cognitivos, bem como ao distúrbio no metabolismo da glicose periférica como obesidade ou *diabetes mellitus* (DM) tipo 2 (KAPOGIANNIS; MATTSON, 2011).

Embora até recentemente não se acreditava haver importante função da insulina no cérebro – afinal os transportadores de glicose expressos no mesmo independem de insulina para cumprirem sua função – recentes estudos vêm demonstrando que a função da insulina no encéfalo existe e vai além da simples metabolização de glicose, como é frequentemente relatada na periferia. No encéfalo, a insulina exerce papel trófico, auxiliando no controle do metabolismo celular, do crescimento axonal, promovendo assim neuroplasticidade. Esta função resulta em um melhor controle do metabolismo sistêmico e das habilidades cognitivas (KLEINRIDDERS, 2016; KLEINRIDDERS *et al.*, 2015).

Da mesma forma, em análises *post mortem* de encéfalos humanos, MOLONEY *et al.* (2010) observaram que os pacientes diagnosticados com DA tinham defeitos na expressão de proteínas da via de sinalização de insulina no sistema nervoso, sugerindo que a DA poderia ter relação com a sinalização encefálica de insulina. Confirmando estes achados, TALBOT *et al.* (2012) demonstraram que mesmo quando não é manifestada na periferia, a resistência à insulina pode estar presente no encéfalo de pacientes com DA, e parece ser uma característica inicial e comum da DA, um fenômeno acompanhado pela resistência ao fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1, do inglês *Insulin-like growth factor 1*) e intimamente associado à disfunção do substrato do receptor de insulina (IRS-1, do inglês *Insulin receptor substrate 1*), que é potencialmente desencadeada pelos oligômeros de  $\beta$  amilóide, promovendo o declínio cognitivo. Adicionalmente, essa resistência central parece compartilhar mecanismos e etiologia com a resistência periférica (ARNOLD *et al.*, 2018; KULLMANN *et al.*, 2016). Por exemplo, pacientes com DM apresentam comprometimento cognitivo, especialmente pacientes idosos com DM tipo 2 (BIESSELS; KAPPELLE, 2005). Ainda, assim como em humanos, em modelos experimentais de diabetes a dieta hiperlipídica e com alta glicose também desencadeia resistência à insulina encefálica e déficits cognitivos (KOTHARI *et al.*, 2017).

Evidências fortes sugerem que uma das razões para a neurodegeneração é a perda de capacidade de usar a glicose como fonte de energia (DE FELICE; FERREIRA, 2014; TALBOT *et al.*, 2012; WILLETTE *et al.*, 2015; WILLETTE *et al.*, 2013). Já foi observada uma relação entre a redução progressiva do metabolismo da glicose nos lobos temporal medial, parietotemporal, cingulado posterior e córtices frontais (regiões do cérebro que são afetadas em pacientes com DA) em indivíduos

cognitivamente normais com história materna (mas não paterna) de DA, sugerindo que estes déficits podem estar relacionados com o metabolismo energético mitocondrial (visto que o DNA mitocondrial só é herdado através da mãe) (MOSCONI *et al.*, 2007; MOSCONI *et al.*, 2009). Deste modo, com novas propostas de que a DA pode ter etiologia relacionada com o metabolismo, também tem sido proposta a utilização de drogas comumente utilizadas como tratamento de doenças metabólicas, como a DM, na DA (DE LA MONTE, 2014; YARCHOAN; ARNOLD, 2014).

Neste contexto, tem sido sugerido como modelo experimental de estudo da neurodegeneração semelhante à DA esporádica, a aplicação intracerebroventricular de pequenas doses de estreptozotocina (STZ) (HOYER *et al.*, 2000). Esta droga, amplamente utilizada para induzir DM, quando injetada no encéfalo não leva a alterações sistêmicas do metabolismo da glicose, mas altera o metabolismo da glicose encefálico, levando a alterações moleculares e comportamentais semelhantes às encontradas na DA (BIESSELS; KAPPELLE, 2005; HOYER *et al.*, 2004; LABAK *et al.*, 2010; LESTER-COLL *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2012).

Com a descrição de novas interações celulares relacionados à DA e na tentativa de elucidar novos mecanismos, tem ganhado força a hipótese da cascata mitocondrial, que sugere que a DA possa ser decorrente da perda da função mitocondrial no cérebro. Essa diminuição encontrada no metabolismo da mitocôndria é principalmente caracterizada por uma menor atividade da cadeia transportadora de elétrons, observada pela diminuição da expressão e da atividade das enzimas do complexo citocromo c oxidase, influenciando diretamente no aumento do estresse oxidativo celular e no acúmulo de placas  $\beta$ -amiloides (SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2010; 2014; SWERDLOW; KHAN, 2004; 2009), sugerindo que uma deficiência da entrega de energia para o neurônio possa ser um dos gatilhos para degeneração típica da DA.

Fatores de risco comumente associados com o início da DA, como o nível de atividade física e maus hábitos alimentares, geralmente estão ligados a problemas metabólicos relacionados a defeitos da função mitocondrial, como perda de atividade e capacidade antioxidantes (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; SPARKS *et al.*, 2005). Além da hereditariedade, o surgimento de doenças como dislipidemia, obesidade e diabetes, estão profundamente ligadas ao surgimento de demência em idosos (REITZ; BRAYNE; MAYEUX, 2011). Nesse sentido, já foi demonstrado que a estimulação do metabolismo mitocondrial pode melhorar déficits cognitivos (DU *et al.*, 2015; DU *et al.*,

2014), bem como que anormalidades mitocondriais relacionadas à DA podem ser induzidas pela injeção de STZ intracerebroventricular (CORREIA *et al.*, 2013). Assim, este modelo parece ter características relevantes para o estudo de déficits cognitivos relacionados a disfunção mitocondrial e sinalização de insulina.

## 1.2. Déficits cognitivos e o metabolismo de tiamina

A tiamina, também conhecida como vitamina B1, foi descoberta em 1897 pelo médico holandês Christiaan Eijkman, ao observar que galinhas que comiam arroz polido, desenvolviam uma condição de polineurite semelhante à doença encontrada pelo mesmo em Jakarta e na Indonésia, conhecida como *beribéri*. Ele percebeu também que as galinhas que comiam arroz in natura não desenvolviam esta condição. Eijkman supôs então que algum fator estava presente na casca do arroz, e era perdido no processo de polimento (CARPENTER, 2000). Esta descoberta conferiu a Eijkman o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1929, dividido com Frederick Gowland Hopkins, que identificou a tiamina no leite materno, pela descoberta do primeiro micronutriente essencial para a vida humana. Por sua relação com o funcionamento do sistema nervoso, este composto foi denominado primeiramente como neurina, mas posteriormente alterado para tiamina (*tia* – vindo de tiazol; *mina* – de pirimidina), por ser uma amina quaternária contendo um núcleo de pirimidina ligado a um anel tiazol como estrutura química (Figura 1). Hopkins afirmou que “nenhum animal pode ser mantido vivo por uma mistura de pura proteína, gordura e carboidrato, mesmo que o material inorgânico necessário seja cuidadosamente adicionado, o animal não pode prosperar”. Para ele, ficou claro “que existem muitos fatores menores em todos os alimentos em que o corpo depende”. Ele chamou essas substâncias misteriosas de “fatores acessórios”. O bioquímico polonês Casimir Funk mais tarde introduziu o termo “vitaminas”, hoje comum, na suposição errônea de que quimicamente essas são todas aminas (PENZLIN, 2006).



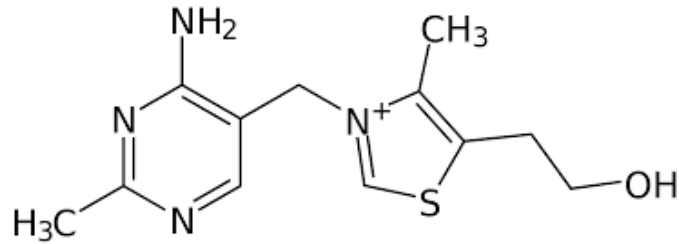


Figura 1. Estrutura química da Tiamina (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>OS)  
 Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (CID: 1130)

A tiamina é um cofator enzimático limitante para a atividade das enzimas piruvato e alfa-cetoglutarato desidrogenases, sendo ambas críticas para a ação do ciclo do ácido cítrico e eficiência no metabolismo de glicose na mitocôndria. Este nutriente também é cofator enzimático da enzima transcetolase, na via das pentoses, sendo assim também um regulador do sistema antioxidante endógeno da célula.

A tiamina é absorvida principalmente na região duodenal do intestino delgado e, por ser um cátion orgânico, necessita de transportadores membranares para ser captada pelas células (RINDI; LAFORENZA, 2000). Apesar de ser o primeiro micronutriente descrito pela ciência, há mais de cem anos, os transportadores membranares de tiamina apenas foram descobertos e caracterizados no final da década de 90, sendo eles o THTR-1 e THTR-2 (DUTTA *et al.*, 1999; EUDY *et al.*, 2000). Por ser um composto hidrofílico dependente dos carreadores para absorção celular, sua disponibilidade é limitada pela quantidade e/ou eficiência destas proteínas carreadoras. No cérebro, também é fator limitante a seletividade da barreira hematoencefálica (VOLVERT *et al.*, 2008). MORRISON e CAMPBELL (1960) demonstraram que, em humanos, uma única dose oral a partir de 2,5 mg de tiamina praticamente não é absorvida, demonstrando que sua absorção é pequena e facilmente saturável.

No cérebro, os transportadores de tiamina têm níveis de expressão variados de acordo com a localização regional e o tipo celular. Avaliando a expressão dos transportadores de tiamina na ferramenta *Tabula Muris* (Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris, 2018), podemos observar que o transportador THTR-2 é majoritariamente expresso em células endoteliais, sendo essencial para o transporte de tiamina entre a barreira hematoencefálica (Figura 2B). Já o transportador THTR-1 está presente nos variados tipos de células cerebrais

(Figura 2A), mas com expressão concentrada regionalmente no bulbo olfatório, córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e medula (Figura 2C).

A deficiência de tiamina (DT) tem uma profunda relação com comprometimentos neuronais, podendo levar ao surgimento de síndromes como beribéri, que compromete principalmente aspectos ligados ao funcionamento do sistema nervoso periférico, levando a perda de sensibilidade e da capacidade motora, e a síndrome de Wernicke-Korsarkoff, que ataca o sistema nervoso central e é caracterizada principalmente por encefalopatia, psicose e perda de memória.

A abundância de transportadores de tiamina parece estar relacionada com a sensibilidade da região às concentrações de tiamina. Em modelos experimentais de DT associada à síndrome de Wernicke-Korsarkoff, foi observado que a DT provoca uma diminuição no metabolismo glutamatérgico no córtex pré-frontal (CARVALHO *et al.*, 2006), além de perda de neurônios e espinhos dendríticos hipocampais (INABA *et al.*, 2016), evidenciando o importante papel da tiamina na formação e consolidação de memória. Também foi demonstrado por LIU, M. *et al.* (2014) que a deficiência de tiamina induz anorexia através da inibição da proteína AMPK – uma importante sinalizadora para ativação do metabolismo de glicose e biogênese mitocondrial – no hipotálamo.

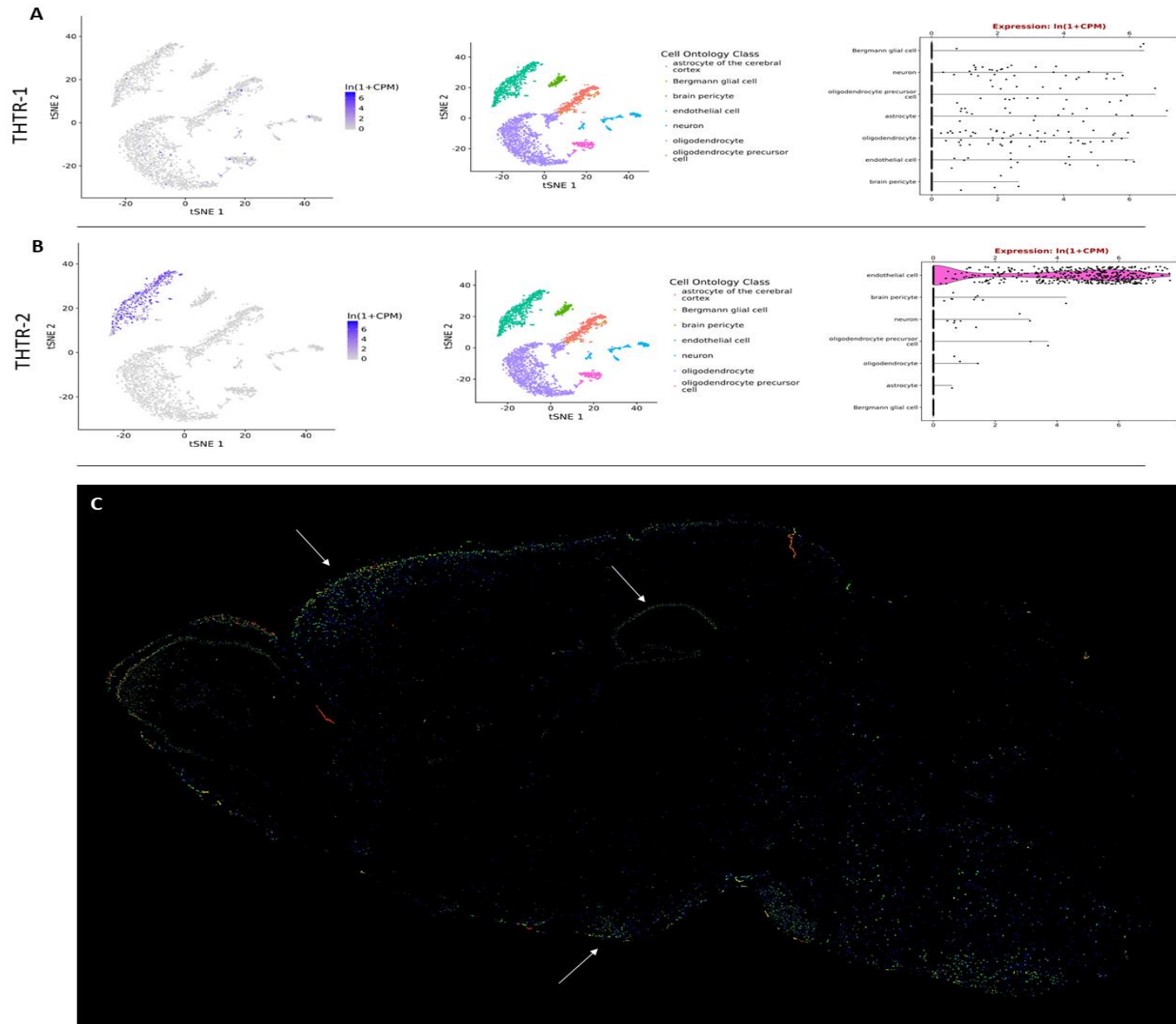


Figura 2. Expressão gênica cerebral em diferentes tipos celulares dos transportadores de tiamina THTR-1 (A) e THTR-2 (B), Fonte: mapa interativo *Tabula Muris* (<https://tabula-muris.ds.czbiohub.org/>). (C) Corte histológico mostrando a expressão gênica de THTR-1, as setas evidenciam a expressão no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo, Fonte: *Allen Mouse Brain Map* (<http://mouse.brain-map.org/gene/show/78221>)

Na DA, assim como em modelos experimentais da DA, tem sido sugerido que a deficiência do metabolismo da tiamina também pode ser responsável pelo aumento da proteína precursora amiloide (APP), da atividade da  $\beta$ -secretase (enzima que participa da via amiloidogênica) e consequente acúmulo de placas amiloides, sugerindo que há uma grande semelhança nos danos causados pela deficiência deste micronutriente e a histopatológica característica da DA (FREDERIKSE; FARNSWORTH; ZIGLER, 1999; ZHANG *et al.*, 2011). GIBSON *et al.* (1988) observaram um decréscimo na atividade dos complexos enzimáticos dependentes de tiamina transcetolase, piruvato desidrogenase e cetoglutarato desidrogenase no cérebro de pacientes com DA, nas mesmas proporções ao decréscimo da atividade de colina-acetiltransferase, marcador da atividade colinérgica. Esses resultados também foram confirmados por BUTTERWORTH e BESNARD (1990), que encontraram atividade enzimática reduzida das enzimas dependentes de tiamina do córtex temporal de pacientes com DA. Também é relatado no modelo experimental de DA esporádica induzido por STZ, uma diminuição da atividade das enzimas dependentes de tiamina, o que sugere uma ligação da atividade destas enzimas com o metabolismo da glicose na DA em humanos (CORREIA *et al.*, 2013). Foi recentemente relatado que há uma deficiência de tiamina difosfato (TDP), a principal forma metabolicamente ativa de tiamina, no sangue de pacientes com DA, em relação à indivíduos da mesma idade e sem comprometimento cognitivo (WANG *et al.*, 2018). Estes dados em conjunto, indicam uma forte ligação do déficit do metabolismo relacionado à tiamina, com o acometimento pela DA.

A causa da diminuição da atividade destas enzimas na DA, assim como alterações nas concentrações sanguíneas de tiamina difosfato (TDP) – a forma metabolicamente ativa da tiamina – é ainda desconhecida. No entanto, uma vez que a demanda energética do cérebro requer uma grande atividade mitocondrial, uma alteração dessa função bioenergética pode, pelo menos em parte, fazer parte da etiologia de doenças neurológicas que comprometem a cognição, como a DA. Tem sido também relatado na literatura a capacidade modulatória da tiamina e das enzimas dependentes desta vitamina na síntese de acetilcolina e manutenção de sinapses colinérgicas (ANZALONE *et al.*, 2010; SZUTOWICZ *et al.*, 2013). Nesse sentido, alguns estudos têm relatado a capacidade da suplementação de tiamina em recuperar os déficits cognitivos, o metabolismo de

glicose encefálico e os níveis de fatores tróficos em humanos e em modelos animais (DIEF; SAMY; DOWEDAR, 2015; GIBSON *et al.*, 2016). Assim, a utilização de um composto capaz de aumentar a disponibilidade de tiamina no cérebro e estimular as enzimas dependentes deste cofator mostra-se como uma potencial alternativa de tratamento da DA através da melhora do metabolismo de glicose e atividade mitocondrial (NGUYỄN, 2011).

A benfotiamina (BFT) – s-benzoiltiamina o-monofosfato – análogo s-acila sintético da Tiamina (Figura 3), tem como característica principal, um anel benzênico, conferindo característica lipossolúvel à esta porção da molécula. Este composto foi sintetizado e caracterizado por WADA *et al.* (1961), que demonstraram também a estabilidade e biodisponibilidade do mesmo sendo administrado por via oral. Após a BFT ser absorvida pela borda em escova da mucosa intestinal, quando é desfosforilada pela enzima ecto-alcalina fosfatase, é convertida em uma molécula lipossolúvel – s-benzoiltiamina – fato que aumenta sua biodisponibilidade em até 10 vezes por atravessar a bicamada lipídica da parede celular sem necessidade de proteína carreadora (VOLVERT *et al.*, 2008).

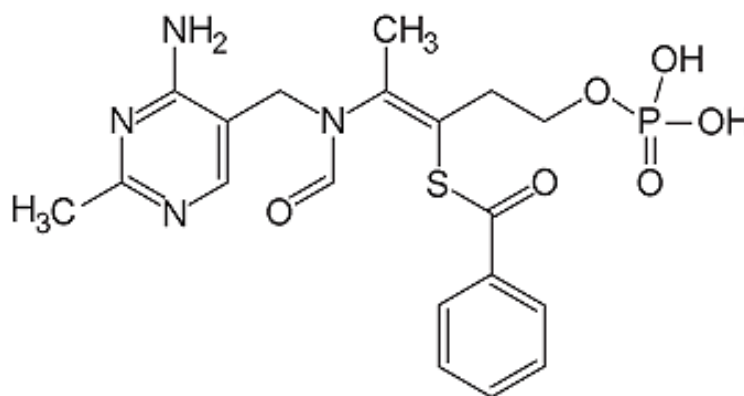


Figura 3. Estrutura química da s-benzoiltiamina o-monofosfato (C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>PS).  
Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (CID: 3032771)

Agindo também como cofator da enzima transcetolase, a tiamina age na via das pentoses, aumentando principalmente a produção de NADPH, influenciando também no sistema antioxidante celular. Ao administrar BFT em cultura de miotubos, além de aumento da produção de NADPH, foi observado também aumento na quantidade total de glicose metabolizada e um efeito

inibidor do gene de NADPH oxidase (NOX) (FRASER *et al.*, 2012), enzima bastante envolvida no desenvolvimento de neurodegeneração ligada à DA (BROWN, 2007; HERNANDES; BRITTO, 2012). A inibição do gene da NOX produziu uma redução de neuropatia em ratos diabéticos, podendo tornar-se também um alvo importante no tratamento de DA esporádica (XU; DAI; DAI, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que além da propriedade de cofator enzimático conferida à tiamina, a benfotiamina parece ter papéis de sinalização não enzimáticos no encéfalo (MKRTCHYAN *et al.*, 2015). Foi observado que a suplementação com BFT parece ser capaz de estimular a via de sinalização da insulina e inibir a atividade da proteína GSK3, importante quinase que pode atuar hiperfosforilando a proteína tau na DA (MARKOVA *et al.*, 2017; PAN *et al.*, 2010). Portanto, apesar de não ter um mecanismo bem elucidado, a tiamina, ou a benfotiamina, parece também ter um papel importante na manutenção da integridade do receptor de insulina ou seus sucessores na via de sinalização.

## 2. JUSTIFICATIVA

Em decorrência do processo de envelhecimento populacional, observa-se um crescimento epidemiológico das doenças neurodegenerativas, como a DA, que representa cerca de 50% dos casos de demência. Apesar dos vários avanços no conhecimento sobre os mecanismos subjacentes aos processos neurodegenerativos e das várias hipóteses sobre os eventos fisiopatológicos envolvidos, os mecanismos exatos ainda não são conhecidos. Deste modo, o entendimento mais aprofundado sobre os mecanismos relacionados a essas doenças e o uso de vias alternativas de tratamento, é de extrema importância. Nesse sentido, nosso grupo tem se dedicado ao estudo dos processos neurodegenerativos com o uso de modelos experimentais tanto *in vivo* como *in vitro* na tentativa de gerar informações que possam colaborar para o desenvolvimento de novas terapias (BATINGA, 2016; CHAVES-KIRSTEN *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2008; CRUNFLI *et al.*, 2018; CRUNFLI *et al.*, 2019; MECHA *et al.*, 2012; PRIETO-ALMEIDA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2012; TORRÃO *et al.*, 2012; VRECHI *et al.*, 2018).

Nossa hipótese é que a suplementação com BFT, no modelo experimental de DA induzido pela injeção intracerebroventricular de STZ, contribui para uma redução na progressão da DA através do aumento da função bioenergética cerebral e da melhora da via de sinalização de insulina, provocando uma concomitante diminuição da inflamação, melhora na transmissão sináptica e manutenção da cognição.

### 3. OBJETIVO

Avaliar os efeitos da suplementação com benfotiamina nas alterações comportamentais, na função mitocondrial e na sinalização de insulina em um modelo experimental de Alzheimer esporádica.

#### 3.1. Objetivos Específicos:

##### 3.1.1 Experimento 1: Efeitos da benfotiamina em aspectos cognitivos relacionados a DA.

- Investigar os efeitos da suplementação na função mitocondrial relacionada ao metabolismo de tiamina.
- Investigar os efeitos da suplementação no desempenho cognitivo e plasticidade neuronal relacionado à memória dos animais.
- Observar os efeitos da suplementação na sinalização de insulina no hipocampo, hipotálamo e córtex entorrinal.
- Analisar os efeitos da suplementação com benfotiamina em marcadores moleculares de DA.

##### 3.1.2 Experimento 2: Efeitos da benfotiamina em aspectos metabólicos relacionados a DA.

- Avaliar a capacidade da benfotiamina de modular alterações metabólicas sistêmicas provocadas pela injeção central de STZ.
- Avaliar os efeitos da benfotiamina na inflamação e apoptose hipotalâmicas provocadas pela injeção de STZ.
- Avaliar em cultura de células hipotalâmicas a capacidade neuroprotetora da Benfotiamina
- Observar o efeito da benfotiamina na sensibilidade à insulina em células neuronais
- Analisar a influência da tiamina e da benfotiamina para o metabolismo energético neuronal em condições de neurodegeneração
- Observar a influência da STZ na expressão gênica dos transportadores de tiamina, nas concentrações neuronais de tiamina e na dinâmica de absorção de tiamina.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Avaliação dos efeitos da STZ e do tratamento com Benfotiamina em aspectos cognitivos, moleculares e metabólicos *in vivo*

Foram utilizados nesse estudo ratos (*Rattus norvegicus*) SPF adultos heterogênicos da linhagem Wistar, pesando em média 350 g, provenientes do Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas, Rede USP de Biotérios. Os animais foram mantidos no Biotério Lor Cury de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica em ciclo claro/escuro artificialmente controlado de 12/12 h em uma sala climatizada a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  com ração padrão e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com certificado aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo nº 023/2016) e normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

#### 4.1.1. Injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ)

O procedimento foi realizado de acordo com trabalho anterior do laboratório (SANTOS *et al.*, 2012), com pequenas modificações. Resumidamente, os animais foram anestesiados com uma dose de Cetamina (90 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg), tiveram os pelos da superfície da cabeça raspados e foram posicionados em um aparelho estereotático (Kopf Instruments, Tujunga, CA, Estados Unidos). Após uma injeção subcutânea de anestésico local Lidocaína (0,2 mL), foi feita uma incisão sagital da linha mediana e o crânio foi exposto. Dois pequenos orifícios bilaterais foram feitos no crânio do animal com uma broca esférica de uso odontológico nas posições correspondentes aos ventrículos laterais: 0,8 mm no eixo ântero-posterior (AP) e 1,4 mm no eixo médio-lateral (ML) em relação ao bregma, e a uma profundidade de 3,4 mm no eixo dorso-ventral (DV) a partir da superfície do encéfalo, de acordo com Paxinos e Watson (2005). Foram utilizadas micropipetas de vidro com pontas entre 10 e 20  $\mu\text{m}$  preenchidas com 4  $\mu\text{L}$  de estreptozotocina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), que foram injetadas em cada ventrículo lateral, totalizando 8

$\mu$ L a 2 mg/kg de peso corporal ou o mesmo volume do veículo (tampão citrato de sódio, 0,05 M, pH 4,5). As doses foram inseridas através dos orifícios na calota craniana e seus conteúdos injetados bilateralmente com o uso de um sistema de injeção por pressão (Parker Picospritzer, Hollis, NH, Estados Unidos).

#### **4.1.2. Suplementação com benfotiamina**

Os animais que receberam o veículo (citrato) e estreptozotocina (STZ) foram então suplementados com uma dose oral diária de 150mg/kg de BFT ou do mesmo volume do veículo (carboximetilcelulose a 2%), por gavagem, no final do período claro dos animais, por um período de 4 semanas e a partir do dia da cirurgia estereotáxica. Foi utilizada uma agulha modelo ponta-bola curva, para evitar danos ao esôfago, e a diluição da BFT no veículo foi ajustada de modo que o volume total administrado fosse equivalente a 1 mL/100g de peso do animal, com base na capacidade do estômago dos animais e a fim de evitar refluxo. Os animais então constituíram os seguintes grupos: animais que receberam citrato tratados com carboximetilcelulose (Controle = CTL); animais que receberam estreptozotocina tratados com carboximetilcelulose (STZ); animais que receberam citrato tratados com BFT (CTLB); animais que receberam estreptozotocina tratados com BFT (STZB).

#### **4.1.3. Teste comportamental de reconhecimento de objeto novo.**

Como forma de avaliar os efeitos da suplementação com BFT sobre as alterações cognitivas, os animais foram submetidos a um teste comportamental simples, denominado teste de reconhecimento de objetos. A tarefa de reconhecimento de objetos é um paradigma de aprendizagem de um julgamento semelhante à tarefa de esquiva passiva, permitindo a avaliação da aquisição, consolidação ou recuperação de informações (objetos) separadamente (BERNABEU *et al.*, 1995; BERNABEU *et al.*, 1996; ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

O teste comportamental foi realizado em uma arena de campo aberto circular (60 cm de diâmetro X 50 cm de altura) durante a última semana de

suplementação (Figura 3). Nos dois dias anteriores ao teste os animais passaram por 3 sessões diárias (com intervalos de 1 hora entre cada uma delas) de habituação na arena por 10 minutos. A primeira sessão de habituação foi utilizada para avaliar o comportamento exploratório do animal em campo aberto. Na sessão de treinamento os animais foram expostos a dois objetos de forma e volume idênticos (A e A'), aguardando-se a exploração dos objetos por 10 minutos. A memória de curta duração (MCD) foi verificada após 1 hora, quando foram apresentados aos animais um dos objetos do treino (A) e um objeto diferente (B). A memória de longa duração (MLD) foi verificada após 24 horas, quando foram apresentados aos animais um dos objetos do treino (A) e um novo objeto (C). Foi considerado como parâmetro de avaliação o tempo de exploração do animal em cada objeto, observado durante 5 minutos, definido como o tempo que o animal cheirar, lambe, tocar o objeto com o focinho ou patas dianteiras, ou quando o animal voltar o focinho ao objeto a uma distância menor ou igual a 1 cm. O índice de reconhecimento foi estabelecido pelo tempo gasto em explorar o novo objeto dividido pela soma dos tempos gastos para explorar o novo objeto e o objeto familiar. Exemplos do experimento podem ser observados segundo o link específico disponibilizado no material em anexo (Apêndice A).

#### **4.1.4. Delineamento Experimental**

Durante o período experimental, os animais tiveram seu peso (P) registrado semanalmente, nos dias 1, 7, 15, 22 e 30. A suplementação com BFT foi realizada desde o dia da estereotaxia (EST) até o dia 30. Os testes comportamentais foram realizados ao final da última semana, em que o teste de campo aberto (CA) foi realizado no dia 27 junto com a familiarização (F) para os testes de reconhecimento de objeto, que foram realizados nos dias 29 (MCD) e 30 (MLD). (Figura 4).

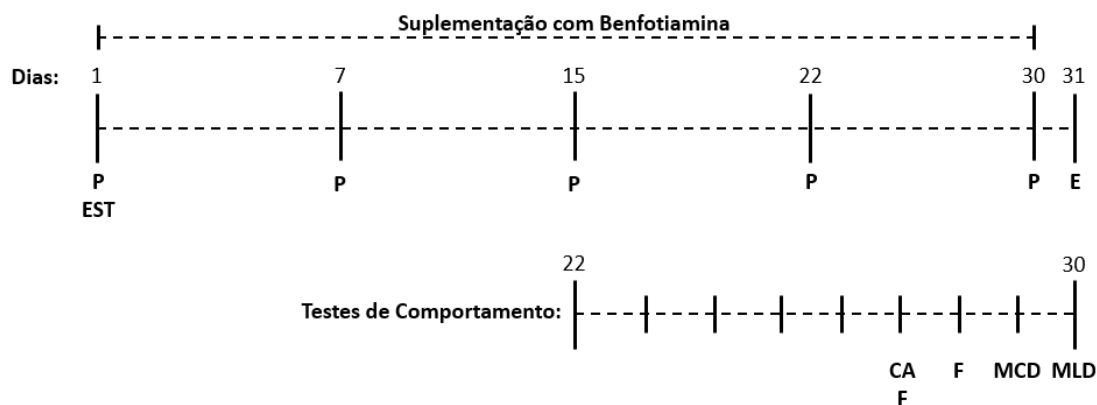


Figura 4. Representação gráfica do delineamento experimental. EST = estereotaxia; P = peso; CA = campo aberto; F = familiarização; MCD = memória de curta duração; MLD = memória de longa duração; E = eutanásia.

#### 4.1.5. Eutanásia

Vinte e quatro horas após os 30 dias do período experimental (Figura 3) os animais foram eutanasiados (E) por decapitação, e o encéfalo (hipocampo, hipotálamo e córtex entorrinal) coletado para dosagem de tiamina, análise de proteínas, expressão gênica e atividade mitocondrial. Também foram coletados os coxins adiposos viscerais, sangue total e soro para análises de alterações relacionadas à parâmetros metabólicos.

##### 4.1.5.1 Coleta dos tecidos adiposos viscerais

Durante a eutanásia, foram dissecados e pesados em balança analítica os compartimentos adiposos peritoneal, mesentérico e epididimal dos animais. O protocolo utilizado para dissecação foi o descrito por JOHNSON e HIRSCH (1972).

#### 4.1.6. Quantificação do conteúdo proteico no encéfalo por *Immunoblotting*

A análise proteica pelo método de immunoblotting foi realizada como descrito anteriormente por nosso grupo (CRUNFLI *et al.*, 2018). Resumidamente, extratos das regiões encefálicas foram dissecados e homogeneizados em tampão de extração (Tris, pH 7,4, 100 mM; EDTA 10 mM;

SDS 10%; fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM). As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 minutos a 4° C e o sobrenadante separado. A quantificação proteica do sobrenadante foi realizada através do método colorimétrico com reagente de Bradford (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). O sobrenadante foi então homogeneizado com tampão Laemmli (azul de bromofeno 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50% e SDS 10%) e amostras contendo 30 µg de proteína foram separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE e então transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro).

As membranas foram então bloqueadas e incubadas com os anticorpos primários relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Detalhamento dos anticorpos utilizados na técnica de imunodeteção por *western blot* nos experimentos *in vivo* e *in vitro*.

<b>Anticorpo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Nº série</b>	<b>Espécie</b>	<b>Clone</b>
<i>In vivo</i>				
GluN2b	Santa Cruz	Sc-1469	Goat	Monoclonal
IR	Santa Cruz	Sc-711	Rabbit	Policlonal
p-IR	Santa Cruz	Sc-81500	Mouse	Monoclonal
PI3K	Cell Signalling	#4292	Rabbit	Policlonal
AKT 1/2/3	Santa Cruz	Sc-8312	Rabbit	Policlonal
p-AKT 1/2/3 <sup>ser473</sup>	Santa Cruz	Sc7985-r	Rabbit	Policlonal
ERK 1/2	Santa Cruz	Sc-135900	Mouse	Monoclonal
p-ERK 1/2 <sup>thr199/tyr202</sup>	Cell Signalling	#1901	Rabbit	Policlonal
GSK3α/β	Santa Cruz	Sc-56913	Mouse	Monoclonal
p- GSK3α/β <sup>ser21/9</sup>	Cell Signalling	#9331	Rabbit	Policlonal
GFAP	Sigma-Aldrich	G-3893	Mouse	Monoclonal
THTR-1	Santa Cruz	Sc-100649	Mouse	Monoclonal
BCL-2	Cell Signalling	#2876	Rabbit	Policlonal
BAX	Cell Signalling	#2772	Rabbit	Policlonal
GAPDH	Santa Cruz	Sc-32233	Mouse	monoclonal
<i>In vitro</i>				
p-IRS1 <sup>tyr612</sup>	Millipore	#09-432	Mouse	Policlonal
p-AKT <sup>ser473</sup>	Cell Signaling	#4051	Rabbit	Monoclonal
Anti-DNP	Sigma-Aldrich	#9656	Rabbit	Policlonal
p-EIF2α <sup>ser51</sup>	Cell Signaling	#9721	Rabbit	Policlonal
ATF-4	Cell Signaling	#11815	Rabbit	Monoclonal
CHOP	Cell Signaling	#5554	Rabbit	Monoclonal
HSP-60	Santa Cruz	Sc-13115	Mouse	Monoclonal
HSP-10	Santa Cruz	Sc-20958	Rabbit	Monoclonal

Após a incubação com os respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase, a ligação específica foi revelada utilizando quimioluminescência a partir de luminol e ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade em um *scanner* C-Digit (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) e analisadas em software *Image Studio Digits v4.0* (Li-Cor Inc.).

#### **4.1.7. Atividade Enzimática de Piruvato Desidrogenase e Citocromo c Oxidase**

A atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) e citocromo c oxidase (COXIV) foi medida no hipocampo dos animais. O tecido foi coletado e homogeneizado em um tampão de extração de detergente, centrifugado e dividido em alíquotas para as medições seguindo o protocolo específico de análise colorimétrica por um kit de atividade enzimática de PDH (Sigma-Aldrich) e kit de citocromo c oxidase (Abcam), seguindo as instruções do fabricante.

#### **4.1.8. Quantificação de Tiamina e seus Ésteres Fosfatados**

A dosagem de tiamina livre, tiamina monofosfato (TMP) e tiamina difosfato (TDP) no córtex entorrinal e no hipotálamo foi realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta pressão (*High Pressure Liquid Chromatography – HPLC*) (Shimadzu LC-10AT – Shimadzu Instruments, Kyoto, Japão) no laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em parceria com o Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari e o pós-graduando Msc. Álisson de Carvalho Gonçalves. Os tecidos foram homogeneizados em tampão Fosfato de Sódio ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 50 mM pH 7.0 e centrifugados a 5000rpm por 10 minutos. Foram retirados 50ul do sobrenadante e homogeneizados em 300ul de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0,4 M e novamente centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm. Após, foram retirados 200ul do sobrenadante, adicionados à 20ul de Hexacianoferrato de potássio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) 30mM e 15ul de hidróxido de sódio (NaOH) 15%, homogeneizados e utilizados 25ul para a leitura em fase móvel com tampão Fosfato 25mM pH7,0 + Metanol

7:3 (v:v) e coluna cromatográfica C18-amida (Sigma-Aldrich). Como resultado da reação, foi produzido Tiocromo ( $C_{12}H_{14}N_4OS$ ), uma substância fluorescente detectável com o fluorímetro (Shimadzu RF-20A – Shimadzu Instruments) operando em 365 nm para excitação e 435 nm para emissão (PORTARI; VANNUCCHI; JORDAO, 2013). Os picos formados foram então identificados por comparação com padrões de Cloridrato de Tiamina (TH), Tiamina difosfato e Tiamina Monofosfato (Sigma-aldrich) derivados da mesma maneira descrita acima. A quantificação foi realizada e normalizada pelo total de proteínas na amostra, quantificadas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

#### **4.1.9. Quantificação de expressão gênica por RT-qPCR no encéfalo**

##### **4.1.9.1. Extração e quantificação de RNA total**

As amostras das regiões encefálicas foram lisadas com 250  $\mu$ l - 500  $\mu$ l de tiocianato de guanidina – Trizol™ LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para cada poço, pipetando para cima e para baixo várias vezes. Posteriormente, o lisado foi transferido para um tubo de vedação seguro de 1,5 ml. Para uma dissociação completa do complexo de nucleoproteínas, as amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 0,1 ml de clorofórmio a cada amostra. Após agitação por alguns segundos e 2-3 minutos de incubação em temperatura ambiente, as amostras foram colocadas em uma centrífuga refrigerada a 4 °C. Para a separação de fases, as amostras foram centrifugadas por 15min a 13.000rpm. A mistura separa-se em uma fase vermelha de fenol-clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa superior incolor. O RNA está exclusivamente na fase aquosa. O volume dessa fase é de cerca de 60% do volume de Trizol da extração. Para a precipitação do RNA, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de vedação seguro de 1,5 ml, contendo 0,3 ml de isopropanol e ressuspenso por várias vezes. Após 10 min de tempo de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm a 4 °C. O RNA formou um grânulo no fundo do tubo e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 0,5 ml de etanol a 75% e os tubos foram agitados no vórtex para

lavar o RNA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5min a 13.000rpm a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o tubo foi colocado de cabeça para baixo para secar o sedimento de RNA por pelo menos 10-60 min. Quando o etanol foi evaporado, o sedimento foi diluído em 25 µl de água livre de RNase. Finalmente, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 55 ° C em um bloco de aquecimento.

A quantificação do RNA foi realizada usando um fotômetro espectral NanoDrop para determinar a concentração de RNA isolado, medindo a absorção a 260 nm. Cada medição também determina a qualidade do RNA, fornecendo a razão do coeficiente de absorção de 260 nm a 280 nm e de 260 nm a 230 nm. A relação de 260 / 280nm entre 2,0 e 2,2 garante que nenhuma contaminação por proteínas ou fenóis diminua a eficiência da reação, enquanto os desvios na relação de 260 / 230nm indicam contaminações com fenol, clorofórmio ou sal. Portanto, a relação 260 / 230nm deve ser de 1,8 a 2,2.

#### 4.1.9.2 Expressão Genica por RT-qPCR em amostra de encéfalo

A síntese de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi conduzida usando AMV Reverse Transcriptase utilizando um kit de síntese de cDNA #A3500 (Promega). Para cada mistura de reação, um volume total de 20 µl foi transcrito a partir de 1 µg de RNA. O RNA foi incubado com uma mistura de *primers* (1:1 de primer Oligo (dT)<sub>15</sub> e *hexa-primers* randômicos com base de seis nucleotídeos) por 5min a 70° C em um termociclador para permitir o anelamento aleatório em vários locais da fita aberta de RNA. Subsequentemente, as amostras são resfriadas em gelo por 5 min e adicionam-se trifosfatos de desoxirribonucleotídicos (dNTPs), transcriptase reversa de *Avian Metabolosis Virus* (AMV-RT) e tampão de síntese concentrado 5x. Após, as amostras foram incubadas novamente no termociclador por 1 h a 42°C seguido de 5 minutos a 95°C.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi usada para monitorar a amplificação das amostras de cDNA através da detecção de um sinal fluorescente crescente. Para tal, o SybrGreen tem sido usado como um marcador fluorescente de ligação de fita dupla. Após cada ciclo de amplificação, o sinal fluorescente medido é diretamente proporcional ao número de produtos



de PCR (quantificação em tempo real) e permite a quantificação da expressão do gene. A reação foi realizada em um aparelho *Applied Biosystems 7500* real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) com 10 ng de cDNA em uma mistura de reação de 10  $\mu$ l que continha SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos para detecção das sequências desejadas (200nM cada, as sequências de primers estão listadas na tabela 2) e água livre de nuclease.

A quantificação da expressão gênica por qPCR usou como base os primers das sequências gênicas alvo demonstradas na tabela 2:

Tabela 2. Genes de *Rattus norvegicus* utilizados na análise de RT-qPCR, número dos genes na plataforma GenBank™ (<http://www.ncbi.nih.gov/gene>) e sequências gênicas de *primers forward* e *reverse* de cada gene estudado.

Gene	Gene Nº	Forward	Reverse
<b>THTR1</b>	289175	GATGCTCCTACGTACTGCC	TGAAGACCTGTCTCTCGGTCA
<b>mTPPTR</b>	303676	CAGCGCACTTTGTATGTGGT	AGGTTCCCTGTTTGCTTTCCG
<b>GLUT1</b>	20525	TTAATCGCTTTGGCAGGCGG	AAACCCATAAGCACGGCAGA
<b>GLUT2</b>	25351	GCAACATGTCAGAAGACAAGATCAC	TGGAGCAATCTCGCCAATGT
<b>HPRT1</b>	24465	AGCTACTGTAATGATCAGTCAACG	AGAGGTCTTTTCACCAGCA
<b>RPLP0</b>	64205	TAAAGACTGGAGACAAGGTG	GTGTAICTCAGTCTCCACAGA

As condições de incubação foram as seguintes: as amostras foram aquecidas a 95°C para derreter o cDNA de fita dupla, seguido de anelamento dos primers (reverso e forward) com o cDNA de fita simples a 60° C. O alongamento pela DNA-polimerase constrói um novo cDNA de fita dupla a 60 ° C. Essa reação é executada por 40 ciclos, seguido de uma curva de *melting* para determinar se há contaminação com cDNA externo, amplificação de sequências indesejadas ou auto-anelamento dos primers.

O resultado da curva de *melting* foi comparado com uma curva *in silico* desenhada no aplicativo uMelt® (<https://dna-utah.org/umelt/umelt.html>) para comprovar a pureza da reação (ausência de anelamentos, auto dimerização ou amplificação inespecífica). Como o SyberGreen® se liga a todo cDNA de fita dupla, a curva de *melting* é um marcador de qualidade para verificar se o gene alvo desejado foi detectado. Um controle foi adicionado para cada mistura de primers, contendo água livre de nuclease em substituição ao cDNA para verificar novamente a presença de dímeros de primers, bem como para contaminação com cDNA. A análise dos dados foi baseada no método  $\Delta\Delta C_t$  com normalização

dos dados brutos para os genes de referência Hipoxantina guanina fosforibosil transferase 1 (HPRT1) e proteína ribossômica 60S LP0 (RPLP0).

## **4.2. Avaliação dos efeitos da STZ e do tratamento com BFT em neurônios hipotalâmicos da linhagem CLU183**

Em uma parceria com o Instituto Alemão de Nutrição Humana (DIFE, do alemão *Deutsches Institut für Ernährungsforschung*), avaliamos os efeitos in vitro da STZ e da BFT, células neuronais hipotalâmicas da linhagem CLU183 (mHypoA-2/23 CLU183) foram cultivadas com DMEM GlutaMAX<sup>®</sup> (Gibco) suplementado com 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), 10% de soro fetal bovino (Pan, África do Sul) e 1% de penicilina-streptomicina (Gibco). As células eram sempre incubadas a 37°C e saturação de CO<sub>2</sub> a 5%.

### **4.2.1. Análise da influência do receptor de insulina na neuroproteção após exposição à STZ**

Para avaliar a influência da sinalização de insulina na neuroproteção contra a exposição à STZ, nós realizamos um nocaute das células CLU183 para o gene de IR (IRKO) e em seguida realizamos um teste de viabilidade celular após exposição das células IRKO e seus respectivos controles à STZ, como descrito abaixo.

#### **4.2.1.1. Nocaute do receptor de insulina**

A exclusão dos IRs especificamente em neurônios hipotalâmicos murinos foi feita pela aluna de doutorado do German Institute of Human Nutrition, Chantal Chudoba, usando o vetor pSpCas9 (BB) -2A-GFP (PX458), que contém RNA guia (gRNA) contra IR. Para gerar a linha celular de nocaute do receptor de insulina, os CLU183 foram transfectados usando 10 mg de plasmídeo que expressa o gRNA. Um dia antes da transfecção, as células foram semeadas a uma densidade de  $1.0 \times 10^5$  células. Para a transfecção, o Reagente de Transfecção FuGENE HD (Promega, Madison, WI, USA) foi utilizado e realizado de acordo com as diretrizes do fabricante. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células GFP-positivas foram selecionadas por citometria de fluxo. Os clones únicos de knockout de IR foram confirmados com base na

ausência de proteína IR, conforme detectado pela técnica de Western blot usando Anticorpo anti-IRb.

Guia: INSR\_469\_fw CACCGATACGGGACCAGTCGATAG  
INSR\_469\_rv AAACCTATCGACTGGTCCCGTATC

#### *4.2.1.2. Teste de Viabilidade celular com brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] - MTT*

Para observar a toxicidade da STZ, da BFT e da combinação da exposição aos dois compostos nas células CLU183, foram realizados testes de viabilidade celular com [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). O MTT é um composto que ao reagir com as enzimas desidrogenases mitocondriais, forma cristais de formazan cuja quantidade varia de acordo com o volume e atividade mitocondrial das células. Estes cristais, por sua vez, são solúveis em dimetil sulfóxido (DMSO), formando uma coloração roxa proporcional a sua quantidade.

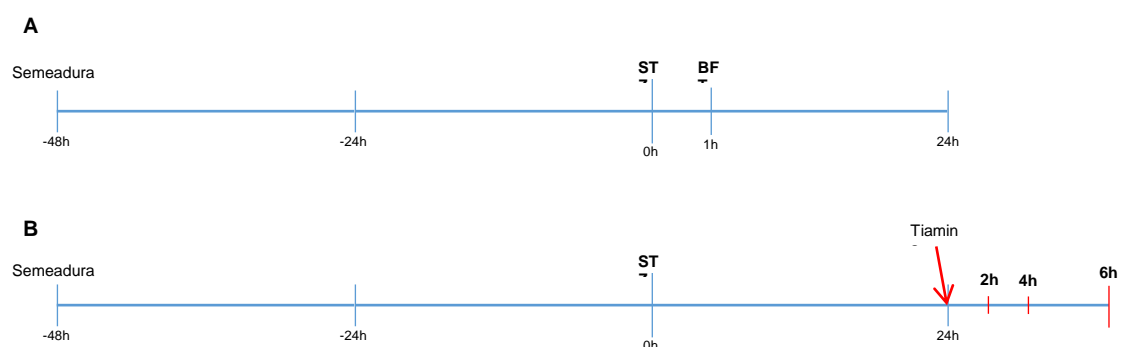
No experimento, primeiro foi realizado o teste com diferentes doses de STZ e BFT a fim de escolher uma dose de toxicidade intermediária de STZ (entre 25% e 45% de diminuição na viabilidade) e uma dose não tóxica de BFT para o tratamento. Vinte e quatro horas após a semeadura de  $0.05 \times 10^4$  células em placas de 96 poços, as células foram expostas ao STZ ou à BFT por 24 horas. Após o período de exposição às drogas, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com MTT diluído em DMEM a uma concentração de 0,5 mg/ml por três horas. Após o período de incubação, o meio de cultura com MTT foi extraído cuidadosamente, e cada amostra foi diluída em DMSO. Após a diluição, a amostra foi lida em espectrofotômetro à uma absorvância de 550nm. Os resultados foram descritos como diferença percentual em relação ao grupo controle. Neste experimento, as doses escolhidas para os experimentos posteriores foram de 5 mM de STZ e 50  $\mu$ M de BFT.

Na segunda fase do experimento, repetimos o experimento com 24h de exposição, observando as diferenças entre células controle e as células IRKO, e seus controles, produzidas de acordo com o item 4.2.1. Vinte e quatro horas após a semeadura, as células foram expostas a 5 mM de STZ e uma hora após, a 50  $\mu$ M de BFT.

#### 4.2.2. Análise dos efeitos da STZ na absorção celular de tiamina

Neste experimento as células foram semeadas em uma concentração de XXXX em um meio de cultura DMEM sem tiamina (USPLabs). Após 48 horas, as células foram expostas à 5mM de STZ e/ou 50 µM de Benfotiamina por 24 horas (Figura 5A). Após, as células foram congeladas em -80° C para análise posterior de concentrações de tiamina por HPLC.

Em um segundo experimento, as células foram incubadas por 48 horas como descrito acima e expostas a 5mM de STZ. Após 24h de exposição à STZ, as células foram então suplementadas com tiamina por 1h, 2h e 4h e então congeladas para análise posterior de concentrações de tiamina (Figura 5B).



*Figura 5.* Linha do tempo utilizada para estimulação de células CLU183 (A) expostas a estreptozotocina e/ou benfotiamina em meio de cultura sem tiamina e (B) estimuladas com tiamina por 2h, 4h e 6h após 24h de exposição à STZ. STZ = estreptozotocina; BFT = benfotiamina.

##### 4.2.2.1. Análise da concentração celular de tiamina por HPLC

Após os experimentos supracitados, as células foram homogeneizadas em 50 µL de R.I.P.A. o tampão foi então centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi misturado com a mesma quantidade de 0,4 M de ácido perclórico, agitado no vórtex e centrifugado por 15 minutos a 14000 rpm. Posteriormente, 50 µL do sobrenadante foram removidos, adicionados a 10 µL de hexacianoferrato de potássio 12 mM (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) diluído em 3,3 M de hidróxido de sódio (NaOH), incubados por 5 minutos e adicionados 2 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6M para interromper a reação. As amostras foram então homogeneizadas e 25 µL foram utilizados para leitura na fase móvel com tampão

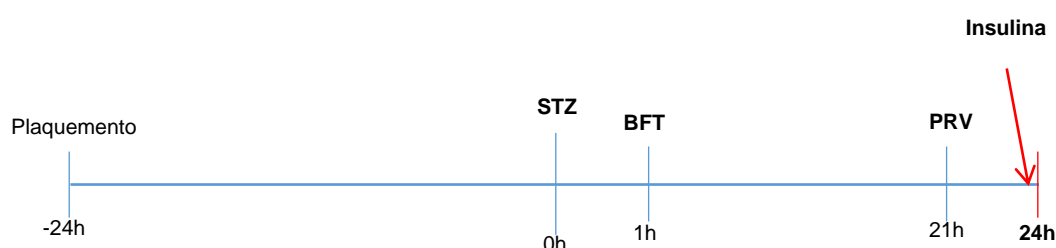
fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 e metanol (8:2 vol) com uma coluna cromatográfica ReproSil-Pur® 120 C18 AQ, 5 µm (250 x 4,6 mm) (DrMaisch GmbH, Ammerbuch-Etringer, Alemanha). O resultado da reação, a substância tiocromo - uma substância fluorescente detectável a 365 nm para excitação e 435 nm para emissão - foi detectada com o fluorímetro (Shimadzu RF-20A - Shimadzu Instruments). Os picos formados foram então identificados por comparação com os padrões de cloridrato de tiamina, monofosfato de tiamina (TMP) e difosfato de tiamina (TDP) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) derivados da mesma maneira descrita acima. A quantificação foi realizada e normalizada pelo total de proteínas na amostra detectadas com o kit de teste de proteína Pierce™ 660 nm (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

#### **4.2.3. Análise de carbonilação proteica por Oxyblot**

Neste experimento, a linhagem de células CLU183 foi exposta a um meio de cultura DMEM com deficiência de tiamina (USPLabs, USA) e adição de 10% de soro fetal bovino. As células eram então divididas em CTL, BFT com adição de 50 µM de BFT, e THI - com adição de 50 µM de Tiamina (THI). Após 24 horas, as células foram lisadas em tampão R.I.P.A., submetidas a SDS-PAGE de acordo com a sessão 4.1.6., e transferidas a uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF). As membranas foram então equilibradas em TBS-T/Metanol 80:20 por 10 minutos e lavadas com 2 M de HCl por 5 minutos. Após lavagem, as membranas foram então incubadas em 20mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) diluído em HCl 2 M por 10 minutos. Após incubação, as membranas foram lavadas uma vez com HCl 2 M e 5 vezes de 5 minutos com TBS-T/Metanol 50:50 a fim de retirar o excesso de DNPH. Após este procedimento as membranas foram então bloqueadas com BSA a 5% em TBS-T e finalmente submetidas a incubação com anticorpo primário anti-Dinitrofenil #D9656 – 1:10.000 (Sigma-Aldrich) *overnight* a 4°C e em seguida com anticorpo secundário equivalente por duas horas. A revelação foi realizada por reação quimioluminescente com reagente ECL ( e as imagens capturadas no aparelho ChemiDoc™ (Bio-Rad) e quantificadas no aplicativo ImageJ com o pacote de análise de imagens Fiji (<https://imagej.net/Fiji>).

#### 4.2.4. Estimulação com Insulina

Ainda neste experimento, neurônios hipotalâmicos foram tratados com 50 $\mu$ M de benfotiamina e, após duas horas, expostos à 5mM de STZ por 24h (Figura 6). No procedimento experimental para observar os efeitos do tratamento na sinalização de insulina, as células foram expostas por 3 horas à privação de fatores hormonais (exclusão do soro fetal bovino do meio de cultura) e nos últimos 5 minutos do experimento foram adicionados 200 nMol de insulina ao meio de cultura, a fim de estimular a via de sinalização de insulina.



*Figura 6.* Linha do tempo utilizada para estimulação de células CLU183 expostas a estreptozotocina e/ou benfotiamina e estimuladas com insulina por 5 minutos. STZ = estreptozotocina; BFT = benfotiamina; PRV = privação de soro fetal bovino.

Após estimulação, as células foram lisadas com R.I.P.A. e o conteúdo proteico extraído para análise de conteúdo proteico por imunoblotting de acordo com a sessão 4.1.6., utilizando os anticorpos específicos para detecção de pIRS-1<sup>tyr612</sup> e pAKT<sup>ser473</sup> na concentração 1:1000 (Tabela 1).

##### 4.2.4.1. Estimulação em deficiência de tiamina

A fim de entender os efeitos da tiamina e da benfotiamina sobre a sensibilidade à insulina, foi realizado o mesmo protocolo em DMEM sem tiamina e 10% de soro fetal bovino (~14nMol de tiamina). A este experimento, foi adicionado um grupo que recebia 50 $\mu$ M de tiamina HCl (Sigma-Aldrich).

#### 4.2.5. Quantificação de mRNA por RT-qPCR em amostra celular

Diferentemente do exposto no ítem 4.9, o RNA foi extraído e purificado a partir de  $1,5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^5$  amostras de cultura de células usando colunas de extração ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems #Z6010 (Promega) e seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada usando os mesmos parâmetros do item 4.9

A síntese de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi conduzida usando M-MLV Reverse Transcriptase e RNase H- #M3683 (Promega). Para cada mistura de reação, um volume total de 20  $\mu$ l foi transcrito a partir de 1  $\mu$ g de RNA. O RNA foi incubado com uma mistura de *primers* (1:1 de primer Oligo (dT)<sub>15</sub> e *hexa-primers* randômicos com base de seis nucleotídeos) por 5min a 70° C em um termociclador para permitir o anelamento aleatório em vários locais da fita aberta de RNA. Subsequentemente, as amostras são resfriadas em gelo por 5 min e adicionam-se trifosfatos de desoxirribonucleotídicos (dNTPs), transcriptase reversa de *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) e tampão de síntese concentrado 5x. Após, as amostras foram incubadas novamente no termociclador por 1 h a 42°C seguido de 5 minutos a 95°C.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi realizada em um aparelho Vii7 (Applied Biosystems) com 10 ng de cDNA em uma mistura de reação de 10  $\mu$ l que continha SybrGreen GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega), seguindo o protocolo descrito no item 4.1.9.2. A quantificação da expressão gênica por qPCR usou como base os primers das sequencias gênicas alvo relativizadas utilizando a proteína *TATA-box binding protein* (TBP) como *Housekeeper* (Tabela 3).

*Tabela 3.* Genes de *Mus musculus* utilizados na análise de RT-qPCR, número dos genes na plataforma GenBank™ (<http://www.ncbi.nih.gov/gene>) e sequencias gênicas de *primers forward* e *reverse* de cada gene estudado.

Gene	Gene Nº	Forward	Reverse
THTR1	116914	GTGGCATCGTTACTGATACCC	TTCCACCGGAGGCTCATCTAA
mTPPTR	67283	GTGGCGGGATCAGTGTCAG	TCCGTGGTATTTGGCATTGGG
BIP	14828	CATGGTTCTCACTAAAATGAAAGG	GCTGGTACAGTAACAACCTG
sXBP1	22433	GAGTCCGCAGCAGGTG	GTGTCAGAGTCCATGGGA
CHOP	29467	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
ATF4	11911	CCTGAACAGCGAAGTGTGG	TGGAGAACCCATGAGGTTTCAA
HSP10	15528	CTGCCGAAACTGTAACCAAAG	TCTCCAACCTTTCACACTGACAG
HSP60	63868	AGTGTTTCACTCCATTGTCCC	TGACTGCCACAACCTGAAG
TBP	21374	CTGGAATTGTACCGCAGCTT	ATGATGACTGCAGCAAATCG



#### 4.2.6 Análise de respiração celular através da técnica de Seahorse

As alterações na respiração mitocondrial foram monitoradas usando o Kit *Seahorse® XF Mitostress Test* e o analisador de fluxo extracelular *Seahorse® XF96*, medindo a taxa de consumo de oxigênio (OCR) e taxa de acidificação extracelular (ECAR) de células aderentes para testar a funcionalidade mitocondrial. Todas as concentrações de compostos foram testadas e otimizadas antes e foram consistentes em todas as corridas *Seahorse®* para todas as configurações experimentais. O Mito Stress Test consiste em uma análise da respiração mitocondrial diante de diferentes estímulos, alterando a fisiologia da mitocôndria para entender a dinâmica da respiração mitocondrial em tempo real. Primeiro, adiciona-se oligomicina, composto bloqueador de ATP-sintase, após a leitura na presença de oligomicina, adiciona-se o ionoporo Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (FCCP), permitindo o transporte passivo de prótons pela membrana, possibilitando a observação da atividade máxima dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, e em seguida rotenona, um bloqueador do complexo I, em associação com antimicina A, um bloqueador do complexo III, a fim de inibir completamente a respiração mitocondrial. As concentrações finais para os compostos utilizados foram 2 mM para Oligomicina (Port A), 1 mM para FCCP (Port B), 1 mM para Rotenona / 2 mM para Antimicina A (Port C). A esquematização do experimento e interpretação do resultado pode ser visto na figura 7.

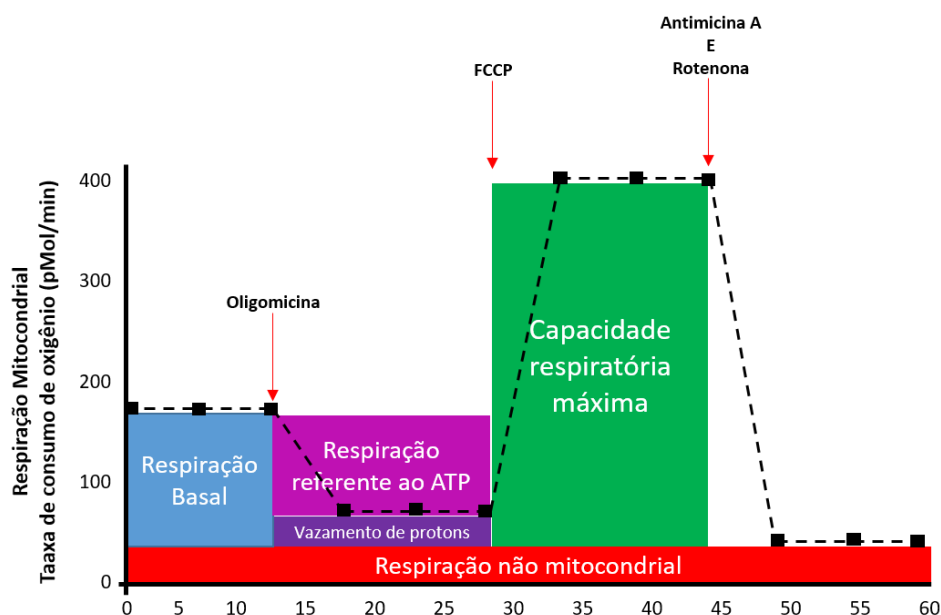


Figura 7 Esquemática do experimento de *mitostress* para análise de respiração celular em um aparelho Seahorse®.

As células foram semeadas a uma densidade de 5000 células/poço, dois dias antes do experimento, numa microplaca de 96 poços em meio de cultura padrão. Quatro poços foram preparados sem células e utilizados como sinal de fundo. No dia seguinte, as células foram estimuladas com STZ e BFT seguindo o padrão dos experimentos anteriores. No dia do ensaio, 24h após a estimulação, as células foram lavadas duas vezes com Meio Seahorse® (XF base Minimum DMEM, suplementado com piruvato de sódio 1 mM, glutamina 2 mM e glicose 10 mM) e incubadas na quantidade final de meio de ensaio numa incubadora sem CO<sub>2</sub> a 37°C para manter os níveis de pH. Após a calibração, a microplaca foi colocada no analisador de fluxo Seahorse® XF96 e o experimento foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Os dados foram normalizados para o nível de proteína total e foram analisados usando o software Wave 2.4.0.

### 4.3. Análise Estatística

Após teste de normalidade dos dados (*Kolmogorov-Smirnov*) foi adotado o teste de análise de variância por ANOVA – *Analysis of Variance* de uma ou duas vias, seguido de pós-teste Fisher LSD (ROTHMAN, 1990) para análises entre os

grupos específicos. Par as análises com dois grupos, foi adotado o teste-t para amostras independentes. Os resultados foram considerados significativos estatisticamente quando demonstraram  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeitos da suplementação de tiamina nas alterações metabólicas e cognitivas resultantes da injeção ICV de estreptozotocina.

#### 5.1.1 *A suplementação de Benfotiamina altera as concentrações sanguíneas e teciduais de tiamina e seus ésteres fosfatados.*

Após a suplementação, as concentrações sanguíneas de tiamina e seus ésteres de fosfato TMP e TDP foram medidas. Para observar se a STZ pode levar à disfunção em outras vitaminas do complexo B, medimos também as concentrações séricas de folato e cobalamina. Como esperado, a suplementação de BFT resultou em um forte aumento nos níveis sanguíneos de tiamina livre (Figura 8A) e seus ésteres de fosfato tiamina monofosfato (TMP) (Figura 8B) e TDP (Figura 8C). A injeção central de STZ não alterou as concentrações periféricas de tiamina, TMP e TDP. Em vez disso, a STZ leva a uma redução nos níveis de folato sérico (Figura 8D) e cobalamina (Figura 8E). Surpreendentemente, a combinação de BFT e STZ induziu um aumento da concentração de tiamina livre, TMP e TDP em comparação com os grupos CTLB. Curiosamente, a suplementação de BFT também foi capaz de reverter a diminuição relacionada à STZ nas concentrações séricas de cobalamina.

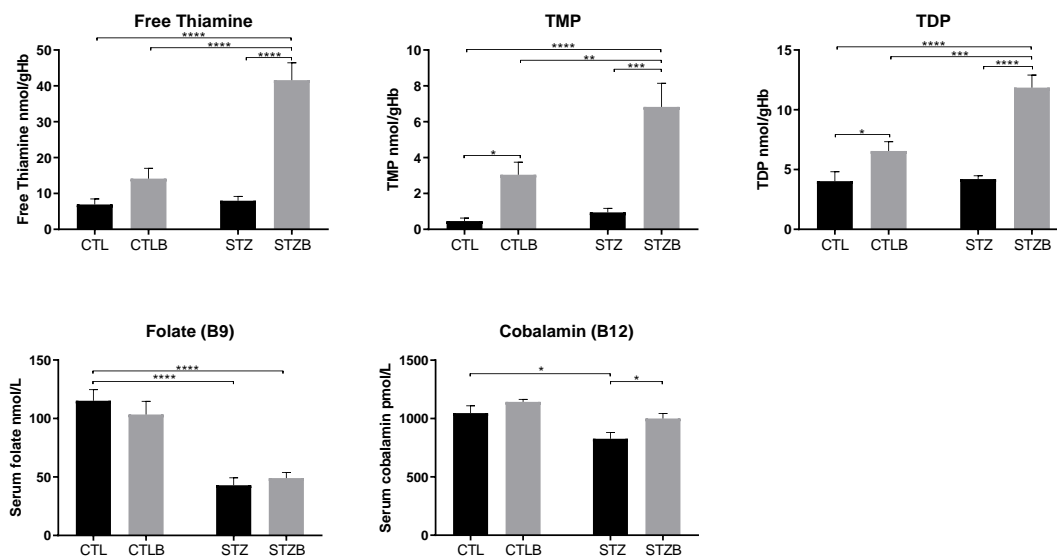


Figura 8. Níveis sanguíneos de (A) tiamina, (B) tiamina monofosfato e (C) tiamina difosfato medidos em sangue total através da técnica de HPLC, normalizados pelos níveis totais de hemoglobina e níveis séricos de (D) folato (vitamina B9) e (E) cobalamina (vitamina B12). Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0.0001$ ; N = 6-8.

Também foi medido o conteúdo total de tiamina livre, tiamina monofosfato e tiamina difosfato no hipocampo e no córtex entorrinal dos animais. A partir da análise, pode-se observar que não houve alterações significativas tanto na quantidade de tiamina livre quanto na quantidade de tiamina monofosfato no hipocampo. Porém, ao analisar as concentrações de TDP, observou-se um efeito da suplementação de BFT na quantidade total de tiamina nos grupos CTLB e STZB ( $p=0.0005$ ), havendo um aumento na quantidade total tanto no grupo CTLB comparado ao grupo CTL, quanto no grupo STZB comparado ao grupo STZ. No córtex entorrinal, foi observado um aumento da quantidade de tiamina livre no grupo STZB, comparado com o grupo STZ; assim como no hipocampo, não houve diferenças na quantidade total de TMP entre os grupos e houve um efeito da suplementação de BFT na quantidade total de tiamina nos grupos CTLB e STZB ( $p=0.001$ ), havendo aumento significativo no grupo CTLB comparado aos grupos não suplementados (Figura 9).

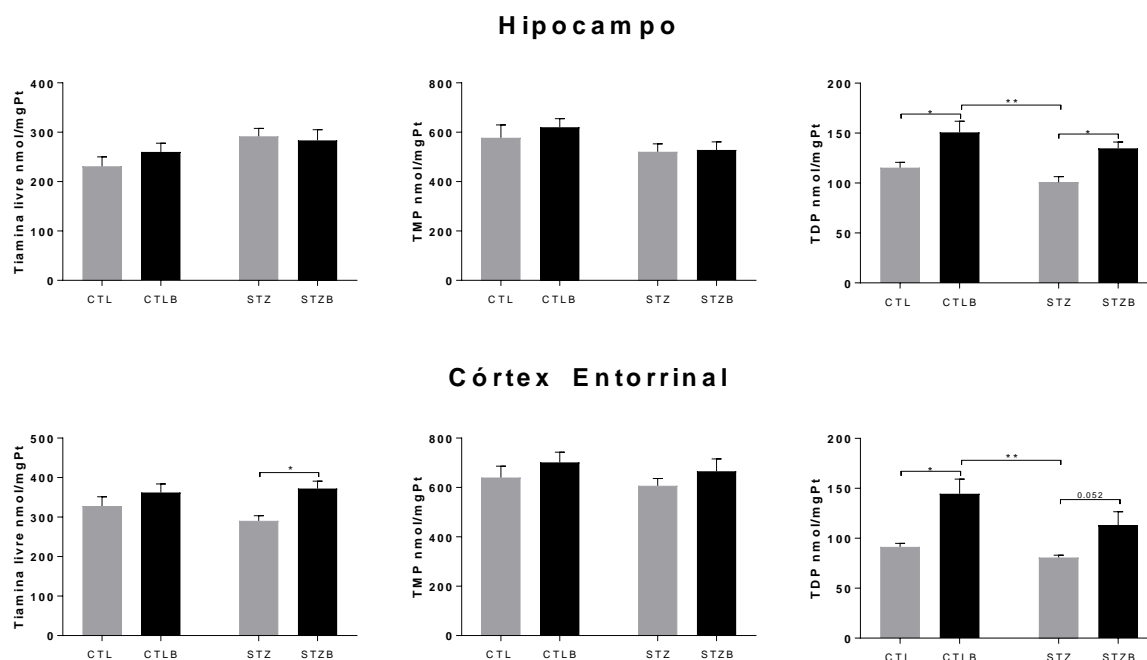


Figura 9. Quantificação de tiamina, tiamina monofosfato (TMP), e tiamina difosfato (TDP) no hipocampo e no córtex entorrinal analisados por técnica de HPLC. Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; N = 5-7.

### 5.1.2. A suplementação com benfotiamina altera a expressão do transportador de tiamina THTR-1 no Hipocampo e Córtex Entorrinal

As análises de expressão gênica do transportador de tiamina THTR-1 no hipocampo e no córtex entorrinal mostraram um efeito do STZ ( $p < 0.0001$ ;  $F = 59,24$ ) na diminuição da expressão de mRNA deste transportador. Por outro lado, a influência da suplementação com BFT ( $p = 0.041$ ;  $F = 4.669$ ) não refletiu em alterações significativas na expressão deste transportador entre os grupos. Ao analisar a imunodeteção do mesmo transportador no hipocampo, foi observada uma influência da injeção de STZ ( $p = 0.0001$ ;  $F = 23.28$ ) nas concentrações do transportador, resultando em um aumento na expressão tanto no grupo STZ quanto no grupo STZB, comparado com os grupos controles. Já no córtex entorrinal, as alterações na detecção deste receptor foram influenciadas tanto pela injeção de STZ ( $p = 0.02$ ;  $F = 5.615$ ) quanto pela suplementação com BFT ( $p < 0.0001$ ;  $F = 21.57$ ), sendo observados aumentos significativos no grupo CTLB

e STZB em relação ao grupo controle, e STZB em relação ao grupo STZ (Figura 10).

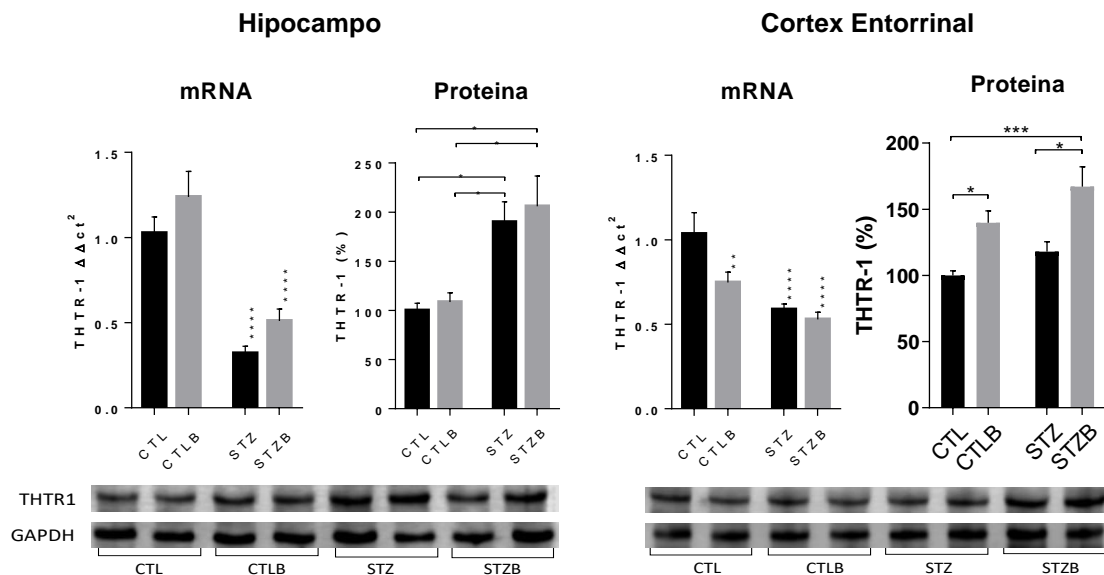


Figura 10. Expressão de mRNA e proteína do transportador de tiamina THTR-1 (SLC19A2) no Hipocampo e no córtex entorrinal. Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0.0001$ . N = 6-8.

### 5.1.3. A STZ-ICV diminui a expressão gênica do transportador mitocondrial de tiamina trifosfato

A fim de entender os efeitos da intervenção em parâmetros relacionados à absorção de tiamina na célula, também foi analisada a expressão gênica do transportador mitocondrial de tiamina trifosfato (mTPPTR). Ao observar os efeitos no hipocampo, notou-se um efeito negativo do STZ na expressão deste transportador ( $p = 0.001$ ;  $F = 13.05$ ). Este efeito foi parcialmente revertido pela suplementação de BFT ( $p = 0.015$ ;  $F = 6.790$ ). Embora não haja diferenças significativas entre o grupo STZ e o grupo STZB, a melhora pode ser evidenciada pela não diferença entre o grupo STZB e o grupo CTL. No córtex entorrinal, os efeitos da STZ foram semelhantes ( $p < 0.0001$ ;  $F = 21.58$ ), provocando uma diminuição da expressão deste transportador nos grupos STZ e STZB, porém,

diferente do hipocampo, não houve efeito significativo da suplementação de BFT neste parâmetro ( $p=0.376$ ;  $F=0.812$ ) (Figura 11).

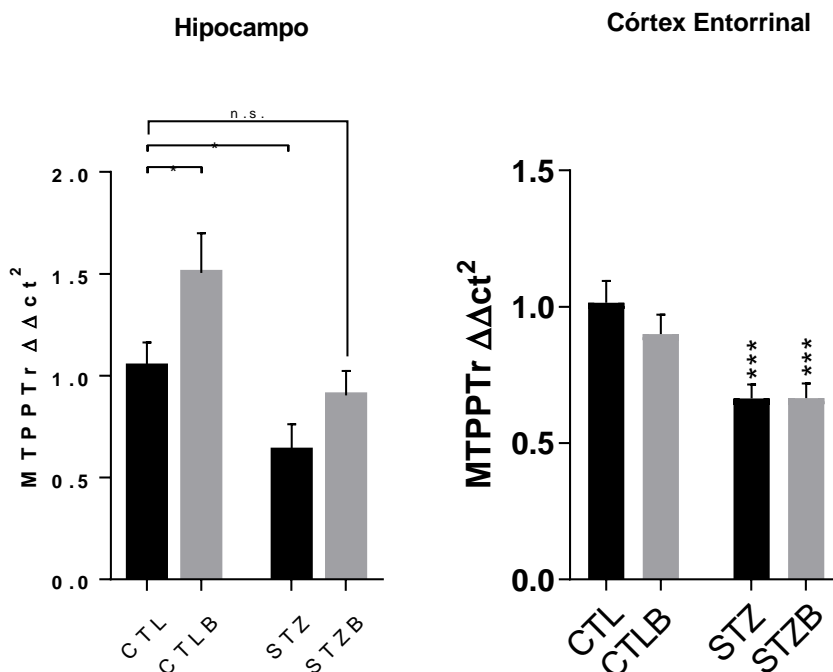


Figura 11. Expressão de mRNA do transportador de tiamina trifosfato mTPPTr (SLC25A19) no Hipocampo e no córtex entorrinal. Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p<0.05$ ; [\*\*\*] =  $p<0.001$ ; [n.s.] = não significante. N = 6-8.

#### 5.1.4. A suplementação de benfotiamina aumenta a atividade enzimática de piruvato desidrogenase e citocromo c oxidase

Ao avaliar a atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) no hipocampo, foi observado uma influência da injeção de STZ ( $p=0.02$ ;  $F=4.597$ ), assim como da suplementação de BFT ( $p=0.005$ ;  $F=8.268$ ), provocando um aumento significativo da atividade nos grupos CTLB e STZB comparados com o grupo controle (Figura 12).



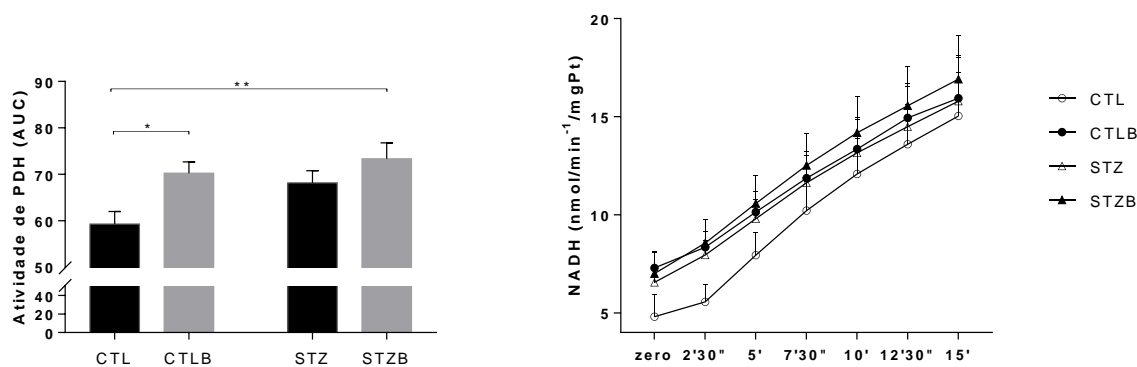


Figura 12. Atividade enzimática de piruvato desidrogenase (PDH) no hipocampo (A) e aumento temporal das concentrações de NADH (B) observados através de análise espectrofotométrica. Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; N = 7-8.

Também foi avaliada a atividade do complexo enzimático citocromo c oxidase (COX IV), que faz parte da cadeia transportadora de elétrons e é afetado na doença de Alzheimer. Assim como na PDH, a dose utilizada de STZ parece não ter afetado na atividade deste complexo enzimático, mas é marcante a influência da suplementação com BFT ( $p < 0.0001$ ;  $F = 93.41$ ), aumentando significativamente a atividade do complexo nos grupos CTLB e STZB (Figura 13).

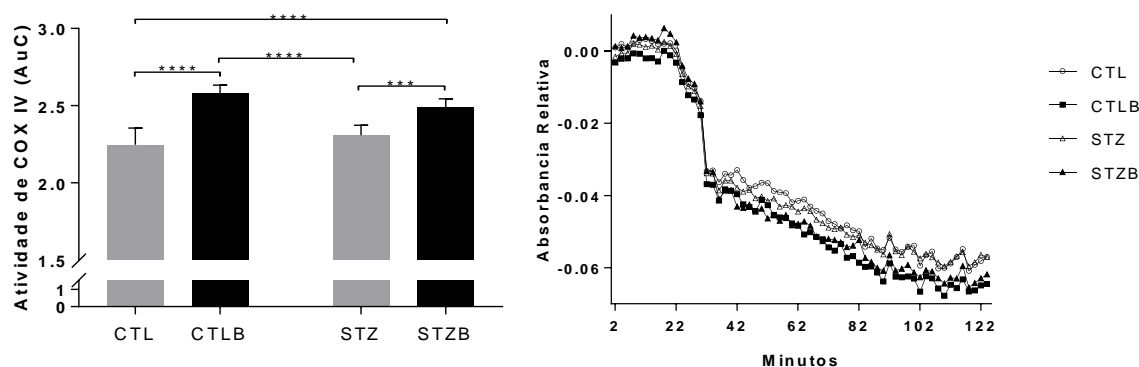


Figura 13. Atividade enzimática de Citocromo c Oxidase (COX IV) no hipocampo (A) e oxidação de citocromo c reduzido determinada colorimetricamente pela alteração da absorvância a 550nm (B) observados através de análise espectrofotométrica. Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*\*\*] =  $p < 0.001$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0.0001$ ; N = 7-8.

### 5.1.5 A suplementação de benfotiamina melhora o déficit cognitivo induzido por STZ-ICV.

Sabendo que a suplementação com BFT foi capaz de aumentar as concentrações de tiamina difosfato no hipocampo e no córtex entorrinal, regiões relacionadas à formação e consolidação de memória afetadas na DA, um teste de reconhecimento de objeto novo foi aplicado nos dias 29 e 30 do período experimental e avaliou a capacidade do animal de distinguir a diferença entre objetos familiares e novos. Assim, uma hora após uma primeira exposição aos objetos familiares (A e A') observou-se que houve uma alteração na memória dos animais relacionada à STZ ( $p=0.001$ ;  $F=12.57$ ), sendo observado que os animais do grupo STZ tinham uma capacidade diminuída de discriminar o objeto familiar do objeto novo (A e B), o mesmo fenômeno também foi observado com uma menor magnitude ( $p=0.099$ ;  $F=2.904$ ) no teste de longa duração (A e C), 24 horas após a exposição (Figura 14). Por outro lado, o tratamento com BFT teve efeitos tanto na memória de curta duração ( $p=0.001$ ;  $F=12.57$ ) (Figura 14A) quanto no teste de memória de longa duração ( $p=0.004$ ;  $F=15,91$ ) (Figura 14B), sendo capaz de reverter o déficit cognitivo em ambos os testes.

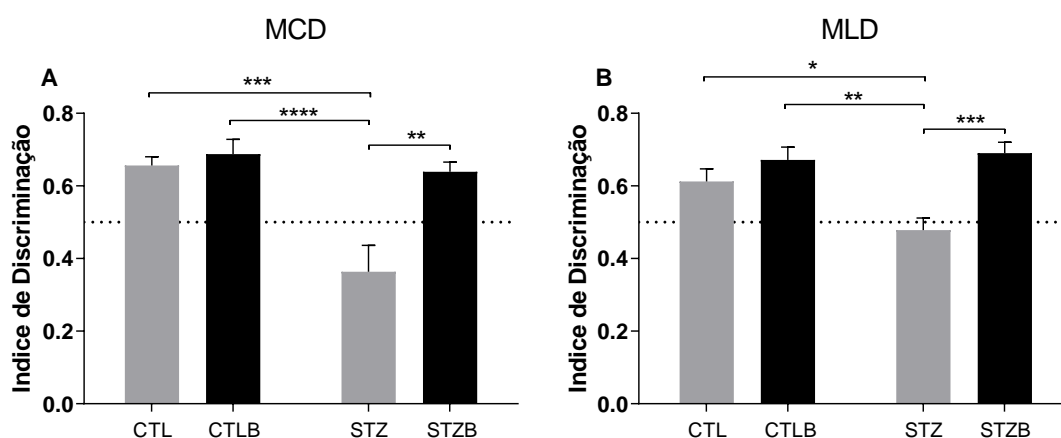


Figura 14. Índice de discriminação baseado no tempo de exploração de objetos durante o teste de (A) memória de curta duração, uma hora após a primeira exposição aos objetos e (B) longa duração, 24 horas após primeira exposição aos objetos. Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*]= $p<0.05$ ; [\*\*] =  $p<0.01$ ; [\*\*\*] =  $p<0.001$ ; [\*\*\*\*] =  $p<0.0001$ ; N = 7-10.

Além das alterações comportamentais, também foi observada no hipocampo e no córtex entorrinal, a expressão da subunidade 2B do receptor de glutamato do tipo NMDA (GluN2B), bem relacionada ao fenômeno da potenciação de longa duração (*Long-term potentiation* - LTP) em neurônios. Foi observado um aumento significativo na expressão de GluN2B nos animais STZB comparados aos STZ no córtex entorrinal (Figura 15A). No hipocampo, notou-se um comportamento parecido, com um aumento da expressão do grupo STZB comparado com o grupo controle (Figura 15B). Essas alterações foram influenciadas pela suplementação de BFT no hipocampo ( $p=0.003$ ;  $F=11.290$ ) e no córtex entorrinal ( $p=0.04$ ;  $F=4.677$ ), mas também pela interação entre a STZ e a BFT no córtex entorrinal ( $p=0.04$ ;  $F=4.537$ ).

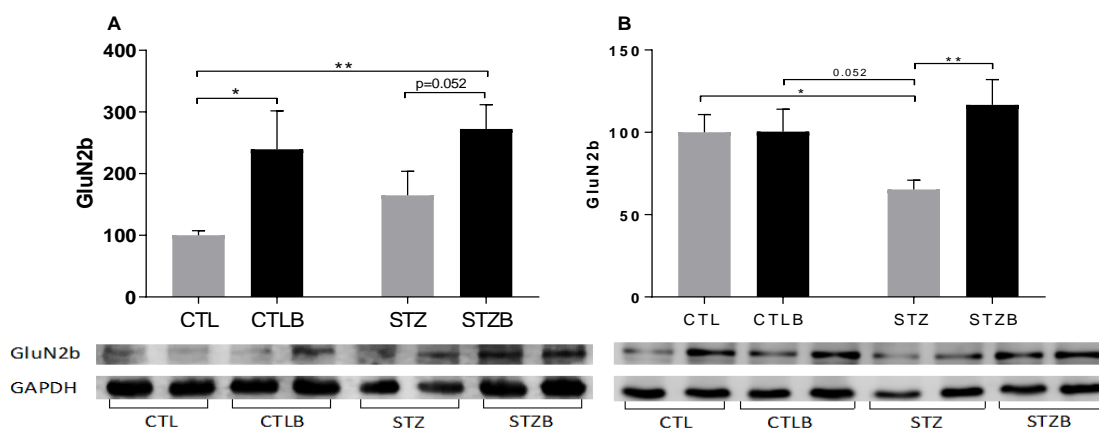


Figura 15. Expressão proteica do canal de cálcio NMDA subunidade 2b (GluN2B) detectada por *immunoblotting* no córtex entorrinal (A) e no hipocampo (B). Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; N = 6-8.

Ao observar os resultados relacionados ao teste de campo aberto realizado no período de adaptação do teste de reconhecimento de objeto, foi observado que os animais do grupo STZ não apresentaram nenhum déficit de atividade motora (Figura 16). Curiosamente, os mesmos apresentaram um aumento na atividade motora, avaliada pela quantidade de mudança de quadrantes no campo aberto, que foi revertida nos animais tratados com BFT (Figura 15B).

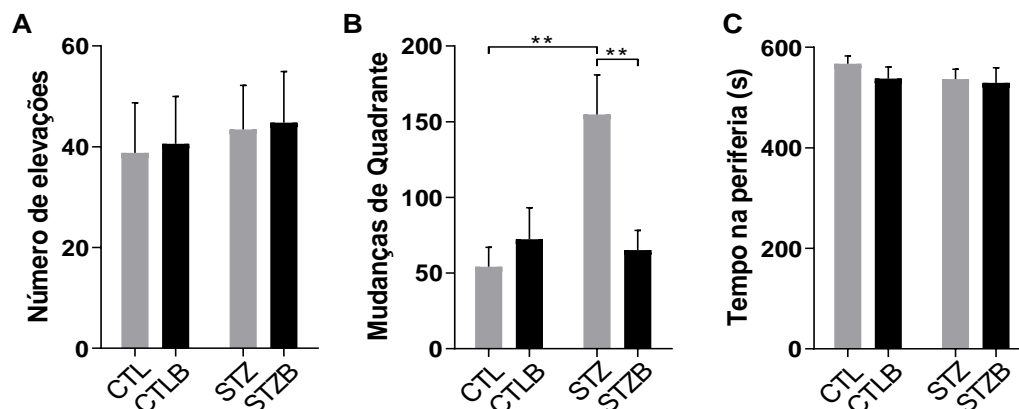


Figura 16. Análise de campo aberto, contendo avaliação do número de elevações (A), da mudança de quadrantes (B) e do tempo na periferia do campo (C). Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; N = 5-9.

#### 5.1.6. STZ-ICV provoca alterações na via de sinalização de insulina no hipocampo e no córtex entorrinal

Ao analisar a expressão de proteínas relacionadas à via de sinalização de insulina no hipocampo, foi observado que o tratamento com BFT não alterou a quantidade total de receptores de insulina (Figura 17A). Porém, ao analisar a fosforilação do receptor em tirosina 1150/1151 foi observado um aumento na fosforilação do grupo STZ+B comparado com o grupo STZ (Figura 17B).

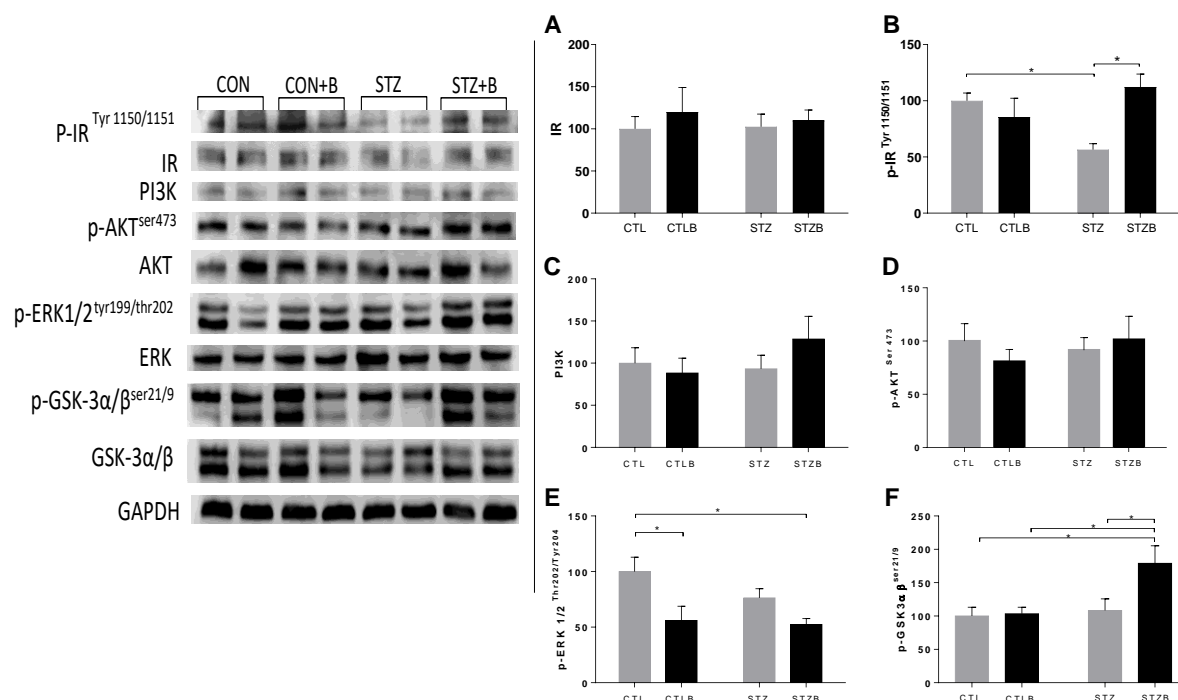


Figura 17. Proteínas relacionadas à via de sinalização de insulina no hipocampo detectado por *immunoblotting*. Conteúdo total de receptor de insulina (A) e de receptor de insulina fosforilado em tirosina 1150 e 1151 (B); PI3K total (C); AKT fosforilada em serina 473, ERK fosforilada em treonina 202 e tirosina 204; GSK-3 fosforilada em serina 21 e 9. Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; N = 6-8.

Apesar de uma maior fosforilação encontrada no receptor de insulina, não foi observado aumento na expressão da proteína PI3K nem da fosforilação da proteína AKT 1/2/3 serina 473 (Figura 17D), geralmente relacionada à sinalização de insulina. Porém, ao observar as proteínas alvo da via de sinalização de insulina, foi notado que a expressão de GSK-3 $\alpha/\beta$  fosforilada em serina 21/9 no hipocampo foi maior no grupo STZ+B comparado com todos os outros grupos (Figura 17F). Por outro lado, os animais dos grupos STZB e CTLB tiveram uma menor fosforilação de ERK (MAPK) 1/2 em treonina 202 e tirosina 204 comparados com os animais controle (Figura 17E).

Ao realizar as análises das mesmas proteínas da via de sinalização de insulina no córtex entorrinal, de forma semelhante ao observado no hipocampo, não foram notadas alterações na quantidade total de receptor de insulina (Figura 18A), nem na expressão de PI3K (Figura 18B). Porém, foi observada uma maior fosforilação de AKT 1/2/3, em serina 473, no grupo STZB comparado com os grupos controles (Figura 18C). A ativação da via à nível de AKT foi seguida de

inativação de GSK3, provocada pela fosforilação em serina 9 e 21, no grupo STZB (Figura 18D). A proteína ERK1/2 teve um aumento da fosforilação no grupo STZ que foi normalizado pelo tratamento com BFT no grupo STZB (Figura 18E).

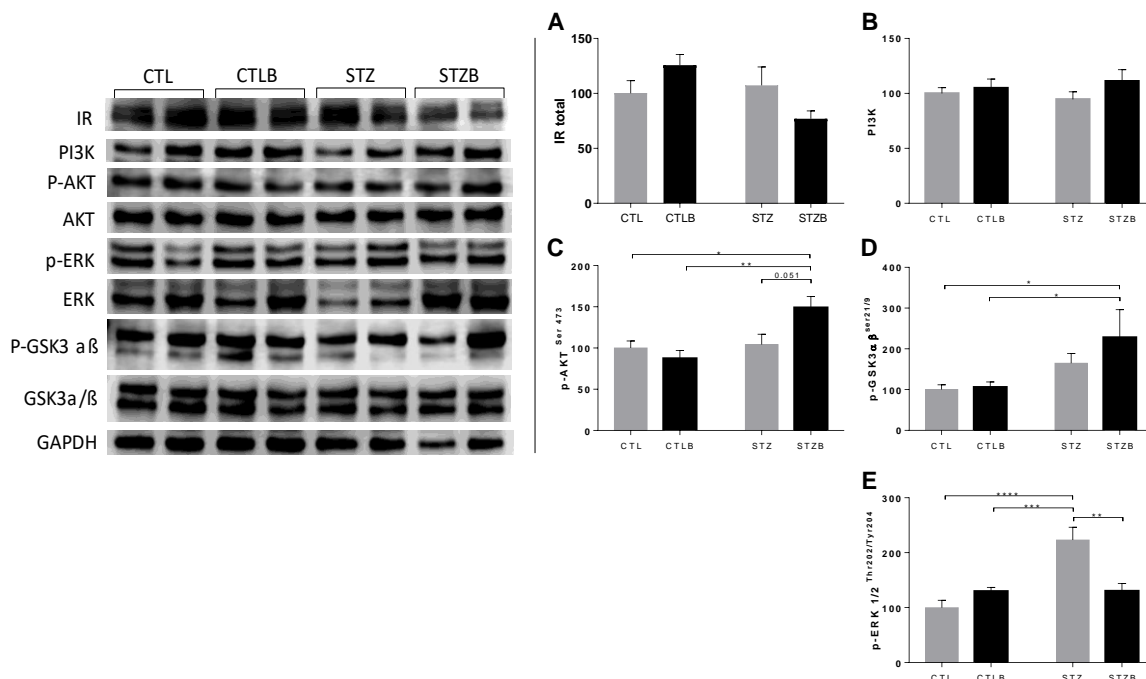


Figura 18. Proteínas relacionadas à via de sinalização de insulina no córtex entorrinal, detectado por *immunoblotting*. Conteúdo total de receptor de insulina (A); PI3K total (B); AKT fosforilada em serina 473 (C); GSK-3 fosforilada em serina 21 e 9 (D); ERK fosforilada em treonina 202 e tirosina 204 (E). Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ ; N = 5-8.

### 5.1.7. A STZ-ICV diminui a expressão gênica de GLUT 1 no hipocampo e no córtex entorrinal

Para entender se a STZ provoca alterações em transportadores de glicose (GLUT's) como preconizado em estudos anteriores, nós avaliamos a expressão gênica de GLUT1, geralmente associado às células gliais, e GLUT2, preconizado como uma das portas de entrada da STZ na célula. Os resultados demonstraram que há uma diminuição significativa na expressão de GLUT1 no hipocampo e no córtex entorrinal após STZ-ICV. Por outro lado, a expressão gênica de GLUT2 mostrou-se inalterada frente à injeção de estreptozotocina (Figura 19).

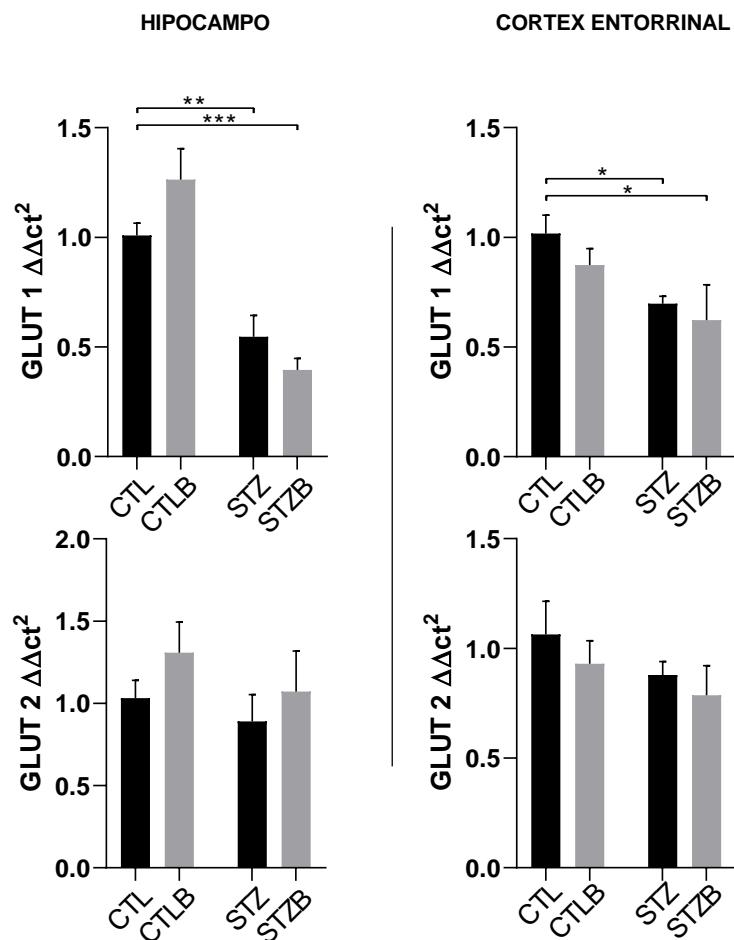


Figura 19. Expressão gênica de GLUT's 1 e 2 no hipocampo e no córtex entorrinal após injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e/ou trinta dias de suplementação com benfotiamina. Os resultados foram submetidos à anova de duas vias com o teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ . N=6.

#### 5.1.8. A benfotiamina reverte parcialmente a modulação de marcadores da progressão da doença de Alzheimer no hipocampo e córtex entorrinal induzidos por STZ-ICV.

Ao analisar a expressão de proteínas relacionadas à fenótipos encontrados na DA, como inflamação, apoptose e hiperfosforilação da proteína tau, observamos que o STZ-ICV resultou em efeitos negativos nestes parâmetros, como esperado no modelo. Analisando a proteína *Glial Fibrillary acidic protein* - GFAP, indicativo de astrogliose, foi possível observar que os animais STZ tiveram um aumento da expressão desta proteína tanto no hipocampo quanto no

córtex entorrinal. Além da inflamação, pudemos observar um aumento da hiperfosforilação da proteína tau no córtex entorrinal, mas não no hipocampo. Já observando a razão BCL-2/BAX, parâmetro geralmente utilizado para observar a sinalização celular pró e anti-apoptótica, pudemos observar uma diminuição deste índice, indicando maior sinalização pró-apoptótica, no hipocampo dos animais do grupo STZ. Observamos que estes parâmetros foram parcialmente revertidos BFT, que foi capaz de reverter a inflamação e a sinalização pró-apoptótica no hipocampo e a hiperfosforilação de tau no córtex (Figura 120).

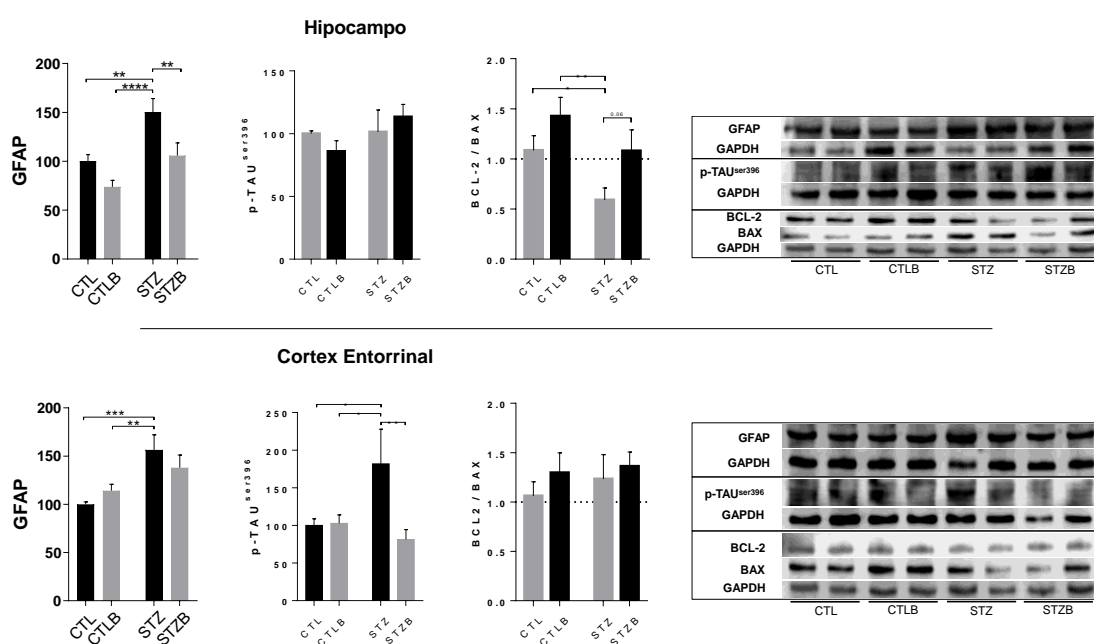


Figura 20. Quantificação do conteúdo proteico detectado por *immunoblotting* (A) do conteúdo total de proteína GFAP, (B) da proteína tau fosforilada em serina 396 e (C) da relação BCL-2/BAX no hipocampo e no córtex entorrinal. Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; N = 7-8.

## 5.2. Efeito da benfotiamina em alterações metabólicas e hipotalâmicas resultantes da exposição à STZ

### 5.2.1 A exposição ao STZ-ICV provoca alterações no peso, composição da gordura corporal e comportamento alimentar



Após a ICV, os ratos tratados com STZ perderam peso durante os 30 dias de acompanhamento (Figura 21A). Essa diminuição foi acentuada na primeira semana e não foi recuperada durante o período experimental. A suplementação de BFT (grupo STZB) atenuou levemente a perda de peso corporal (Figura 21C, tendência  $p = 0,09$ ). Esse efeito da suplementação de BFT foi crônico, levando a uma diferença não significativa com o grupo controle ao final de 30 dias.

Para confirmar que a diferença não era apenas pela aleatoriedade no peso dos grupos, calculamos o ganho de peso semanal dos animais (Figura 21B). Assim, pudemos observar que a perda de peso dos grupos expostos à STZ é evidenciada na primeira semana e normalizada nas semanas seguintes. Embora não tenha havido diferenças significativas na terceira e na quarta semana, o ganho de peso dos animais da STZ foi menor ao comparar a área sob a curva entre os grupos (Figura 1C).

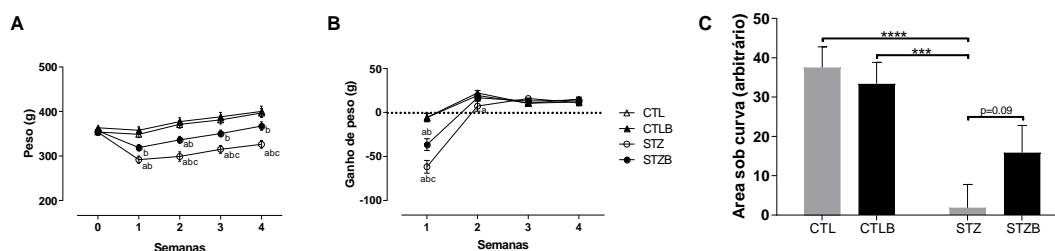


Figura 21. (A) Peso corporal semanal e (B) ganho de peso [a] = dif. para CTL; [b] = dif. para CTLB; [c] = dif. para STZB com significância  $p < 0,05$ . (C) Área sob curva de 30 dias de ganho de peso (unidades arbitrárias). Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*\*\*] =  $p < 0,001$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0,0001$ . N = 14~16.

A exposição ao STZ-ICV levou a uma alteração na composição da gordura corporal. A gordura visceral foi globalmente reduzida (Figura 22D). Particularmente, as gorduras retroperitoneal (Figura 22A) e epididimal (Figura 22C) diminuíram significativamente após ICV-STZ. A suplementação com BFT impediu a perda de gordura visceral induzida por STZ (Figura 22D).

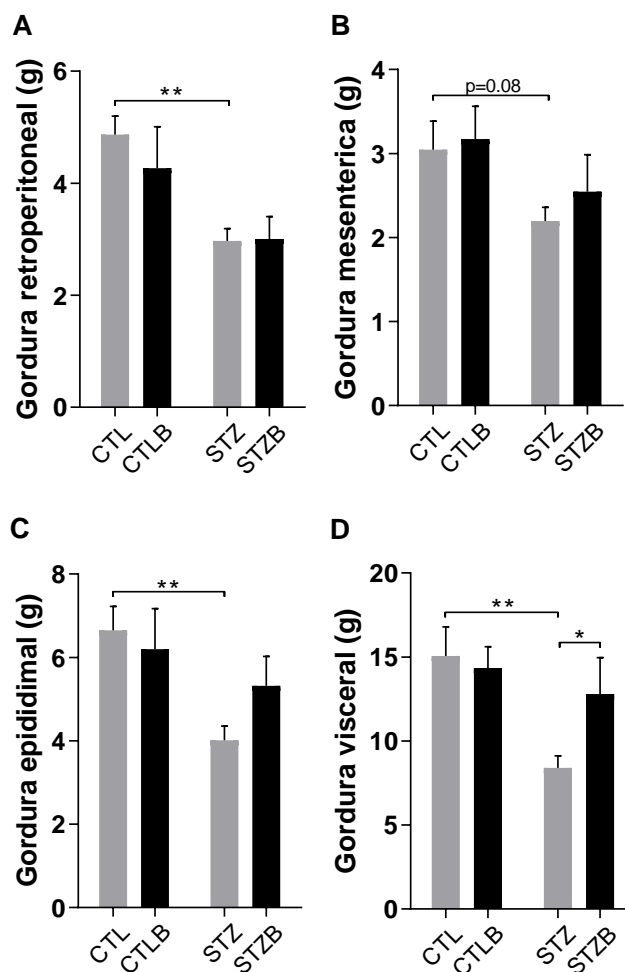


Figura 22. Peso das camadas de gordura abdominal (A) retroperitoneal, (B) mesentérico, (C) epididimal e (D) a soma dos três tecidos, apresentados como gordura visceral. Os resultados foram submetidos a uma anova de duas vias com o teste *post hoc* de Fischer [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ . N = 6-9.

Como a injeção de STZ-ICV induziu a perda de peso de uma maneira mais robusta durante a primeira semana, realizamos experimentos semelhantes em uma nova coorte, para estudar as consequências de curto prazo das intervenções sobre a quantidade de gordura visceral e o comportamento do consumo alimentar. A ingestão cumulativa de alimentos na primeira semana diminuiu com a STZ (Figura 23A). Além disso, o tratamento com BFT reverteu parcialmente essa diminuição. Os animais expostos à STZ comeram menos ao longo da semana, com uma diferença estatisticamente significativa no terceiro dia dos animais STZ. (Figura 23B). Da mesma forma, corroborando com os resultados da Figura 20A, os ratos tratados com STZ-ICV exibiram uma redução

robusta do peso corporal, que foi parcialmente e significativamente resgatada pela suplementação de BFT já a partir do dia 5 (Figura 23C). O conteúdo final de gordura visceral (Figura 23D) foi determinado no dia 7. Diferente da exposição a longo prazo, houve um efeito da STZ na perda de gordura visceral sem alterações em comparação ao grupo CTL, mas com o CTLB.

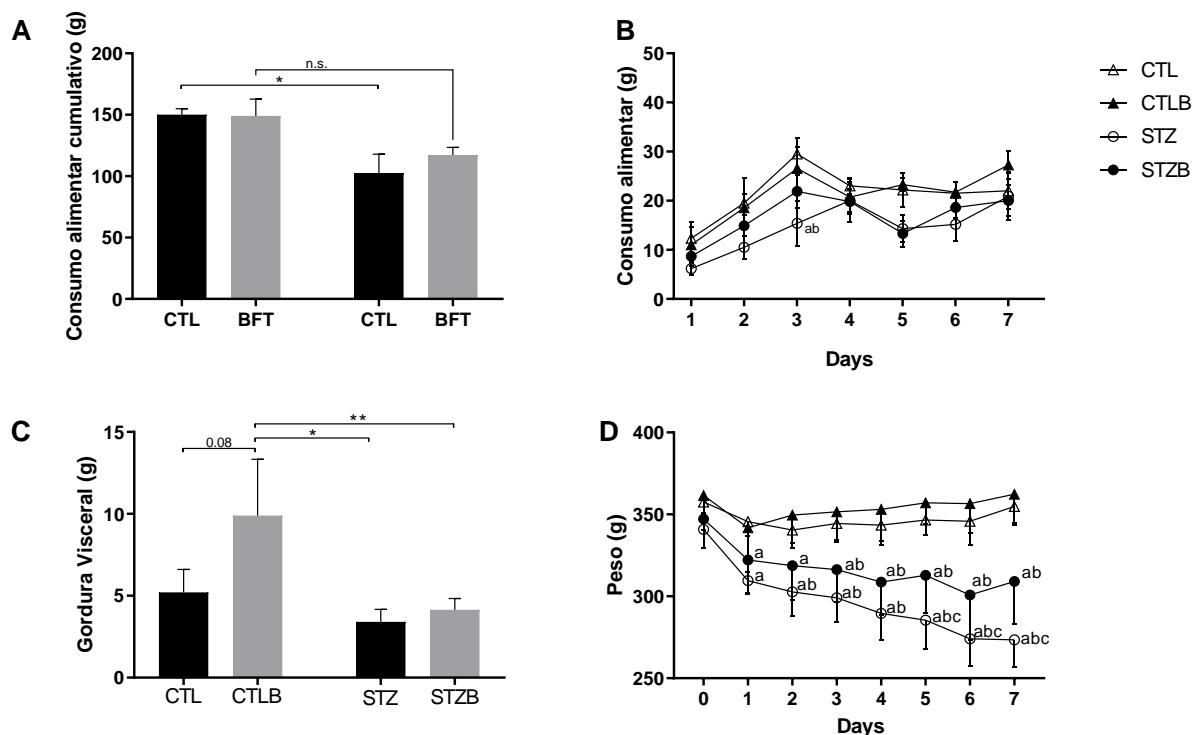


Figura 23. Consumo cumulativo de alimentos na primeira semana (A), consumo diário de alimentos (B), peso visceral do depósito de gordura 7 dias após a cirurgia (C) e peso corporal diário (D) na primeira semana após a injeção intracerebroventricular de estreptozotocina. Os resultados foram submetidos a uma anova de duas vias com o teste *post hoc* de Fischer [a] = dif. de CTL; [b] = dif. de CTLB; [c] = dif. de STZB com significância  $p < 0.05$ . [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [n.s.] = não significante. N=6-10.

### 5.2.2. Alterações hipotalâmicas após exposição ao STZ-ICV e tratamento BFT

Considerando as alterações metabólicas que observamos consecutivamente à injeção de STZ-ICV em ratos e o papel do hipotálamo no metabolismo periférico e central, investigamos as conseqüências da STZ no metabolismo do hipotálamo, na inflamação e na via de sinalização da insulina.

5.2.2.1. A estreptozotocina intracerebroventricular diminui a expressão hipotalâmica de GLUTs e aumenta a inflamação e apoptose.

Após STZ-ICV, a expressão gênica do transportador de glicose 1 (GLUT 1, Figura 24A), envolvida na absorção glial de glicose, e do transportador de glicose 2 (GLUT 2) (Figura 24B), envolvida na sensibilidade à glicose hipotalâmica, foram diminuídas. Também identificamos um aumento ligado à STZ do marcador de inflamação do astrócito hipotalâmico GFAP (Glial fibrillary acidic protein, Figura 24C). A razão BCL2/BAX, indicativa de sinalização apoptótica, foi determinada e mostrou sinalização pró-apoptose em animais expostos à STZ (Figura 24D). Por outro lado, o tratamento com benfotiamina não alterou a expressão dos dois transportadores GLUT1/2, nem alterou a inflamação hipotalâmica.

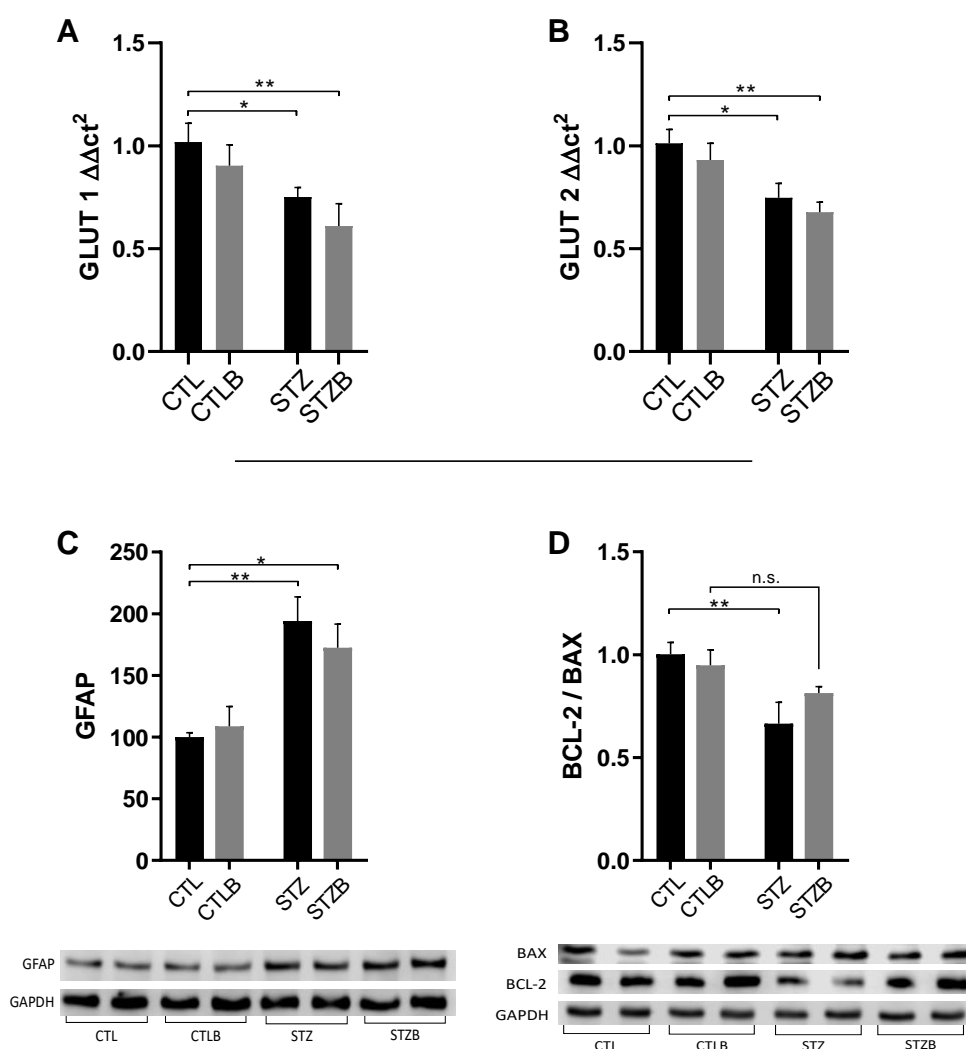


Figura 24. Expressão de mRNA dos transportadores de glicose GLUT1 (A) e GLUT2 (B). Expressão proteica do marcador de astrócitos reativos GFAP (C) e do marcador de sinalização

apoptótica pela razão BCL-2 / BAX (D). Os resultados foram submetidos a uma ANOVA de duas vias com o teste *post hoc* de Fischer [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [n.s.] = não significante.

#### 5.2.2.2. A benfotiamina melhora os parâmetros de sinalização da insulina no hipotálamo

A sensibilidade à insulina no cérebro é um pré-requisito da sinalização funcional do metabolismo periférico e central. Adicionalmente, a resistência à insulina é uma característica intrínseca dos cérebros de pacientes com DA (TALBOT *et al.*, 2012). Então, analisamos a via de sinalização da insulina hipotalâmica ao nível das proteínas totais e fosforiladas em condições fisiológicas (sem estimulação à insulina). Não observamos alteração no receptor hipotalâmico da insulina em ratos STZ-ICV (Figura 25A) embora haja um aumento relacionado ao STZ no PI3K, com diferenças significativas nos grupos STZ e STZB em comparação com os grupos controle (Figura 25B). A jusante, o principal regulador da sinalização da insulina, há um efeito da STZ na fosforilação do AKT na serina 473, mas não há diferença específica entre os grupos (Figura 25C). Estas alterações resultaram no aumento da fosforilação do epitopo inibidor p-Ser-21/9 de GSK3 $\alpha/\beta$  e dos epitopos ativadores p-Thr202/Tyr204 de ERK1/2 em animais STZ. Curiosamente, a BFT não levou a alterações na sinalização da insulina sob condições de controle. Embora, nos grupos expostos à STZ, a suplementação de BFT tenha resultado em aumento do conteúdo de receptores de insulina. Este efeito também foi observado nas GSK3 $\alpha/\beta$  (Figura 25D) e ERK1/2 (Figura 25E), resultando em uma reversão da fosforilação aumentada relacionada à STZ.

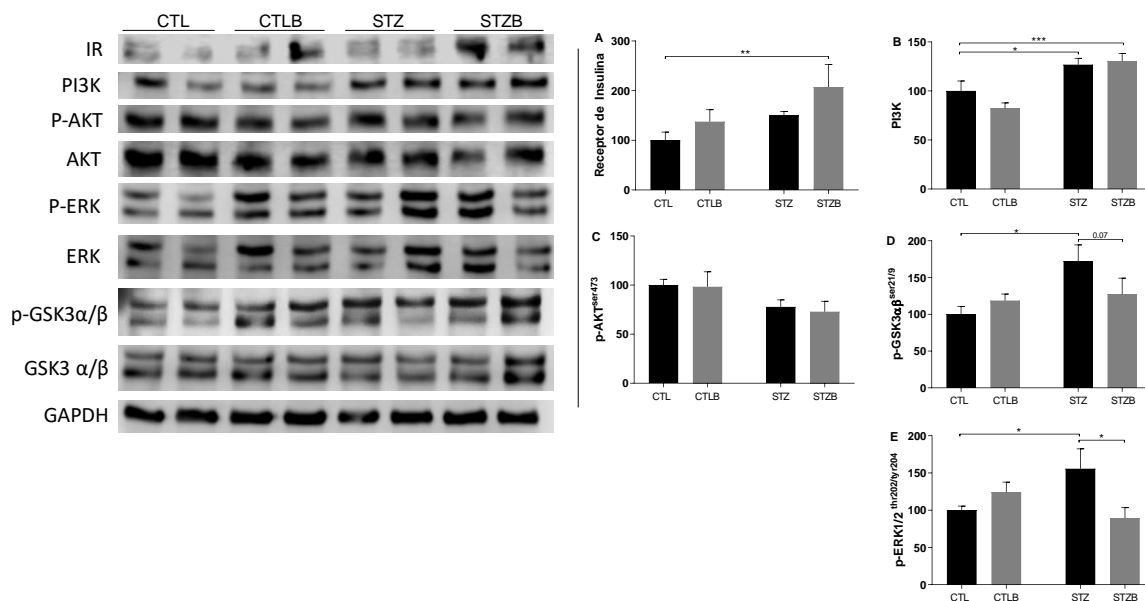


Figura 25. Detecção de proteínas da via de sinalização de insulina no hipotálamo detectada por imunoblotting. (A) conteúdo total de receptores de insulina e (B) PI3K total; (C) AKT fosforilada em serina 473, (D) GSK-3 $\alpha/\beta$  fosforilada em serina 21 e 9; (E) ERK fosforilada em treonina 202 e tirosina 204. Os resultados foram submetidos a uma ANOVA de duas vias com o teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$  N = 6-8.

### 5.2.3. Efeitos do tratamento com STZ e benfotiamina na viabilidade de uma cultura de células neuronais hipotalâmicas

Para entender melhor os mecanismos moleculares da disfunção hipotalâmica induzida por STZ e o tratamento com benfotiamina, usamos uma linha celular neuronal hipotalâmica para investigar mecanicamente a toxicidade de STZ no hipotálamo e os efeitos da BFT nesse contexto. Primeiramente foram analisadas a toxicidade da STZ e da BFT a fim de escolher uma dose de trabalho que não fosse totalmente tóxica para a STZ e que não fosse tóxica para a BFT (Figura 26).

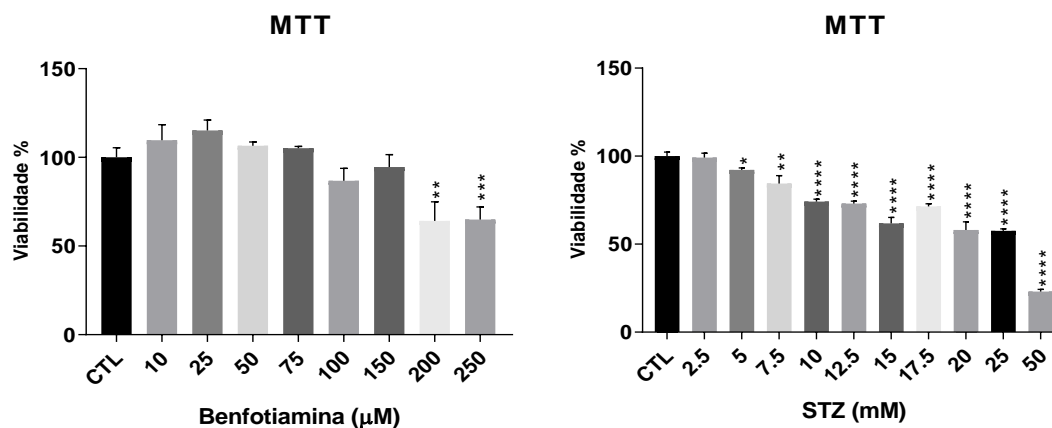


Figura 26. Teste de viabilidade celular com (MTT) após 24 horas de exposição à diferentes concentrações de (A) STZ e (B) BFT em células hipotalâmicas da linhagem CLU183. Os resultados foram submetidos à ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*]= $p<0.05$ ; [\*\*]= $p<0.01$ ; [\*\*\*\*]= $p<0.0001$ .

De acordo com os resultados, optamos por utilizar as doses de 50μM de BFT e 5mM de STZ. Estas doses também estão de acordo com prévios estudos do nosso laboratório com STZ(CRUNFLI *et al.*, 2018). Como a benfotiamina não parece ser tóxica em baixa dosagem, decidimos por utilizar a dose de 50μM baseando-nos na literatura.

#### 5.2.4 Influencia do receptor de insulina na toxicidade da estreptozotocina.

Para esta análise, foram utilizadas células CLU183 com ausência do receptor de insulina (IRKO) expostas por 24h a 5mM de STZ. Uma hora após o insulto com STZ as células foram tratadas com 50μm BFT. O insulto com STZ diminuiu a viabilidade celular tanto no grupo controle quanto no grupo IRKO, sendo a redução mais acentuada no grupo IRKO. O tratamento com BFT não foi capaz de reverter os efeitos deletérios do insulto com STZ na viabilidade celular (Figura 27).

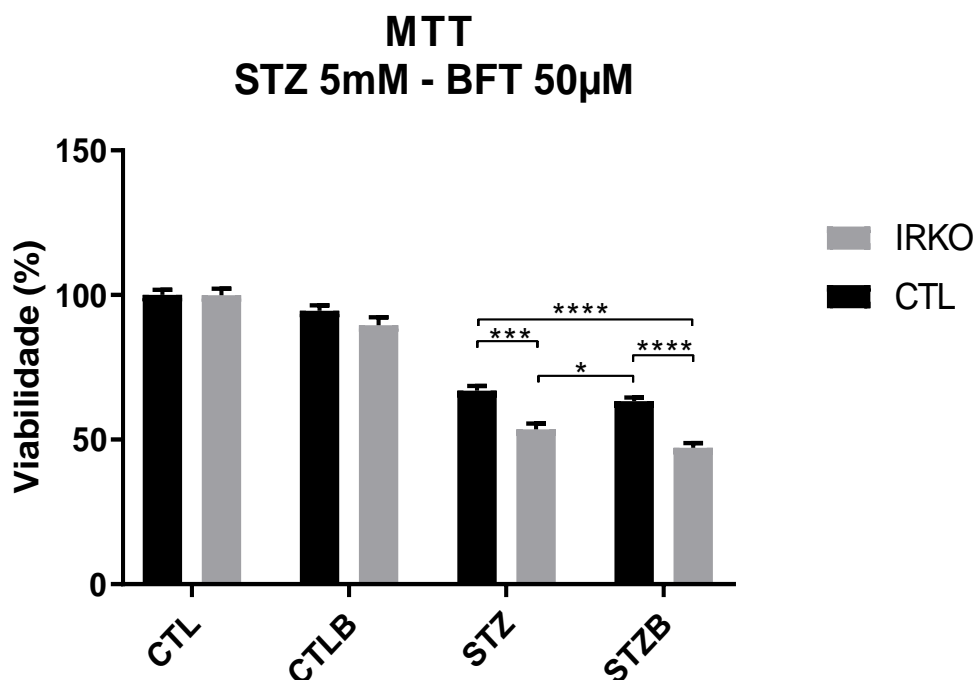


Figura 27. Teste de viabilidade celular com (MTT) após 24 horas de exposição à STZ e/ou BFT em células nocaute para receptor de insulina (IRKO). Os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ ; [\*\*\*\*] =  $0.0001$ .

#### 5.2.5. A exposição à estreptozotocina perturba a captação neuronal de tiamina

Para entender se a exposição ao STZ é capaz de alterar a função do transporte de tiamina, analisamos a expressão do transportador de membrana tiamina 1 (Slc19a2 - THTR1) e do transportador mitocondrial de difosfato de tiamina (Slc25a19 - mtTPPTR). Após 24 horas de exposição ao STZ, ocorre uma redução na expressão gênica do THTR1 (Figura 28A). Essa redução não é alterada quando o meio é suplementado com tiamina ou benfotiamina. No entanto, a STZ não leva a alterações na expressão gênica do transportador de mitocôndrias TDP (Figura 28B).



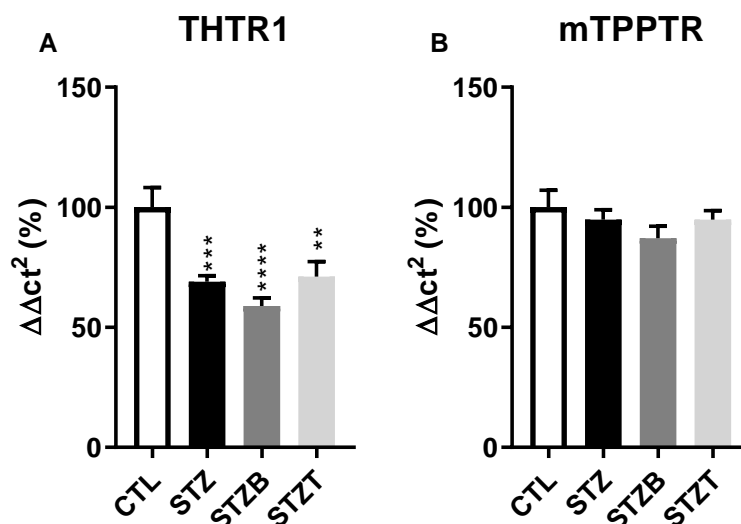


Figura 28. Expressão gênica, mostrada como  $\Delta\Delta ct^2$ , do transportador de tiamina THTR-1 (SLC19A2) e do transportador mitocondrial de difosfato (pirofosfato) de tiamina mTPPTR (SLC25A19) no hipotálamo após exposição à estreptozotocina (STZ) e tratamento com benfotiamina (STZB) ou tiamina (STZT). Os resultados foram submetidos a uma anova de uma via com o teste *post hoc* de Fischer. [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0,001$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0,0001$ ; N = 4; n = 3.

Para investigar a relação da expressão diminuída do transportador THTR-1 com alterações nas concentrações de tiamina, realizamos uma avaliação das concentrações de tiamina livre, monofosfato de tiamina e difosfato de tiamina após 24 horas de exposição das células CLU183 à STZ e/ou BFT. O resultado mostra que a STZ não altera as concentrações de tiamina e seus ésteres de fosfato. Como esperado, a BFT aumentou as concentrações de tiamina livre e monofosfato de tiamina, mas não há alteração nos níveis de difosfato de tiamina. Curiosamente, como visto nos animais, há um aumento nos níveis de tiamina no grupo STZB em comparação com o CTLB (Figura 29).

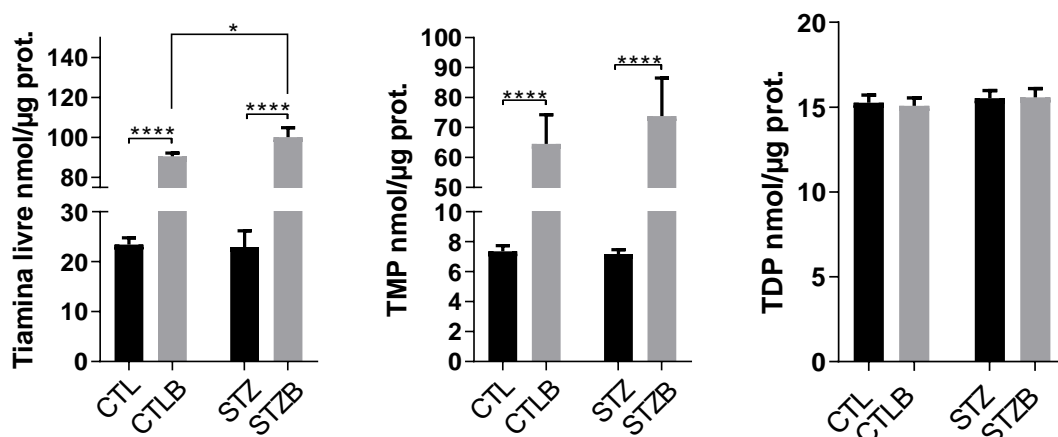


Figura 29. Concentrações de tiamina livre, monofosfato de tiamina (TMP) e difosfato de tiamina (TDP) após 24 horas de exposição à estreptozotocina e / ou benfotiamina na linha celular hipotalâmica CLU183. Os resultados foram submetidos a uma anova de duas vias com o teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0.0001$ ; N = 6.

Para avaliar os efeitos da STZ na dinâmica da captação de tiamina, expusemos a linha celular CLU183 à STZ por 24h em um meio deficiente em tiamina. Depois disso, suplementamos o meio com tiamina e observamos uma diminuição nas concentrações de tiamina às 1h e 2h. Essa diminuição é normalizada após 4h. Por outro lado, a STZ leva a um aumento de curto prazo nas quantidades de TMP, evidenciadas pelas concentrações de 1 hora no grupo STZ. As concentrações de TDP não são diferentes, mas é claro que a exposição STZ mudou a dinâmica da síntese de TDP (Figura 30).

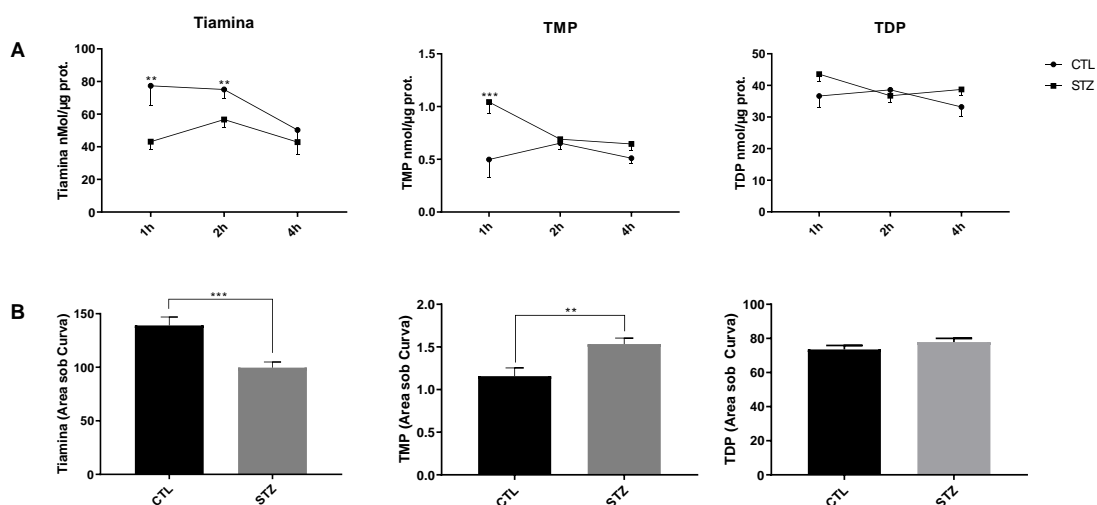


Figura 30. Captação de tiamina, monofosfato de tiamina (TMP) e difosfato de tiamina (TDP) após 24 horas de exposição à STZ em um meio de cultura deficiente em tiamina. Os gráficos

mostram (A) as curvas de 1, 2 e 4 horas de suplementação de tiamina e (B) a área sob as curvas de cada composto de tiamina. As curvas foram submetidas a uma anova de duas vias com o *post hoc* de Fischer. Os resultados da área sob curva foram submetidos ao teste-t não pareado. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ . N = 6.

### 5.2.6. A benfotiamina, mas não a tiamina, aumenta a sensibilidade à insulina nos neurônios hipotalâmicos

Para investigar a capacidade da BFT e da TH de alterar a sensibilidade à insulina, fizemos um experimento de estimulação à insulina após a exposição a ambos os medicamentos em um meio deficiente em tiamina. Os resultados mostraram que a benfotiamina, mas não a tiamina, aumenta a sensibilidade à insulina. Após a estimulação com 200 nM de insulina, há um aumento na fosforilação de IRS1 e AKT apenas no grupo estimulado por BFT (Figura 31A). Embora a tiamina não leve a um aumento na sensibilidade à insulina, os resultados do *oxyblot* mostram que reverte a carbonilação da proteína relacionada à deficiência de tiamina, provando que o composto teve um efeito no experimento e que o aumento na sensibilidade à insulina é um adicional efeito presente apenas na BFT (Figura 31B).

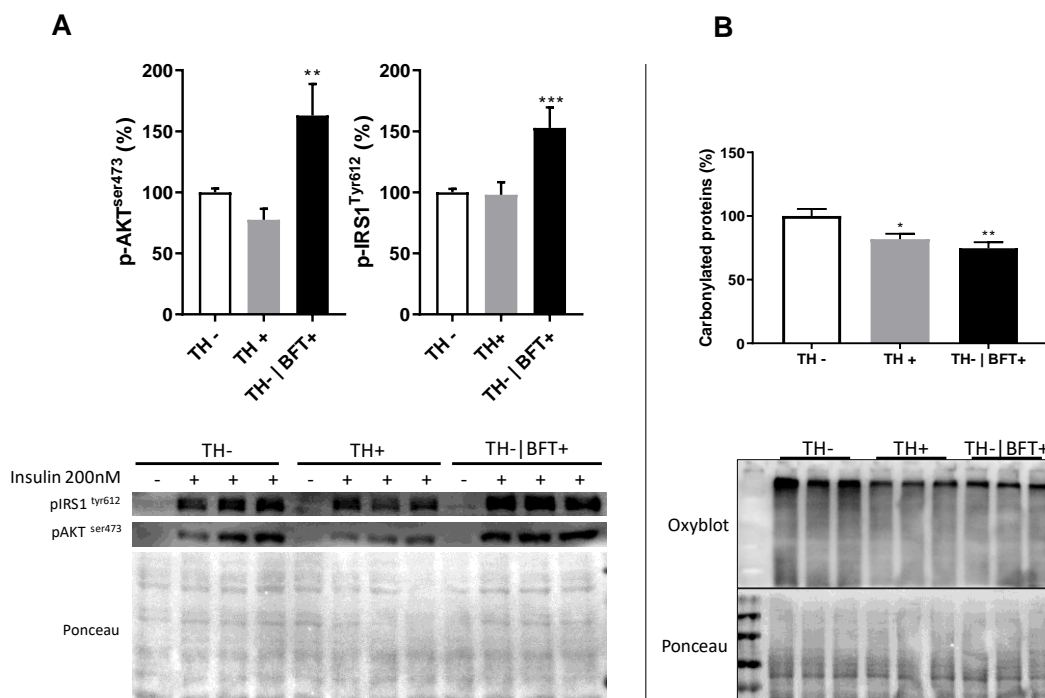


Figura 31. (A) Estimulação da insulina das células CLU183 após 21 h de exposição à tiamina e benfotiamina em um meio deficiente em tiamina. (B) Proteínas carboniladas detectadas por *Oxyblot* após 21 h de exposição à tiamina e benfotiamina em meios deficientes em tiamina. Os

resultados foram submetidos a uma anova de uma via com o teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ . N=5; n=3 em A e N=4; n=3 em B.

A seguir, com o objetivo de analisar se a STZ é capaz de perturbar a sensibilidade à insulina e se a BFT pode reverter essa provável perturbação, estimulamos as células com insulina, como no experimento anterior, após a exposição à STZ e/ou BFT. Curiosamente, o STZ não leva à diminuição da sensibilidade à insulina, mas a BFT aumentou a fosforilação de AKT apenas em na presença de STZ (Figura 32).

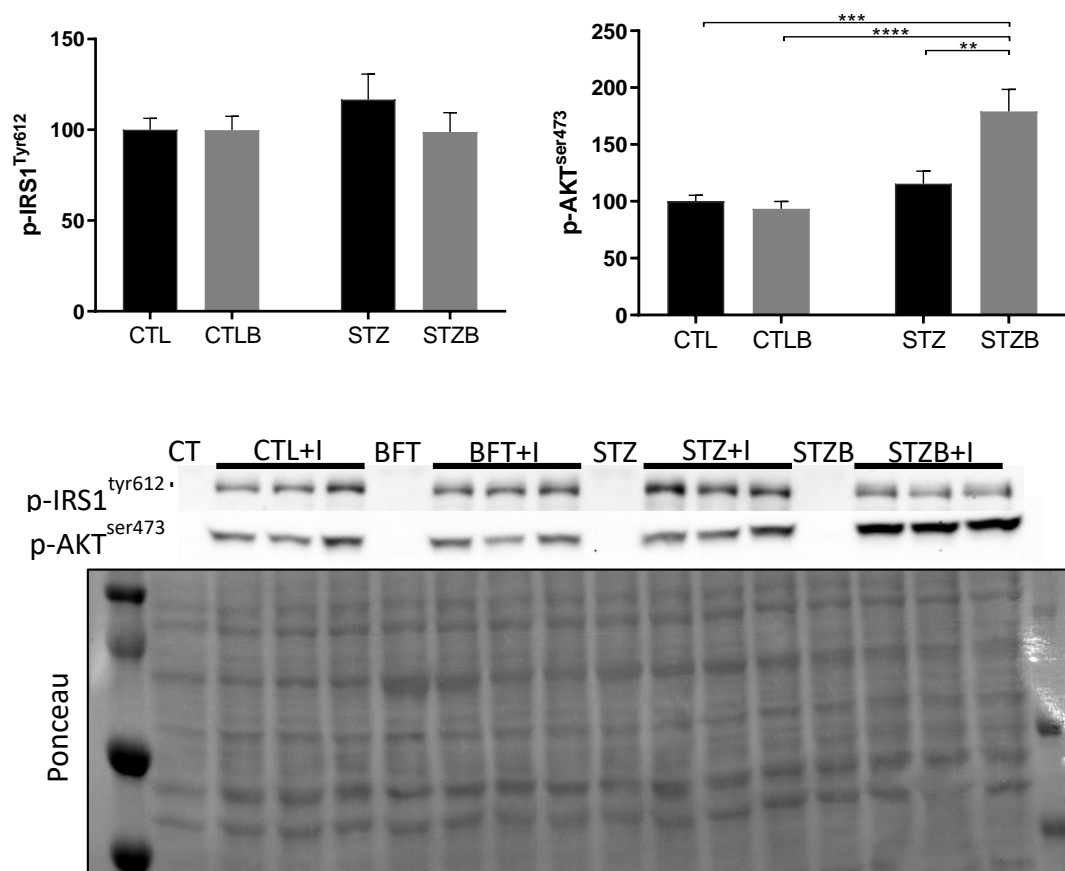


Figura 32 Estimulação da insulina das células CLU183 após exposição a STZ e/ou BFT. Após a estimulação, foi avaliada a fosforilação de IRS-1 em tirosina 612 e AKT em serina 473 por *immunoblotting*. Os resultados foram submetidos a uma anova de duas vias com o teste *post hoc* de Fischer. [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0.0001$ . N = 4; n = 3.

### 5.2.7. Exposição à estreptozotocina leva a uma disfunção da resposta ao estresse do retículo endoplasmático

Como a STZ não leva à resistência à insulina no experimento anterior, embora a BFT tenha aumentado a sensibilidade à insulina, investigamos a resposta ao estresse do retículo endoplasmático (RE) após a exposição à STZ. O aumento da expressão gênica da proteína de imunoglobulina de ligação (BIP) e o *splicing* da proteína 1 de ligação à X-box (XBP1) mostram uma resposta típica ao estresse do RE. Embora, uma diminuição inesperada dos níveis da proteína fator de transcrição de ativação 4 (ATF4) leve a uma diminuição da proteína homóloga C/EBP (CHOP) e do mRNA equivalente (Figura 33).

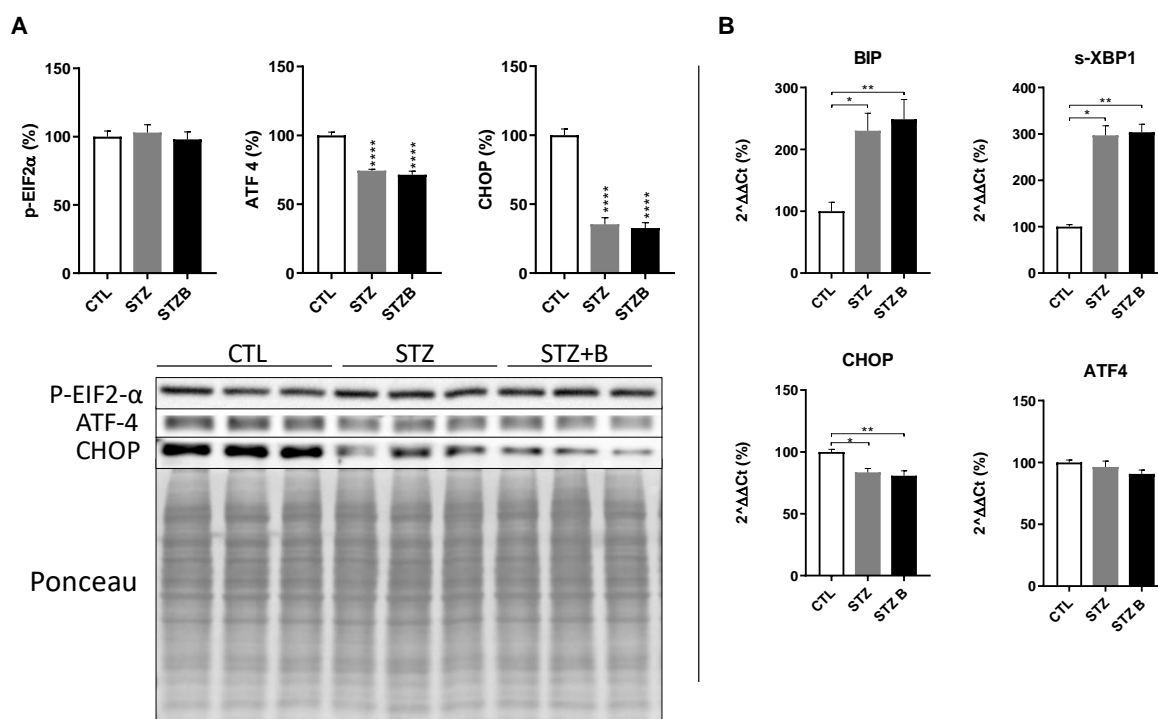


Figura 33. Expressão de (A) proteína e (B) mRNA de proteínas relacionadas à resposta ao estresse do retículo endoplasmático. Os resultados foram submetidos a uma anova de uma via com o teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0.0001$ ; N = 4; n = 3.

#### 5.2.8. A Benfotiamina reverte a diminuição da proteína mitocondrial de choque térmico HSP60 induzida por STZ

Para verificar a influência da estreptozotocina na resposta ao estresse mitocondrial (MSR), avaliamos o mRNA (Figura 34A) e o conteúdo proteico (Figura 34B) das proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*) HSP60 e HSP10, reguladoras do dobramento de proteínas mitocondriais. Após 24 horas de estimulação com STZ, houve uma diminuição

da expressão gênica e do conteúdo proteico de ambas as proteínas. Curiosamente, a BFT foi capaz de suprimir a diminuição de HSP60 em nível proteico, mas não de expressão gênica

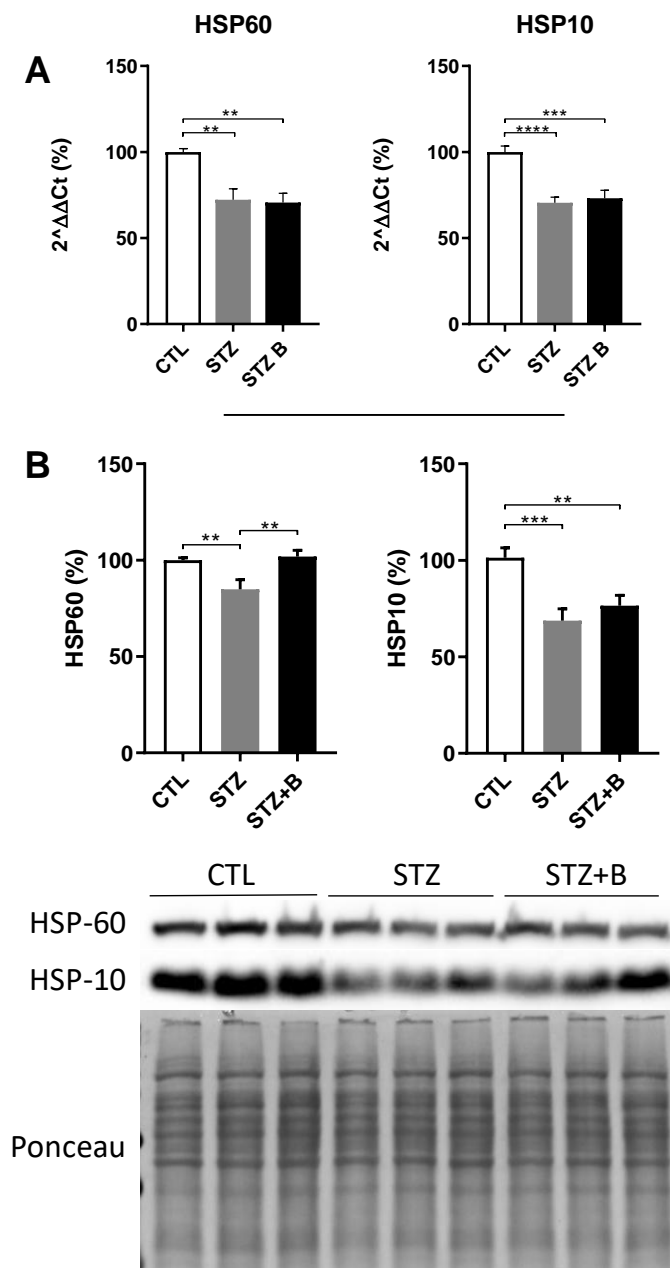


Figura 34. (A) mRNA e (B) conteúdo proteico das proteínas de choque térmico mitocondrial HSP60 e HSP10 após 24 horas de exposição à estreptozotocina, em combinação (STZ + B) ou não (STZ), com Benfotiamina. Os resultados foram submetidos a uma anova de uma via com o teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ ; [\*\*\*\*] =  $p < 0.0001$ . N = 4; n = 3.

*5.2.9. A benfotiamina reverte a disfunção mitocondrial induzida pela estreptozotocina.*

Para verificar a resposta geral da respiração celular das mitocôndrias à exposição à STZ e BFT, realizamos um teste de protocolo de *mitostress* para avaliar parâmetros do metabolismo energético das mitocôndrias (Figura 35). O teste foi realizado após 24 horas de estimulação em duas condições: com e sem tiamina no meio de cultura. Nas células no meio com tiamina, após a exposição ao STZ, ocorreu uma diminuição na respiração basal. Essa diminuição é revertida nas células STZB. Curiosamente, na ausência de tiamina, não há diminuição da respiração com STZ, mas a respiração já é baixa no grupo controle. A respiração basal aumentada relacionada à benfotiamina ocorre no grupo CTLB, mas não no grupo STZB. A respiração máxima, independente da atividade da ATP sintase, não é modificada pela STZ, mas aumenta em todos os grupos tratados com BFT. A produção de ATP apresenta uma melhora relacionada à BFT apenas na presença de tiamina.

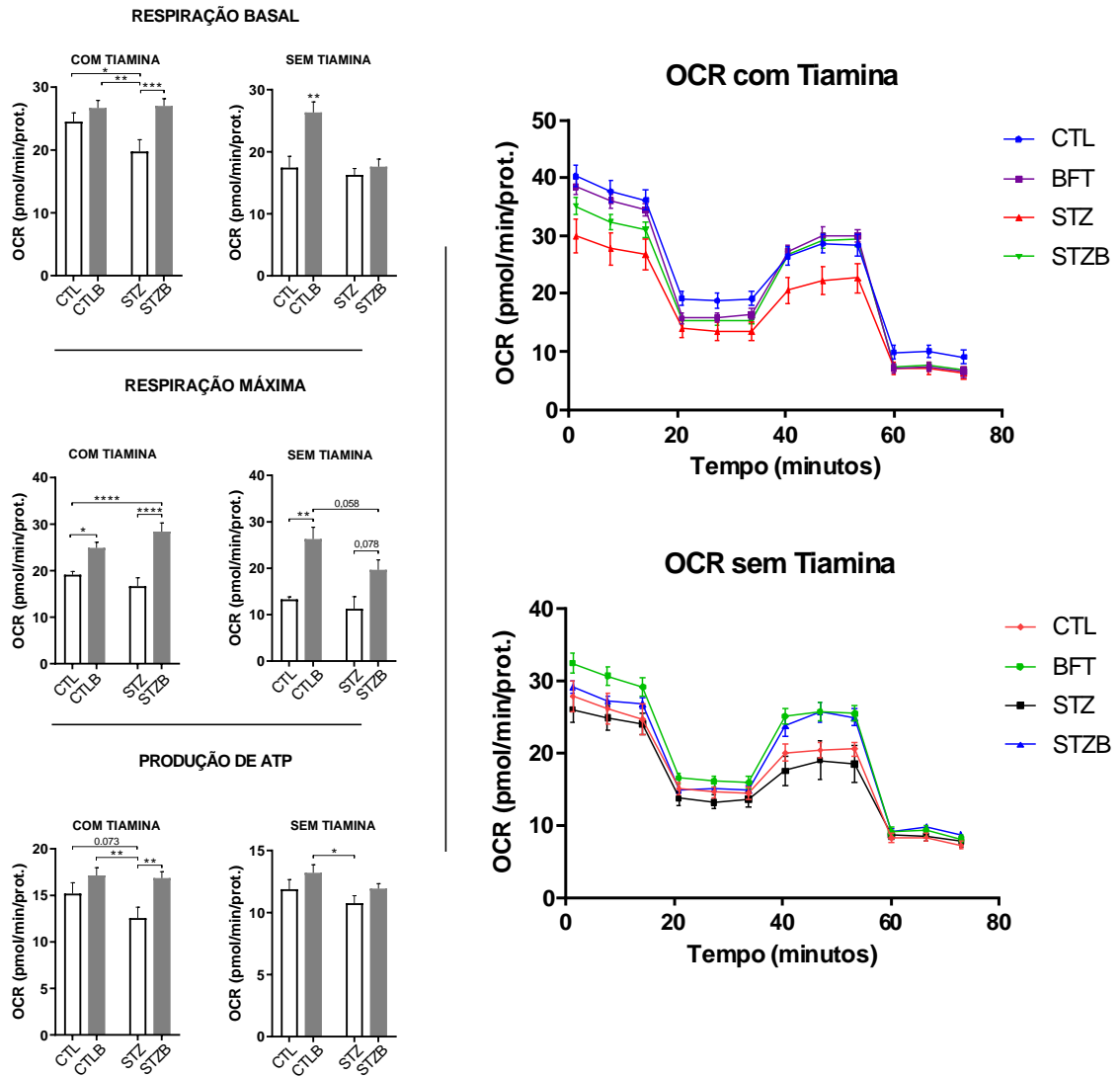


Figura 35. Respiração mitocôndria de células CLU 183 após exposição à estreptozotocina (STZ) e / ou benfotiamina (BFT) em um meio de cultura com ou sem tiamina. Os parâmetros medidos são (A) Respiração Basal, (B) Respiração Máxima e (C) produção de ATP. Os resultados foram submetidos a uma ANOVA de duas vias com o teste *post hoc* de Fischer. [\*] =  $p < 0.05$ ; [\*\*] =  $p < 0.01$ ; [\*\*\*] =  $p < 0.001$ .



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Efeito da Benfotiamina em aspectos funcionais e moleculares da memória e progressão da Doença de Alzheimer

A partir dos dados coletados até o momento, podemos afirmar que a suplementação de BFT foi capaz de reverter o déficit cognitivo no modelo STZ-icv de DA esporádica. Essa melhora parece ser resultado tanto de alterações na via de sinalização de insulina, quanto de um aumento no metabolismo energético provocado pelas alterações fisiológicas resultantes da suplementação, como maior quantidade de TDP e de transportadores de tiamina.

Tem-se discutido nos últimos anos o papel da tiamina no sistema nervoso. Estudos têm relatado que este nutriente é essencial não só para funções energéticas, mas para funções não co-enzimáticas que vão desde a modulação de sinalizações celulares a manutenção do crescimento e arborização dendrítica dos neurônios (LIU *et al.*, 2017; MKRTCHYAN *et al.*, 2015). Estudos anteriores apesar de demonstrarem alterações positivas relacionadas à suplementação com BFT foram pouco efetivos em elucidar os mecanismos relacionados. Apesar de as funções ‘canônicas’ da BFT serem relacionadas ao metabolismo energético, como cofator de enzimas importantes do ciclo do ácido cítrico, pouco tem se estudado sobre o efeito deste nutriente nestas funções específicas. Estudos recentes têm relatado melhoras cognitivas relacionadas à suplementação com BFT, relacionando-as com efeitos não co-enzimáticos da molécula, que hipoteticamente teria efeitos diversos não ligados com sua função amplamente descrita na literatura.

Já é de amplo entendimento também que a deficiência de tiamina causa demência e alterações fisiopatológicas semelhantes à DA, e que há uma mudança tanto nas concentrações de tiamina sanguínea de pacientes com DA, quanto na atividade de enzimas que usam esse nutriente como cofator no cérebro de pacientes com DA (BUTTERWORTH; BESNARD, 1990; GIBSON *et al.*, 2013; GIBSON *et al.*, 1988; HÉROUX *et al.*, 1996). Ultimamente tem aumentado o foco no metabolismo da tiamina no tratamento da DA em vistas de reverter estas alterações. No entanto, o tratamento com cloreto de tiamina não leva a efeitos positivos nos sintomas da DA (BLASS *et al.*, 1988; NOLAN *et al.*,

1991). Como a tiamina é uma vitamina solúvel em água e depende do transporte através da membrana para entrar na célula, foi proposto o uso de um composto análogo lipossolúvel como tratamento (GIBSON *et al.*, 2016).

Deste modo, recentemente sugeriu-se o uso de análogos sintéticos de tiamina como suplementação com o objetivo de suprir as deficiências descritas acima (GIBSON *et al.*, 2013; GIBSON *et al.*, 2016). Dentre eles, o análogo mais promissor é a BFT, um composto com maior biodisponibilidade conferindo maiores concentrações de tiamina em diferentes tecidos. Porém, os dados sobre a capacidade da suplementação de BFT em aumentar os níveis de tiamina, e seus ésteres fosfatados, no cérebro permanecem conflitantes. NETZEL *et al.* (2000) encontraram, em animais saudáveis, uma quantidade 90% maior de TDP (a forma metabolicamente ativa da tiamina) cerebral após suplementação por 6 meses. HILBIG e RAHMANN (1998) após suplementação aguda de tiamina e BFT marcada com isótopo radioativo, observaram uma incorporação até 25 vezes maior da BFT no cérebro, comparado com a tiamina.

Já em estudos mais recentes, que relacionaram a BFT como possível estratégia terapêutica, o tratamento com benfotiamina em pacientes com DA, bem como em modelos animais de DA, leva a algumas melhorias nos testes de memória e na progressão da doença (PAN *et al.*, 2016; PAN *et al.*, 2010; TAPIAS *et al.*, 2018). Porém este composto parece não ter sido capaz de aumentar as concentrações cerebrais de tiamina após suplementação. PAN *et al.* (2010) apesar de terem relatado melhora em um modelo transgênico de Alzheimer, não conseguiram demonstrar alterações nas concentrações intracelulares de TDP após a suplementação, concluindo que as alterações observadas poderiam ser de efeitos da interação da tiamina livre na via de sinalização de insulina cérebro, e possíveis efeitos sistêmicos da suplementação de BFT. Vale ressaltar que os autores não avaliaram as concentrações de tiamina nos animais transgênicos, se atendo a observar esta variável apenas em animais *wild type*, e com um tempo de suplementação menor que o utilizado no estudo com os animais transgênicos. VIGNISSE *et al.* (2017), em um modelo de estresse predatório, também observaram mudanças na via de sinalização de insulina, com menor expressão gênica da proteína GSK-3 $\beta$  (mas não na fosforilação), mesmo sem notar alterações nas concentrações de tiamina cerebrais.

No nosso estudo, além de quantificar as concentrações de tiamina, avaliamos a densidade de transportadores de tiamina THTR-1 no hipocampo e no córtex entorrinal, além da atividade hipocampal da enzima PDH, que tem a tiamina como cofator limitante de sua atividade. Observamos que a suplementação de BFT foi capaz de alterar as concentrações de TDP nos animais suplementados. Observamos também que, como um provável efeito subsequente da suplementação, houve um aumento na densidade de transportadores de tiamina e melhora na atividade da enzima PDH nos animais suplementados, evidenciando que além de aumentar as concentrações de TDP cerebrais, a suplementação melhorou a atividade metabólica, e os resultados parecem ser relacionados às funções coenzimáticas da tiamina.

É bem estabelecido na literatura o uso do modelo experimental de injeção intracerebroventricular de STZ para obtenção de déficits cognitivos com características semelhantes ao encontrado na DA esporádica. Já foi demonstrado pelo nosso grupo que a injeção intracerebroventricular de 3mg/kg de STZ promove déficit cognitivo já a partir de três horas após a cirurgia, perdurando até um mês após a indução (SANTOS *et al.*, 2012). Nossos resultados confirmaram que mesmo com uma dose menor (2mg/kg) o déficit cognitivo, observado pelo menor índice de reconhecimento de objetos é notado após um mês de injeção da droga. Esses resultados foram acompanhados por um maior comportamento exploratório no teste de campo aberto, que além de demonstrar que os animais submetidos à injeção de STZ não apresentam prejuízos motores, também sugere um efeito ansiogênico produzido pela STZ, já relatado na literatura (PINTON *et al.*, 2011). Uma análise mais detalhada, no entanto, seria necessária para confirmar essa manifestação comportamental, com o uso de outros testes comportamentais como o labirinto em cruz elevado.

Após tratamento com BFT, foi percebido que o déficit cognitivo causado pela STZ foi revertido observando a capacidade de memorização tanto no teste de reconhecimento de objeto em curta duração (1h) quanto em longa duração (24h). As alterações no comportamento exploratório dos animais no teste de campo aberto também foram revertidas com a suplementação. Esta melhora no déficit cognitivo encontrado em nosso modelo, também foi relatada em modelos genéticos de DA assim como modelos de depressão e estresse predatório

(MARKOVA *et al.*, 2017; PAN *et al.*, 2010; VIGNISSE *et al.*, 2017), evidenciando os efeitos positivos da BFT no comportamento.

Outro achado em nosso estudo que reforça a ideia de que a BFT tem efeitos importantes sobre a cognição foi a maior densidade da subunidade GluN2B dos receptores de glutamato do tipo NMDA no córtex entorrinal e no hipocampo dos animais STZB. É bem relatado na literatura que na DA ocorre uma diminuição na densidade dos receptores NMDA, principalmente nas regiões do hipocampo e do córtex entorrinal, intimamente ligada à progressão da doença (KRAVITZ; GAISLER-SALOMON; BIEGON, 2013).

A subunidade GluN2B é a mais funcional das subunidades regulatórias, por permitir um fechamento mais lento do canal e assim, maior influxo de cálcio, sendo essencial para o fenômeno da potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *long-term potentiation*), e conseqüente maior plasticidade sináptica (BARRIA; MALINOW, 2005). No hipocampo isto representa um passo importante no processo de formação de memória (CLAYTON *et al.*, 2002). Deste modo, o efeito da BFT na densidade de GluN2B é um dos fatores que podem explicar a capacidade de reconhecimento de objeto dos animais STZB encontrada nos testes.

O déficit cognitivo encontrado no modelo de STZ-ICV se deve além de uma neuroinflamação aguda provocada pelo estresse oxidativo da droga nos primeiros dias, uma disfunção na via de sinalização de insulina (GRÜNBLATT *et al.*, 2007; KRASKA *et al.*, 2012). Assim, avaliamos o efeito da suplementação de BFT na expressão de proteínas da via de sinalização de insulina. Os resultados demonstram que a injeção de STZ na dose de 2mg/kg provocou uma aparente disfunção nesta via, evidenciada pela menor fosforilação do receptor de insulina no hipocampo. Além deste resultado, foi percebida uma maior fosforilação de ERK1/2 no hipocampo e no córtex entorrinal após injeção de STZ. Este efeito pode ser resultado de um maior estresse oxidativo, já relatado neste modelo, que pode ativar sinalização de ERK para apoptose (CHEUNG; SLACK, 2004; SHARMA; GUPTA, 2001) e, no contexto da AD, também é capaz de fosforilar a proteína tau e promover a criação de emaranhados neurofibrilares (GUO *et al.*, 2017).

O tratamento com BFT foi capaz de reverter as alterações provocadas pela STZ no receptor de insulina. Além disso, também diminuiu a fosforilação de ERK

1/2 no hipocampo e normalizou a fosforilação dessa proteína no córtex entorrinal, evidenciando a capacidade da BFT de modular proteínas da via de sinalização de insulina neste modelo. Outra proteína da via de sinalização de insulina modulada pela suplementação de BFT, a proteína GSK3 $\alpha/\beta$ , fosforilada em serina 21/9 tem sua função desativada. Juntas, a desativação destas duas proteínas promove um fator neuroprotetor importante na DA, visto que as mesmas são importantes quinases da proteína tau, promovendo hiperfosforilação da mesma e criação de emaranhados neurofibrilares (GUO *et al.*, 2017; HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; HERNANDEZ; LUCAS; AVILA, 2013).

O tratamento com BFT também foi capaz de reverter a inflamação proveniente da injeção de STZ. É bem descrito na literatura o efeito inflamatório da injeção de STZ, aumentando a concentrações de citocinas inflamatórias como TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (RAI *et al.*, 2013; 2014). Nós utilizamos como um indicativo da inflamação, a expressão de GFAP, que se mostrou aumentada no hipocampo e córtex entorrinal dos animais STZ e em níveis semelhantes aos do grupo controle após tratamento com BFT.

## *6.2. Efeito da benfotiamina em alterações metabólicas e hipotalâmicas resultantes da injeção de STZ intracerebroventricular*

Tem crescido nos últimos anos a utilização do modelo experimental de injeção intraventricular de STZ afim de provocar alterações no metabolismo de insulina cerebral sem gerar alterações na sinalização de insulina periférica (LABAK *et al.*, 2010; LESTER-COLL *et al.*, 2006). Porém, foi observado no nosso estudo que apesar da manutenção do metabolismo de insulina periférico, os animais tratados com STZ passam por uma modificação do peso corporal e do consumo alimentar, que parecem ser resultados de alterações na fisiologia hipotalâmica. Ainda, a suplementação com BFT parece reverter pelo menos alguns desses parâmetros avaliados neste estudo.

É sabido que idosos com AD também tem, além de déficit cognitivo, alterações metabólicas importantes que podem influenciar na qualidade de vida durante a senescência, como distúrbios do sono, perda de peso e alterações neuroendócrinas. Essas alterações podem ser manifestadas antes de um

comprometimento cognitivo e até ser usadas como preditores para a doença (JOHNSON; WILKINS; MORRIS, 2006; MUSIEK; XIONG; HOLTZMAN, 2015; WHITE *et al.*, 1996).

É bem difundido na literatura o papel do hipotálamo no controle do metabolismo energético (ROH; SONG; KIM, 2016). Alterações hipotalâmicas na via de sinalização de insulina podem levar a um desbalanço na proporção de proteínas de vias orexigênicas e anorexigênicas e alterar a regulação da homeostase energética corporal, podendo afetar parâmetros como o apetite a eficiência energética e a termogênese (GROSSBERG; SCARLETT; MARKS, 2010; TIMPER; BRUNING, 2017). Nesse sentido, o segundo experimento teve o objetivo de avaliar o efeito da STZ em parâmetros relacionados ao metabolismo, como o consumo alimentar, peso corporal e da gordura visceral, e alguns parâmetros hipotalâmicos relacionados ao controle destas variáveis metabólicas.

Além de possíveis modificações diretas da STZ na via de sinalização de insulina, é possível que em nosso modelo haja uma menor disponibilidade intracelular de tiamina, pois a manutenção da mesma exige transporte vesicular dependente de microtúbulos na célula. Já é bem descrito na literatura que deficiência de tiamina pode resultar em hiperfosforilação de tau e acúmulo de  $\beta$ -amilóide. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa já demonstraram um acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amilóide no hipotálamo de ratos submetidos à icv-STZ (SANTOS *et al.*, 2012).

Os resultados gerais deste experimento mostram um efeito negativo da STZ no consumo alimentar, composição corporal e função hipotalâmica. A exposição à STZ interrompe a resposta das células hipotalâmicas ao estresse, desencadeando uma deficiência na resposta mitocondrial ao estresse, apoptose e diminuição na produção de energia nas mitocôndrias. Por outro lado, o tratamento com benfotiamina mostra um efeito protetor contra o estresse celular ligado à STZ, aumentando a sensibilidade à insulina e melhorando a função das mitocôndrias.

Até o momento, não há achados detalhados relatados na literatura sobre os efeitos da injeção central de STZ no hipotálamo e no metabolismo sistêmico. Em nosso estudo, descobrimos que o STZ-ICV leva à hiperfosforilação hipotalâmica de ERK 1/2. A fosforilação de ERK 1/2 no núcleo arqueado é um

mediador da estimulação vagal para diminuir o peso corporal, estimular a anorexia e ativar a termogênese (RAHMOUNI *et al.*, 2009). Diferentemente do que é relatado sobre outras estruturas, o STZ-ICV leva à inibição da proteína GSK3 hipotalâmica. É interessante ressaltar que a literatura mostra que a superexpressão específica de neurônio da GSK3 $\beta$  no hipotálamo mediobasal exacerba a hiperfagia, a obesidade e o comprometimento da tolerância à glicose induzida por uma dieta rica em gordura, enquanto exercia pouco efeito nos controles alimentados com ração padrão (BENZLER *et al.*, 2012). Então, a inibição da GSK3 também pode ser um fator que leva à diminuição do peso corporal. Juntos, esses dois resultados ajudam a explicar a perda de peso e a lipodistrofia neste modelo experimental de DA. A STZ-ICV também levou à inflamação hipotalâmica e maior sinalização de apoptose, características que se relacionam à lipodistrofia e perda de peso.

Serendipidamente, mostramos pela primeira vez que a injeção central de STZ leva à diminuição das concentrações séricas de duas vitaminas do complexo B: ácido fólico e cobalamina. Níveis reduzidos dessas vitaminas levam ao aumento dos níveis de homocisteína, um efeito bem descrito em pacientes com DA (MATTSON, M. P.; SHEA, T. B., 2003; QUADRI *et al.*, 2004). Níveis elevados de homocisteína estão relacionados à disfunção sináptica e morte celular por estresse do retículo endoplasmático, aumento do influxo de cálcio e apoptose (MATTSON, MARK P; SHEA, THOMAS B, 2003).

O efeito da STZ no estresse celular não está apenas relacionado à diminuição do ácido fólico e da cobalamina. Estudando a exposição de células hipotalâmicas à STZ, estamos mostrando um forte efeito da STZ no estresse do ER, com aumento da expressão gênica de BIP e splicing de XBP1. Curiosamente, a resposta ao estresse do ER foi afetada pela STZ, diminuindo os níveis de proteína ATF4 e evitando sua sinalização a jusante de apoptose pelo CHOP. No entanto, além da bem conhecida proteína de resposta ao estresse do ER, vários estudos mostram recentemente um papel central do ATF4 na regulação da atividade neuronal, plasticidade sináptica e memória por sua influência no tráfico do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) (CORONA *et al.*, 2018). O GABA também participa do desenvolvimento neuronal e da plasticidade, regulando o desenvolvimento de sinapses e espinhos dendríticos (LIU, J. *et al.*, 2014). No hipotálamo, a liberação sináptica de GABA

é necessária para o controle da homeostase energética (TONG *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que a exclusão de ATF4 em neurônios AgRP promove lipodistrofia principalmente por um aumento do gasto energético (DENG *et al.*, 2017).

Diferente da tiamina, o tratamento com benfotiamina em pacientes com DA, bem como em modelos animais de DA, leva a algumas melhorias nos testes de memória e na progressão da doença (PAN *et al.*, 2016; PAN *et al.*, 2010; TAPIAS *et al.*, 2018). Neste estudo, estamos mostrando que a benfotiamina melhora não apenas sintomas cognitivos, mas também melhora os sintomas não-cognitivos no modelo de DA por STZ-ICV. A perda de peso característica da doença de Alzheimer e, neste modelo experimental, pode ser um efeito anorexígeno já conhecido da deficiência de tiamina (LIU, M. *et al.*, 2014), mas não pudemos observar alterações nas concentrações de tiamina com a exposição à STZ. Em células, pudemos ver uma mudança na dinâmica de absorção de tiamina, além de mudanças na expressão gênica do transportador de tiamina. Porém, estas mudanças não foram suficientes para gerar um fenótipo de deficiência de tiamina a curto prazo; nós acreditamos que em um modelo de longo prazo, este fenótipo pode se desenvolver.

Curiosamente, estas alterações parecem não estar diretamente relacionados com a deficiência de tiamina, nem sua melhora com alterações na via canônica do metabolismo de tiamina. A exposição à STZ não diminui – e a suplementação com benfotiamina não aumenta – as concentrações de TDP *in vitro*. Ainda não está claro se a benfotiamina é capaz de alterar as concentrações de TDP nos cérebros *in vivo* (HILBIG; RAHMANN, 1998; MARKOVA *et al.*, 2017; PAN *et al.*, 2010; VOLVERT *et al.*, 2008). Em vez disso, estamos mostrando que a benfotiamina tem reações diferentes nos neurônios em comparação com a tiamina, o que não é totalmente compreendido ainda. Essa reação levou ao aumento da sensibilidade à insulina nas células hipotalâmicas, resultando em neuroproteção e melhora do perfil metabólico *in vivo*. A benfotiamina também protegeu parcialmente as células da diminuição das chaperonas HSP10 e HSP60 induzida por STZ. O resultado geral destas alterações é uma recuperação do metabolismo celular, observada pela melhora da respiração mitocondrial ligada à atividade da cadeia de transporte de elétrons. Apesar de não resultar em alterações na quantidade de tiamina intracelular, os efeitos do



STZ na respiração mitocondrial são de magnitude semelhante aos da deficiência de tiamina, e foram revertidos após a suplementação de BFT, que agiu na respiração desacoplada de ATP sintase de forma independente da presença de tiamina.

Neste experimento, mostramos que o STZ-ICV é um bom modelo não apenas para gerar alterações cognitivas, mas também não cognitivas, que mimetizam fenótipos patológicos relacionados à DA, como perda de peso e anorexia. A suplementação com benfotiamina melhora parcialmente o metabolismo hipotalâmico e, conseqüentemente, as alterações sistêmicas negativas, tendo potencial como fármaco no tratamento de sintomas não cognitivos associados à DA. Um novo achado importante foi a capacidade da benfotiamina – mas não da tiamina – de aumentar a sensibilidade à insulina independentemente dos níveis de TDP, aumentando o potencial terapêutico desse composto.

## 7. CONCLUSÃO

Nosso estudo mostra que o tratamento com BFT é capaz de melhorar o déficit cognitivo em um modelo experimental de doença de Alzheimer esporádica. A suplementação resulta em uma melhora na sinalização de insulina não só em áreas relacionadas à cognição, mas também do controle metabólico, também afetados na DA, evitando apoptose no hipotálamo. Esta melhora relacionada à tiamina parece acontecer apenas em situações em que a célula está em estresse. Assim, as alterações relacionadas à tiamina podem ser um alvo importante no tratamento da DA, sendo o uso da BFT uma estratégia importante e segura de modular estas alterações. Mais estudos devem ser conduzidos afim de entender os mecanismos que relacionam as alterações nas concentrações de tiamina com a memória, e como suas alterações afetam a progressão da DA.

## REFERÊNCIAS

- ANZALONE, S.; VETRENO, R. P.; RAMOS, R. L.; SAVAGE, L. M. Cortical cholinergic abnormalities contribute to the amnesic state induced by pyriithiamine-induced thiamine deficiency in the rat. **European Journal of Neuroscience**, 32, n. 5, p. 847-858, 2010.
- ARNOLD, S. E.; ARVANITAKIS, Z.; MACAULEY-RAMBACH, S. L.; KOENIG, A. M. *et al.* Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. **Nature Reviews Neurology**, 14, n. 3, p. 168-181, 2018/03/01 2018.
- BARRIA, A.; MALINOW, R. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. **Neuron**, 48, n. 2, p. 289-301, 2005.
- BATINGA, H. Cannabinoid receptor ligands prevent dopaminergic neuro. **Journal of Biomedical Sciences**, 5, n. 1, 2016.
- BENZLER, J.; GANJAM, G. K.; KRUGER, M.; PINKENBURG, O. *et al.* Hypothalamic glycogen synthase kinase 3beta has a central role in the regulation of food intake and glucose metabolism. **Biochem J**, 447, n. 1, p. 175-184, Oct 1 2012.
- BERNABEU, R.; DE STEIN, M. L.; FIN, C.; IZQUIERDO, I. *et al.* Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport**, 6, n. 11, p. 1498-1500, 1995.
- BERNABEU, R.; SCHMITZ, P.; FAILLACE, M. P.; IZQUIERDO, I. *et al.* Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport**, 7, n. 2, p. 585-588, 1996.
- BIESSELS, G.; KAPPELLE, L. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? **Biochemical Society Transactions**, 33, n. 5, p. 1041-1044, 2005.
- BLASS, J. P.; GLEASON, P.; BRUSH, D.; DIPONTE, P. *et al.* Thiamine and Alzheimer's Disease: A Pilot Study. **JAMA Neurology**, 45, n. 8, p. 833-835, 1988.
- BROWN, G. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. **Biochemical Society Transactions**, 35, n. 5, p. 1119-1121, 2007.
- BUTTERWORTH, R. F.; BESNARD, A.-M. Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. **Metabolic brain disease**, 5, n. 4, p. 179-184, 1990.
- CARPENTER, K. J. **Beriberi, white rice, and vitamin B: a disease, a cause, and a cure.** Univ of California Press, 2000. 0520923642.
- CARVALHO, F. M.; PEREIRA, S. R.; PIRES, R. G.; FERRAZ, V. P. *et al.* Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial

memory performance in a water maze test. **Pharmacol Biochem Behav**, 83, n. 4, p. 481-489, Apr 2006.

CHAVES-KIRSTEN, G. P.; MAZUCANTI, C. H.; REAL, C. C.; SOUZA, B. M. *et al.* Temporal changes of CB1 cannabinoid receptor in the basal ganglia as a possible structure-specific plasticity process in 6-OHDA lesioned rats. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e76874, 2013.

CHAVES, G. P.; NOGUEIRA, T. C.; BRITTO, L. R.; BORDIN, S. *et al.* Retinal removal up-regulates cannabinoid CB(1) receptors in the chick optic tectum. **J Neurosci Res**, 86, n. 7, p. 1626-1634, May 15 2008.

CHEUNG, E. C.; SLACK, R. S. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. **Science Signaling**, 2004, n. 251, p. pe45-pe45, 2004.

CLAYTON, D. A.; MESCHES, M. H.; ALVAREZ, E.; BICKFORD, P. C. *et al.* A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. **Journal of Neuroscience**, 22, n. 9, p. 3628-3637, 2002.

CORONA, C.; PASINI, S.; LIU, J.; AMAR, F. *et al.* Activating Transcription Factor 4 (ATF4) Regulates Neuronal Activity by Controlling GABABR Trafficking. **J Neurosci**, 38, n. 27, p. 6102-6113, Jul 4 2018.

CORREIA, S. C.; SANTOS, R. X.; SANTOS, M. S.; CASADESUS, G. *et al.* Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, 10, n. 4, p. 406-419, 2013.

CRUNFLI, F.; MAZUCANTI, C. H.; DE MORAES, R. C. M.; COSTA, A. P. *et al.* NO-Dependent Akt Inactivation by S-Nitrosylation as a Possible Mechanism of STZ-Induced Neuronal Insulin Resistance. **J Alzheimers Dis**, 65, n. 4, p. 1427-1443, 2018.

CRUNFLI, F.; VRECHI, T. A.; COSTA, A. P.; TORRÃO, A. S. Cannabinoid Receptor Type 1 Agonist ACEA Improves Cognitive Deficit on STZ-Induced Neurotoxicity Through Apoptosis Pathway and NO Modulation. **Neurotox Res**, 35, n. 3, p. 516-529, Apr 2019.

DE FELICE, F. G.; FERREIRA, S. T. Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. **Diabetes**, 63, n. 7, p. 2262-2272, 2014.

DE LA MONTE, S. M. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer' s disease: Mini-review. **European Neuropsychopharmacology**, 24, n. 12, p. 1954-1960, 2014.

DENG, J.; YUAN, F.; GUO, Y.; XIAO, Y. *et al.* Deletion of ATF4 in AgRP neurons promotes fat loss mainly via increasing energy expenditure. 66, n. 3, p. 640-650, 2017.

DIEF, A. E.; SAMY, D. M.; DOWEDAR, F. I. Impact of Exercise and Vitamin B 1 Intake on Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor and Spatial Memory Performance

in a Rat Model of Stress. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 61, n. 1, p. 1-7, 2015.

DU, L.-L.; CHAI, D.-M.; ZHAO, L.-N.; LI, X.-H. *et al.* AMPK activation ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and spatial memory impairment in a streptozotocin-induced Alzheimer's disease model in rats. **Journal of Alzheimer's Disease**, 43, n. 3, p. 775-784, 2015.

DU, L.-L.; XIE, J.-Z.; CHENG, X.-S.; LI, X.-H. *et al.* Activation of sirtuin 1 attenuates cerebral ventricular streptozotocin-induced tau hyperphosphorylation and cognitive injuries in rat hippocampi. **Age**, 36, n. 2, p. 613-623, 2014.

DUTTA, B.; HUANG, W.; MOLERO, M.; KEKUDA, R. *et al.* Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. **Journal of Biological Chemistry**, 274, n. 45, p. 31925-31929, 1999.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research**, 31, n. 1, p. 47-59, 1988.

EUDY, J. D.; SPIEGELSTEIN, O.; BARBER, R. C.; WLODARCZYK, B. J. *et al.* Identification and characterization of the human and mouse SLC19A3 gene: a novel member of the reduced folate family of micronutrient transporter genes. **Mol Genet Metab**, 71, n. 4, p. 581-590, Dec 2000.

FIGUEIREDO, P. A.; POWERS, S. K.; FERREIRA, R. M.; AMADO, F. *et al.* Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 64, n. 9, p. 927-939, Sep 2009.

FRASER, D.; HESSVIK, N. P.; NIKOLIĆ, N.; AAS, V. *et al.* Benfotiamine increases glucose oxidation and downregulates NADPH oxidase 4 expression in cultured human myotubes exposed to both normal and high glucose concentrations. **Genes & nutrition**, 7, n. 3, p. 459-469, 2012.

FREDERIKSE, P. H.; FARNSWORTH, P.; ZIGLER, J. S. Thiamine Deficiency in Vivo Produces Fiber Cell Degeneration in Mouse Lenses. **Biochemical and biophysical research communications**, 258, n. 3, p. 703-707, 1999.

GIBSON, G. E.; HIRSCH, J. A.; CIRIO, R. T.; JORDAN, B. D. *et al.* Abnormal thiamine-dependent processes in Alzheimer's Disease. Lessons from diabetes. **Mol Cell Neurosci**, 55, p. 17-25, Jul 2013.

GIBSON, G. E.; HIRSCH, J. A.; FONZETTI, P.; JORDAN, B. D. *et al.* Vitamin B1 (thiamine) and dementia. **Ann N Y Acad Sci**, Mar 11 2016.

GIBSON, G. E.; SHEU, K.-F. R.; BLASS, J. P.; BAKER, A. *et al.* Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. **Archives of neurology**, 45, n. 8, p. 836-840, 1988.

GROSSBERG, A. J.; SCARLETT, J. M.; MARKS, D. L. Hypothalamic mechanisms in cachexia. **Physiology & behavior**, 100, n. 5, p. 478-489, 2010.

GRÜNBLATT, E.; SALKOVIC-PETRISIC, M.; OSMANOVIC, J.; RIEDERER, P. *et al.* Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **Journal of neurochemistry**, 101, n. 3, p. 757-770, 2007.

GUO, Z.; CHEN, Y.; MAO, Y.-F.; ZHENG, T. *et al.* Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. **Scientific Reports**, 7, 2017.

HERNANDES, M. S.; BRITTO, L. R. G. NADPH oxidase and neurodegeneration. **Current neuropharmacology**, 10, n. 4, p. 321-327, 2012.

HERNÁNDEZ, F.; DE BARREDA, E. G.; FUSTER-MATANZO, A.; LUCAS, J. J. *et al.* GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. **Experimental neurology**, 223, n. 2, p. 322-325, 2010.

HERNANDEZ, F.; LUCAS, J. J.; AVILA, J. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 33, n. s1, p. S141-S144, 2013.

HÉROUX, M.; RAO, V. R.; LAVOIE, J.; RICHARDSON, J. S. *et al.* Alterations of thiamine phosphorylation and of thiamine-dependent enzymes in Alzheimer's disease. **Metabolic brain disease**, 11, n. 1, p. 81-88, 1996.

HILBIG, R.; RAHMANN, H. Comparative autoradiographic investigations on the tissue distribution of benfotiamine versus thiamine in mice. **Arzneimittelforschung**, 48, n. 5, p. 461-468, May 1998.

HOYER, S.; LANNERT, H.; LATTEIER, E.; MEISEL, T. Relationship between cerebral energy metabolism in parietotemporal cortex and hippocampus and mental activity during aging in rats. **Journal of neural transmission**, 111, n. 5, p. 575-589, 2004.

HOYER, S.; LEE, S. K.; LÖFFLER, T.; SCHLIEBS, R. Inhibition of the Neuronal Insulin Receptor An in Vivo Model for Sporadic Alzheimer Disease? **Annals of the New York Academy of Sciences**, 920, n. 1, p. 256-258, 2000.

INABA, H.; KISHIMOTO, T.; OISHI, S.; NAGATA, K. *et al.* Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke-Korsakoff syndrome. **Biosci Biotechnol Biochem**, 80, n. 12, p. 2425-2436, Dec 2016.

JOHNSON, D. K.; WILKINS, C. H.; MORRIS, J. C. Accelerated weight loss may precede diagnosis in Alzheimer disease. **Arch Neurol**, 63, n. 9, p. 1312-1317, Sep 2006.

JOHNSON, P. R.; HIRSCH, J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. **J Lipid Res**, 13, n. 1, p. 2-11, Jan 1972.

KAPOGIANNIS, D.; MATTSON, M. P. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, 10, n. 2, p. 187-198, 2011.

KLEINRIDDERS, A. Deciphering Brain Insulin Receptor and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Signalling. **Journal of neuroendocrinology**, 28, n. 11, 2016.

KLEINRIDDERS, A.; CAI, W.; CAPPELLUCCI, L.; GHAZARIAN, A. *et al.* Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 112, n. 11, p. 3463-3468, Mar 17 2015.

KOTHARI, V.; LUO, Y.; TORNABENE, T.; O'NEILL, A. M. *et al.* High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. 1863, n. 2, p. 499-508, 2017.

KRASKA, A.; SANTIN, M. D.; DORIEUX, O.; JOSEPH-MATHURIN, N. *et al.* In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin. **PLoS one**, 7, n. 9, p. e46196, 2012.

KRAVITZ, E.; GAISLER-SALOMON, I.; BIEGON, A. Hippocampal glutamate NMDA receptor loss tracks progression in Alzheimer's disease: quantitative autoradiography in postmortem human brain. **PLoS One**, 8, n. 11, p. e81244, 2013.

KULLMANN, S.; HENI, M.; HALLSCHMID, M.; FRITSCHKE, A. *et al.* Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans. **Physiol Rev**, 96, n. 4, p. 1169-1209, Oct 2016.

LABAK, M.; FONIOK, T.; KIRK, D.; RUSHFORTH, D. *et al.* Metabolic changes in rat brain following intracerebroventricular injections of streptozotocin: a model of sporadic Alzheimer's disease. *In: Brain Edema XIV*: Springer, 2010. p. 177-181.

LESTER-COLL, N.; RIVERA, E. J.; SOSCIA, S. J.; DOIRON, K. *et al.* Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 9, n. 1, p. 13-33, 2006.

LIU, H.; SANG, S.; LU, Y.; WANG, Z. *et al.* Thiamine metabolism is critical for regulating correlated growth of dendrite arbors and neuronal somata. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 5342, Jul 13 2017.

LIU, J.; PASINI, S.; SHELANSKI, M. L.; GREENE, L. A. Activating transcription factor 4 (ATF4) modulates post-synaptic development and dendritic spine morphology. **Front Cell Neurosci**, 8, p. 177, 2014.

LIU, M.; ALIMOV, A.; WANG, H.; FRANK, J. A. *et al.* Thiamine deficiency induces anorexia by inhibiting hypothalamic AMPK. **Neuroscience**, 267, p. 102-113, 2014.

MARKOVA, N.; BAZHENOVA, N.; ANTHONY, D. C.; VIGNISSE, J. *et al.* Thiamine and benfotiamine improve cognition and ameliorate GSK-3 $\beta$ -associated stress-induced behaviours in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 75, p. 148-156, 2017.

- MATTSON, M. P.; SHEA, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci**, 26, n. 3, p. 137-146, Mar 2003.
- MATTSON, M. P.; SHEA, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in neurosciences**, 26, n. 3, p. 137-146, 2003.
- MECHA, M.; TORRÃO, A. S.; MESTRE, L.; CARRILLO-SALINAS, F. J. *et al.* Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. **Cell Death Dis**, 3, p. e331, 2012.
- MERGENTHALER, P.; LINDAUER, U.; DIENEL, G. A.; MEISEL, A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. **Trends in neurosciences**, 36, n. 10, p. 587-597, 2013.
- MKRTCHYAN, G.; ALESHIN, V.; PARKHOMENKO, Y.; KAEHNE, T. *et al.* Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis. **Scientific reports**, 5, p. 12583, 2015.
- MOLONEY, A. M.; GRIFFIN, R. J.; TIMMONS, S.; O'CONNOR, R. *et al.* Defects in IGF-1receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. **Neurobiol Aging**, 31, n. 2, p. 224-243, Feb 2010.
- MORRISON, A.; CAMPBELL, J. Vitamin Absorption Studies: I. Factors Influencing the Excretion of Oral Test Doses of Thiamine and Riboflavin by Human Subjects. **The Journal of nutrition**, 72, n. 4, p. 435-440, 1960.
- MOSCONI, L.; BRYNS, M.; SWITALSKI, R.; MISTUR, R. *et al.* Maternal family history of Alzheimer's disease predisposes to reduced brain glucose metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104, n. 48, p. 19067-19072, 2007.
- MOSCONI, L.; MISTUR, R.; SWITALSKI, R.; BRYNS, M. *et al.* Declining brain glucose metabolism in normal individuals with a maternal history of Alzheimer disease. **Neurology**, 72, n. 6, p. 513-520, 2009.
- MUSIEK, E. S.; XIONG, D. D.; HOLTZMAN, D. M. Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease. **Exp Mol Med**, 47, p. e148, Mar 13 2015.
- NETZEL, M.; ZIEMS, M.; JUNG, K. H.; NOLL, E. *et al.* Effect of high-dosed thiamine hydrochloride and S-benzoyl-thiamine-O-monophosphate on thiamine-status after chronic ethanol administration. **Biofactors**, 11, n. 1-2, p. 111-113, 2000.
- NGUYỄN, L. T. H. Role of thiamine in Alzheimer's disease. **American journal of Alzheimer's disease and other dementias**, 26, n. 8, p. 588-598, 2011.
- NOLAN, K. A.; BLACK, R. S.; SHEU, K. F. R.; LANGBERG, J. *et al.* A Trial of Thiamine in Alzheimer's Disease. **JAMA Neurology**, 48, n. 1, p. 81-83, 1991.



PAN, X.; CHEN, Z.; FEI, G.; PAN, S. *et al.* Long-Term Cognitive Improvement After Benfotiamine Administration in Patients with Alzheimer's Disease. **Neuroscience bulletin**, 32, n. 6, p. 591-596, 2016.

PAN, X.; GONG, N.; ZHAO, J.; YU, Z. *et al.* Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and  $\beta$ -amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice. **Brain**, p. awq069, 2010.

PENZLIN, H. Sir Frederick Gowland Hopkins begründet die moderne Vitaminforschung. **J Biologie in unserer Zeit**, 36, n. 3, p. 192-193, 2006.

PINTON, S.; DA ROCHA, J. T.; GAI, B. M.; NOGUEIRA, C. W. Sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin promotes anxiogenic behavior in mice. **Behav Brain Res**, 223, n. 1, p. 1-6, Sep 30 2011.

PORTARI, G. V.; VANNUCCHI, H.; JORDAO, A. A. Liver, plasma and erythrocyte levels of thiamine and its phosphate esters in rats with acute ethanol intoxication: A comparison of thiamine and benfotiamine administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 48, n. 4, p. 799-802, 2013.

PRIETO-ALMEIDA, F.; PANVELOSKI-COSTA, A. C.; CRUNFLI, F.; TEIXEIRA, S. S. *et al.* Thyroid hormone improves insulin signaling and reduces the activation of neurodegenerative pathway in the hippocampus of diabetic adult male rats. **Life sciences**, 192, p. 253-258, 2018.

QUADRI, P.; FRAGIACOMO, C.; PEZZATI, R.; ZANDA, E. *et al.* Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. **Am J Clin Nutr**, 80, n. 1, p. 114-122, Jul 2004.

RAHMOUNI, K.; SIGMUND, C. D.; HAYNES, W. G.; MARK, A. L. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. **Diabetes**, 58, n. 3, p. 536-542, Mar 2009.

RAI, S.; KAMAT, P. K.; NATH, C.; SHUKLA, R. A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. **Journal of neuroimmunology**, 254, n. 1, p. 1-9, 2013.

RAI, S.; KAMAT, P. K.; NATH, C.; SHUKLA, R. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 117, p. 104-117, 2014.

REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, 7, n. 3, p. 137-152, 2011.

RINDI, G.; LAFORENZA, U. Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 224, n. 4, p. 246-255, 2000.

ROH, E.; SONG, D. K.; KIM, M. S. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. **Exp Mol Med**, 48, p. e216, Mar 11 2016.

ROTHMAN, K. J. No adjustments are needed for multiple comparisons. **Epidemiology**, 1, n. 1, p. 43-46, Jan 1990.

SANTOS, T. O.; MAZUCANTI, C. H. Y.; XAVIER, G. F.; TORRÃO, A. S. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. **Physiology & behavior**, 107, n. 3, p. 401-413, 2012.

SHARMA, M.; GUPTA, Y. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life sciences**, 68, n. 9, p. 1021-1029, 2001.

Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. **Nature**, 562, n. 7727, p. 367-372, Oct 2018.

SPARKS, L. M.; XIE, H.; KOZA, R. A.; MYNATT, R. *et al.* A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. **Diabetes**, 54, n. 7, p. 1926-1933, 2005.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, 20, n. Suppl 2, p. 265, 2010.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 1842, n. 8, p. 1219-1231, 2014.

SWERDLOW, R. H.; KHAN, S. M. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. **Medical hypotheses**, 63, n. 1, p. 8-20, 2004.

SWERDLOW, R. H.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: an update. **Experimental neurology**, 218, n. 2, p. 308-315, 2009.

SZUTOWICZ, A.; BIELARCZYK, H.; JANKOWSKA-KULAWY, A.; PAWEŁCZYK, T. *et al.* Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. **Neurochemical research**, 38, n. 8, p. 1523-1542, 2013.

TALBOT, K.; WANG, H.-Y.; KAZI, H.; HAN, L.-Y. *et al.* Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. **The Journal of clinical investigation**, 122, n. 4, p. 1316-1338, 2012.

TAPIAS, V.; JAINUDDIN, S.; AHUJA, M.; STACK, C. *et al.* Benfotiamine treatment activates the Nrf2/ARE pathway and is neuroprotective in a transgenic mouse model of tauopathy. **Hum Mol Genet**, 27, n. 16, p. 2874-2892, Aug 15 2018.

TIMPER, K.; BRUNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. **Dis Model Mech**, 10, n. 6, p. 679-689, Jun 1 2017.

TONG, Q.; YE, C. P.; JONES, J. E.; ELMQUIST, J. K. *et al.* Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. **Nat Neurosci**, 11, n. 9, p. 998-1000, Sep 2008.

TORRÃO, A. S.; CAFÉ-MENDES, C. C.; REAL, C. C.; HERNANDES, M. S. *et al.* Different approaches, one target: understanding cellular mechanisms of Parkinson's and Alzheimer's diseases. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 34, p. s194-s205, 2012.

VIGNISSE, J.; SAMBON, M.; GORLOVA, A.; PAVLOV, D. *et al.* Thiamine and benfotiamine prevent stress-induced suppression of hippocampal neurogenesis in mice exposed to predation without affecting brain thiamine diphosphate levels. **Mol Cell Neurosci**, 82, p. 126-136, Jul 2017.

VOLVERT, M.-L.; SEYEN, S.; PIETTE, M.; EVRARD, B. *et al.* Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. **BMC pharmacology**, 8, n. 1, p. 10, 2008.

VRECHI, T. A.; CRUNFLI, F.; COSTA, A. P.; TORRÃO, A. S. Cannabinoid Receptor Type 1 Agonist ACEA Protects Neurons from Death and Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Related Apoptotic Pathway Signaling. **Neurotoxicity research**, p. 1-10, 2018.

WADA, T.; TAKAGI, H.; MINAKAMI, H.; HAMANAKA, W. *et al.* A new thiamine derivative, S-benzoylthiamine O-monophosphate. **Science**, 134, n. 3473, p. 195-196, Jul 21 1961.

WANG, C.; FEI, G.; PAN, X.; SANG, S. *et al.* High thiamine diphosphate level as a protective factor for Alzheimer's disease. **Neurological research**, p. 1-8, 2018.

WHITE, H.; PIEPER, C.; SCHMADER, K.; FILLENBAUM, G. Weight change in Alzheimer's disease. **J Am Geriatr Soc**, 44, n. 3, p. 265-272, Mar 1996.

WILLETTE, A. A.; BENDLIN, B. B.; STARKS, E. J.; BIRDSILL, A. C. *et al.* Association of Insulin Resistance With Cerebral Glucose Uptake in Late Middle-Aged Adults at Risk for Alzheimer Disease. **JAMA neurology**, 72, n. 9, p. 1013-1020, 2015.

WILLETTE, A. A.; XU, G.; JOHNSON, S. C.; BIRDSILL, A. C. *et al.* Insulin resistance, brain atrophy, and cognitive performance in late middle-aged adults. **Diabetes care**, 36, n. 2, p. 443-449, 2013.

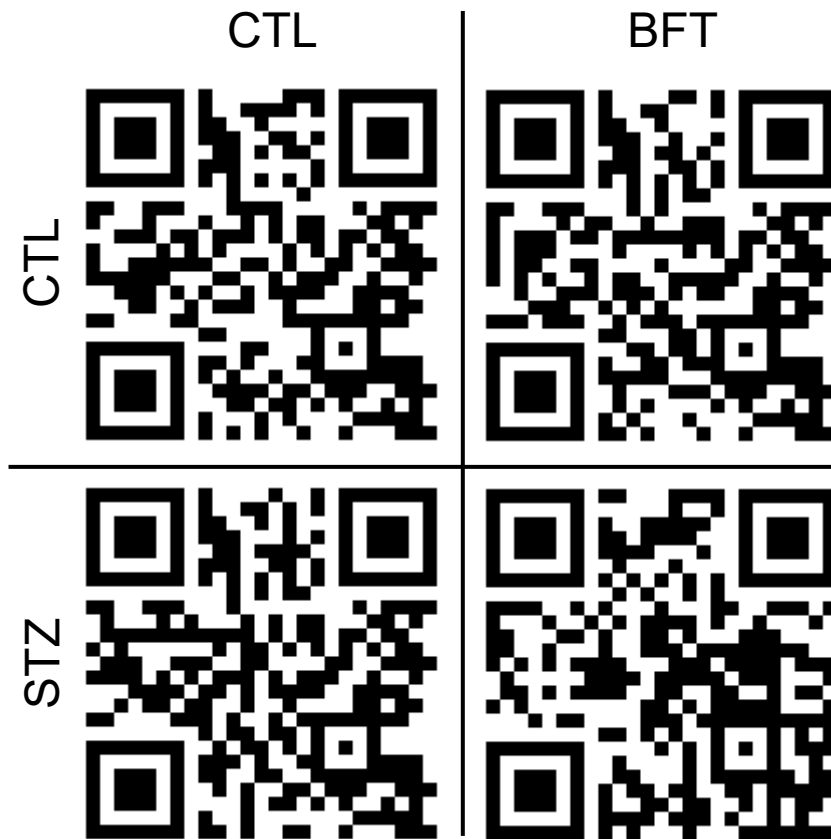
XU, M.; DAI, D.-Z.; DAI, Y. Normalizing NADPH oxidase contributes to attenuating diabetic nephropathy by the dual endothelin receptor antagonist CPU0213 in rats. **American journal of nephrology**, 29, n. 3, p. 252-256, 2008.

YARCHOAN, M.; ARNOLD, S. E. Repurposing diabetes drugs for brain insulin resistance in Alzheimer disease. **Diabetes**, 63, n. 7, p. 2253-2261, 2014.

YARDIN, C. Histopathology of Alzheimer's disease. **Morphologie: bulletin de l'Association des anatomistes**, 91, n. 295, p. 199-201, 2007.

ZHANG, Q.; YANG, G.; LI, W.; FAN, Z. *et al.* Thiamine deficiency increases  $\beta$ -secretase activity and accumulation of  $\beta$ -amyloid peptides. **Neurobiology of aging**, 32, n. 1, p. 42-53, 2011.

## APÊNDICES



Apêndice A. Links em QRcode para visualização de vídeos demonstrativos dos testes de reconhecimento de objeto novo.

# ANEXOS

**TransMIT**

TransMIT GmbH · TransMIT-Projektbereich für Versuchstierkunde  
Karl-von-Frisch Str. 8 · 35043 Marburg

Herr Ruan Carlos Macedo de Moraes

Deutsches Institut für Ernährungsforschung  
Central Regulation Metabolism  
Arthur-Scheunert-Allee 114-116  
14558 Nuthetal

**TransMIT**

Gesellschaft für  
Technologietransfer mbH

**TransMIT-Projektbereich für  
Versuchstierkunde**  
Prof. Gerhard Heldmaier  
Dr. Nicole Linklater  
c/o Philipps-Universität Marburg  
Karl-von-Frisch Str. 8  
D-35043 Marburg  
Tel.: +49 (64 21) 2 82 34 95  
Fax: +49 (64 21) 2 82 89 37  
e-mail: nicole.linklater@transmit.de  
http://las-interactive.de

17.10.2018

**Certificate:** Online examination – Theoretical qualification pursuant to the ordinance on animal protection in experiments (*TierSchVersV*) for persons who conduct animal experiments, with species-specific contents on mouse and rat

Dear Ruan Carlos Macedo de Moraes,

Date of birth    18.07.1990  
Place of birth    Teresina, Brasilien

You successfully took part in the examination for Courses 01 – General part, 01.1 – Mouse and 01.2 – Rat on 16.10.2018. The online course covers the following topics of Annex 1 Section III *TierSchVersV*:

Animal experiments	Basic legal and ethical principles, the principle of indispensability, 3Rs, basic principles of planning for experiments, database searches and planning for statistical analysis
Breeding and husbandry	Basic principles of breeding, genetics, husbandry requirements, housing units and minimum space requirements and enrichment Health and hygiene of animal population Identification
Biology	Basic principles of physiology, anatomy and behaviour, species-specific breeding and housing, enrichment, handling
Analgesia and anaesthesia	Recognition of species-specific pain and suffering Anaesthesia and pain-relieving methods.
Experimental methods	Methods of administration and blood sampling, dissection Euthanasia of laboratory animals, incl. humane endpoints Basic principles of surgical procedures Basic principles of imaging

  
 Dr. Nicole Linklater



---

TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer mbH · Sitz der Gesellschaft: Gießen · Amtsgericht Gießen HRB 3036 · Geschäftsführer: Dr. Peter Stumpf  
 Sparkasse Gießen 200 613 260 (BLZ 513 500 25) · Volksbank Mittelhessen 3.3668.08 (BLZ 513 900 00) · USt-IdNr. DE 188 685 037

*Anexo A. Certificado de aprovação em avaliação de conhecimento teórico da Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA).*

GERMAN INSTITUTE  
OF HUMAN NUTRITION  
POTSDAM-REHBRUECKE



ARTHUR-SCHEUNERT-ALLEE 114-116  
D-14558 NUTHETAL

INSTITUTE OF THE  
LEIBNIZ ASSOCIATION

www.dife.de

### Certificate of Attendance

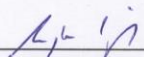
Mr  
Surname **Macedo de Moraes**  
First name **Ruan Carlos**  
Date of birth **July 18, 1990**  
Place of birth **Teresina, Brazil**

has successfully completed the practical 20-hour course "Laboratory Animal Science and Methods of Animal Experimentation on Mice and Rats", which took place from Oct 22<sup>nd</sup> - Oct 25<sup>th</sup> 2018 at the German Institute of Human Nutrition in Potsdam-Rehbruecke. Requirement for course attendance was the successful completion of the theoretical online exam from "LAS interactive" course with its general part and the species-specific contents on mice and rats. The contents of the practical course refer to the recommendations of the Federation of European Laboratory Science (FELASA) and the German Society of Laboratory Animal Science (GV-SOLAS) and meet the requirements of Annex 1 section 3 of the German Ordinance on Animal Protection in Experiments for persons who conduct animal experiments.

The course covers the following knowledge and skills for the species mice and rats:

- Introduction in genetic engineering
- Physiological behavior
- Detection and severity assessment of pain or suffering
- Housing and environmental enrichment
- Methods of handling and fixation
- Application methods
- Blood sampling methods
- Demonstration of specific examination/phenotyping procedures:  
Metabolic cages, indirect calorimetry, nuclear magnetic resonance spectroscopy, computer tomography, activity measurement via tread mill and running wheel
- Anesthesia
- Basics of surgical wound closure
- Euthanasia
- Anatomy, dissection and organ removal

Nuthetal, November 5, 2018

  
Dr. Anja Voigt  
(Head of animal facility)

  
Dr. Christine Krüger  
(Animal welfare officer)

KURATORIUMSVORSITZENDE: DR. CLAUDIA HEROK  
STIFTUNGSVORSTAND: PROF. DR. TILMAN GRUNE • DR. BIRGIT SCHRÖDER-SMEIBIDL  
BANKVERBINDUNG: COMMERZBANK AG POTSDAM, BLZ 160 800 00, KONTO-NR. 0179 607 000  
IBAN: DE19 1608 0000 0179 6070 00, BIC: DRESDEFF160

*Anexo B. Certificado de participação no curso prático de experimentação animal com foco em rato e camundongo da Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA).*

**PARA USO DA COORDENAÇÃO DO PROGRAMA**



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES  
SBN, Quadra 02, Lote 06, Bloco L  
Brasília – DF – CEP: 70040-020

**TERMO DE SELEÇÃO DE CANDIDATURA DO PDSE**

INSTITUIÇÃO: Universidade de São Paulo

PROGRAMA: Ciências (Fisiologia Humana)

LOCAL E DATA: São Paulo, 05 de fevereiro de 2018.

**COMISSÃO**

NOME	IES	PROGRAMA	CARGO/FUNÇÃO	ASSINATURA
1. Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes	USP	Ciências (Fisiologia Humana)	Coordenador do Programa OU Substituto	
2. Me. Pryscila Dryelle Sousa Teixeira	USP	Ciências (Fisiologia Humana)	Representante discente dos pós-graduandos (doutorando)	
3. Profa. Dra. Patrícia Gama	USP	Ciências (Biologia Celular e Tecidual)	Avaliador externo ao programa de pós-graduação (Doutor)	
4.				
5.				

**PARECER FINAL JUSTIFICANDO A ESCOLHA DO CANDIDATO SELECIONADO**

NOME DO(S) CANDIDATO(S): Ruan Carlos Macêdo de Moraes

PARECER: O Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Humana apresenta uma **única** proposta para que o aluno **Ruan Carlos Macêdo de Moraes**, orientado da Dra Andrea da Silva Torrão realize um estágio no exterior sob supervisão do Dr. André Kleinridders no German Institute of Human Nutrition Potsdam- Rehbrueke (Alemanha), entre outubro de 2018 e setembro de 2019. A proposta contempla a realização de experimentos importantes para o desenvolvimento do tema de tese do aluno, e certamente irá contribuir para seu aprendizado e para a colaboração entre os grupos. O aluno apresenta histórico escolar coerente com a solicitação, e também tem prazo para realizar um estágio de um ano no exterior. O centro escolhido é um instituto de pesquisa, faz parte da Leibniz Association e está ligado à Universidade de Potsdam, onde a área de ensino é desenvolvida. O supervisor é coordenador do centro jovem de pesquisa da Instituição, tem publicações recentes importantes na área, e em sua carta, informou que está de acordo com o estágio do aluno. Dessa forma, a proposta está de acordo com o Programa da CAPES, e está **APROVADA**.

Obs.: O orientador do aluno não poderá participar da Comissão de Seleção. Caso ele seja também o Coordenador do curso quem deverá assinar o termo de seleção é o seu substituto formal indicado.

*Anexo C. Aprovação de bolsa para período sanduíche de um ano no German Institute of Human Nutrition (DIFE).*