

I. REVISÃO DE LITERATURA

1. TIAMINA

A tiamina, também conhecida como vitamina B1, foi a primeira vitamina a ser descoberta (Funk, 1911), quando foram estudados os efeitos do consumo de arroz polido em pombos com o conseqüente aparecimento de polineurite, que era curada após a administração de uma substância, ainda não identificada quimicamente, que estava presente nos grãos de arroz ainda não polidos. Funk (1911) descreveu que a substância possuía também a capacidade de curar o Beribéri. A tiamina foi então isolada e identificada pela primeira vez por Suzuki e colaboradores (1912) e foi considerada um componente ativo necessário para a manutenção das atividades vitais de homens e animais (Lonsdale, 2006; Jhala et al., 2011). A tiamina (2-[3-[(4-Amino-2-methyl-pyrimidin-5-yl)methyl]-4-methyl-thiazol-5-yl] ethanol) apresenta massa de 337 daltons (Rindi & Laforenza, 2000) sendo constituída de um anel pirimidínico e um tiazólico que são unidos por uma ponte de metileno (Begley et al., 1999; Lonsdale, 2006). A tiamina não é a única vitamina do complexo B, este é composto por outras vitaminas como riboflavina, niacina, piridoxina, nicotinamida, ácido pantotênico, ácido p-aminobenzóico, inositol, colina, biotina e ácido fólico (Elliot et al., 1995; Walter & Talbot, 1996; Lonsdale, 2006).

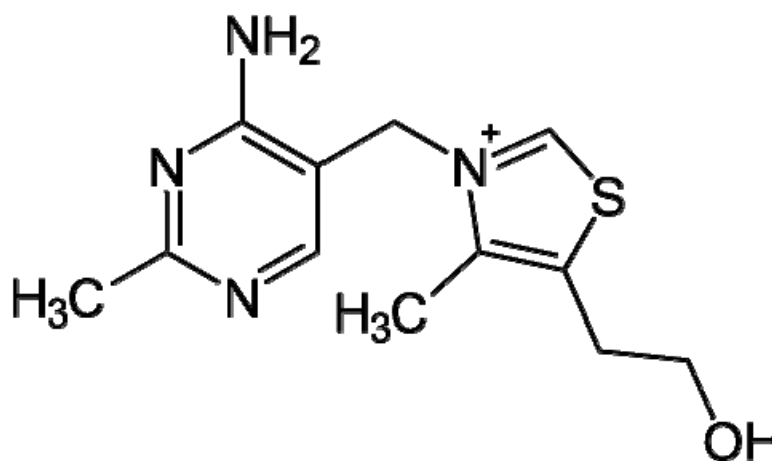


Figura 1 – Estrutura molecular da tiamina livre

A tiamina está presente em cereais, carnes como peixe e porco, e em alguns legumes e frutas (Walter & Talbot, 1996; Lonsdale, 2006), tem aspecto incolor e é

hidrossolúvel (Mayr et al., 2011). Geralmente é degradada pelo cozimento e autoclavagem, pois é a única vitamina descrita sensível ao calor (Elliot et al., 1995; Walter & Talbot, 1996; Lonsdale, 2006). A obtenção desta vitamina se dá através da dieta, já que não é sintetizada pelo organismo humano (Martin et al., 2003; Mayr et al., 2011). Ela é armazenada no cérebro, fígado, rins e músculos, principalmente o cardíaco, e é excretada na urina (Singleton & Martin, 2001).

A tiamina, após ser ingerida na dieta, é absorvida pelo trato gastrointestinal, e é levada aos tecidos, através da corrente sanguínea, para então ser transportada para dentro das células, através de transportadores específicos (SLC19A2 e SLC19A3) (Martin et al., 2003; Mayr et al., 2011). Dentro da célula, está presente na forma livre e em três formas fosforiladas, a tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato (TDP) ou tiamina pirofosfato (TPP) e tiamina trifosfato (TTP). A TMP é um produto das vias de biossíntese de tiamina em bactérias, plantas e leveduras e é um substrato para transformações químicas produzindo tiamina livre (tiamina-fosfatase) ou a TDP pela ação da tiamina pirofosfoquinase (TPK) (Gibson et al., 2002; Lonsdale, 2006; Mayr et al., 2011). A TTP representa apenas cerca de 2-3% do total em humanos, mesmo assim desempenha um papel importante na fisiologia do sistema nervoso, devido ao seu envolvimento na fosforilação de proteínas sinápticas e a ativação de canais de cloreto em células nervosas (Gibson et al., 2002; Lonsdale, 2006). Já a TDP (Figura 2) funciona como coenzima e é essencial para o controle da atividade de enzimas importantes do metabolismo celular, como a transcetolase, o complexo da piruvato desidrogenase e da α -cetoglutarato desidrogenase (Figura 3) (Gibson et al., 2002; Bubber et al., 2004; Lonsdale, 2006; Jhala et al., 2011; Dror et al., 2010; Mayr et al., 2011). Assim que a TDP (TPP) é formada no citosol, pode se ligar a transcetolase, ou é transportada para a mitocôndria através do transportador SLC25A19, e pode se ligar tanto ao complexo da piruvato desidrogenase quanto da α -cetoglutarato desidrogenase (Mayr et al., 2011). Esta vitamina tem importante papel no metabolismo aeróbio de carboidratos, lipídios e proteínas, e na produção de energia celular (Gibson et al., 2002; Lonsdale, 2006).

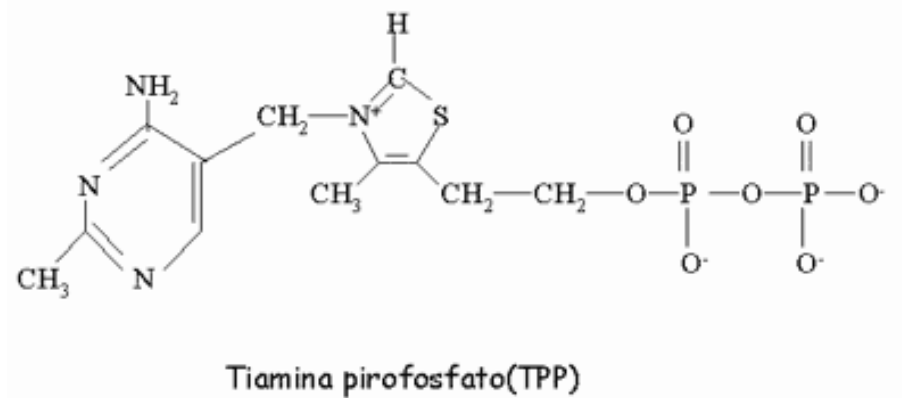


Figura 2 – Estrutura molecular da tiamina pirofosfato (TPP ou TDP)

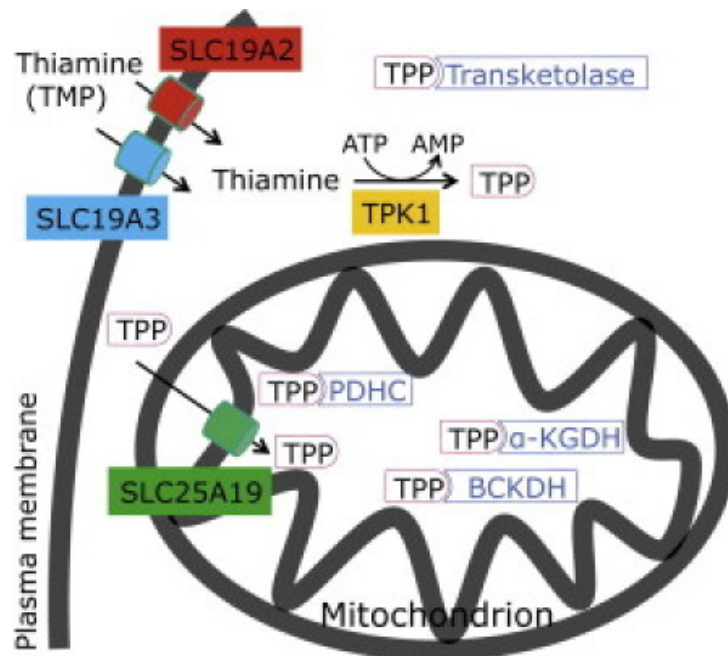


Figura 3 – Metabolismo da tiamina em células de mamíferos: Transportadores de tiamina e enzimas que necessitam da tiamina como co-fator enzimático.

A transcetolase é uma enzima importante na via das pentoses fosfato. Esta enzima pode converter a xilulose-5-fosfato e eritrose-4-fosfato em gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato e também converter a ribose-5-fosfato em gliceraldeído 3-fosfato, que podem ser oxidados para obtenção de energia ou utilizados para a síntese de glicogênio (Gibson et al., 2002; Lonsdale, 2006; Katare et al.,2012; Schabelman et al., 2012;)(Figura 4).

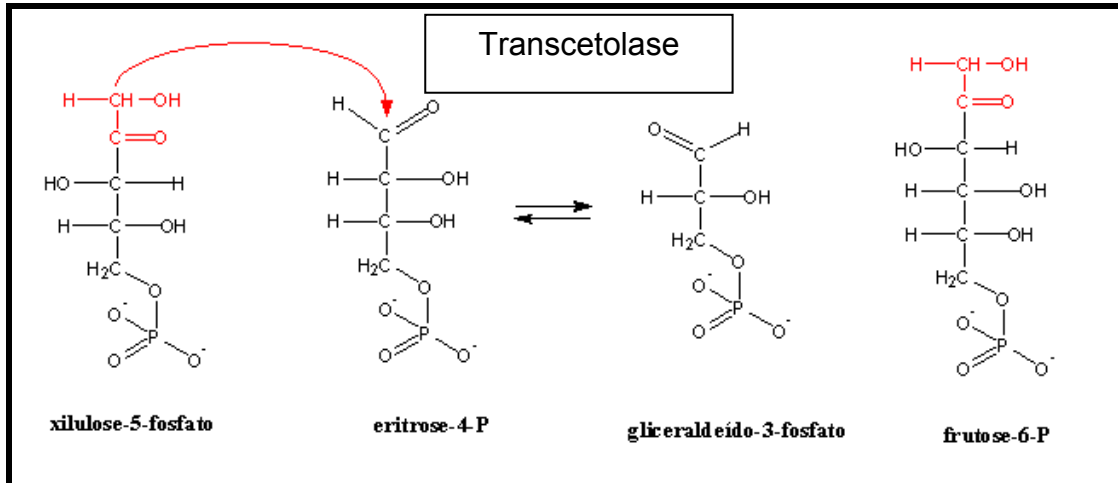


Figura 4- Reação catalizada pela transcetolase. Transferência de uma unidade de 2 carbonos de uma cetose (destaque em vermelho) para uma aldose produzindo uma cetose. Essa transformação faz parte da via das pentoses. Tiamina é essencial para que essa reação ocorra nas células.

As outras duas enzimas que requerem tiamina como cofator são: 1) o complexo da piruvato desidrogenase e 2) da α -cetoglutarato desidrogenase. O complexo da piruvato desidrogenase, é a enzima responsável por transformar o piruvato, produzido pela via glicolítica, em acetilCoA. (Figura 5) (Gibson et al., 2002; Lonsdale, 2006; Schabelman et al., 2012;).

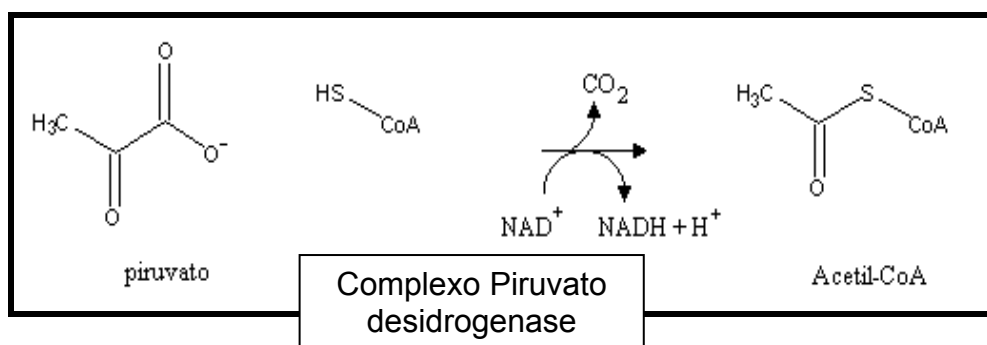


Figura 5 – Descarboxilação oxidativa do piruvato em Acetil-CoA pela ação do complexo piruvato desidrogenase.

Já a α -cetoglutarato desidrogenase, uma enzima presente no ciclo de Krebs, é responsável pela descarboxilação do α -cetoglutarato em succinil-CoA (Figura 6) (Gibson et al., 2002; Lonsdale, 2006; Stryer, 2008; Schabelman et al., 2012;).

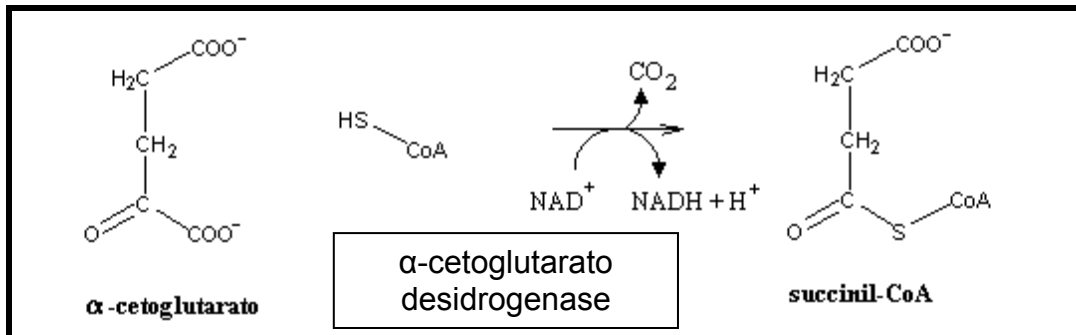


Figura 6 – Transformação do α -cetoglutarato em succinil-CoA pela α -cetoglutarato desidrogenase

A falta de tiamina leva ao comprometimento da atividade da transcetolase, prejudicando a síntese de ácidos nucleicos pela falta de ribose-5-fosfato e por outro lado, a falta de NADPH leva ao comprometimento das reações químicas do metabolismo de síntese que utilizam átomos de hidrogênio para a produção de esteróides, ácidos graxos, aminoácidos, e certos neurotransmissores, bem como a glutatona, importante no controle do estresse oxidativo (Butterworth, 1982; Martin et al., 2003; Dror et al., 2010).

O desequilíbrio causado pelo comprometimento do complexo piruvato desidrogenase reduz a produção de acetil-CoA, podendo levar ao aumento nos níveis de lactato, gerando uma condição sistêmica denominada de acidose metabólica (Klein et al., 2004; Hazell, 2009; Jhala et al., 2011; Schabelman et al., 2012). Já o comprometimento da α -cetoglutarato desidrogenase diminui a produção de ATP, devido à diminuição da produção de equivalentes redutores (NADH e FADH_2) através do ciclo do ácido cítrico, os quais seriam re-oxidados pelos complexos I e II da cadeia respiratória. Portanto, ocorre uma redução do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso, o que por sua vez diminui o gradiente eletroquímico, reduzindo assim a produção de ATP, o que contribui para desencadear o processo de morte celular (Singleton et al., 2001; Szweda et al., 2002; Hazell, 2009; Jhala et al., 2011).

A deficiência em tiamina pode ocorrer freqüentemente devido a diversos fatores, como alimentação inadequada, consumo de alimentos contendo tiaminases ou alimentos que passaram por um longo tempo de cozimento (Walter & Talbot 1996; Lonsdale, 2006; Schabelman et al., 2012; Thomson et al.,2012), e torna-se comum também em pessoas com deficiências nutricionais, com distúrbios gastrointestinais, anorexia nervosa ou pessoas com dependência de álcool (Butterworth, 2003; Klein et al., 2004; Dror et al., 2010; Jhala et al., 2011; Schabelman et al., 2012; Thomson et al.,2012).

A carência desta vitamina na alimentação humana pode conduzir ao beribéri (nas manifestações - seco e úmido) e a Síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK) (Singleton et al., 2001; Martin et al., 2003; Pires et al., 2005; Stepuro, 2005; Lonsdale, 2006; Francini-Pesenti et al., 2009; Thomson et al.,2012). Os primeiros sintomas da deficiência de tiamina são perda de peso, imprecisão motora, edema e parestesias (Martin et al., 2003; Mulholland, 2006). Se houver persistência da deficiência, há conseqüências graves sobre o sistema nervoso e cardiovascular (Walter & Talbot, 1996). No homem, o beribéri se desenvolve em aproximadamente 80 a 90 dias (Cook,1996), contudo no rato, já é evidente a partir do 17º dia (Warnock,1970) mostrando danos neurológicos a partir de 35 a 45 dias de deficiência(Butterworth, 1982).

Quando o beribéri atinge o sistema nervoso, caracterizando uma neuropatia periférica, é chamado de beribéri seco, tendo como conseqüência dormência e anestesia dos membros. Quando atinge o sistema cardiovascular e muscular, é chamado beribéri úmido, e causa cardiomegalia, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca congestiva, taquicardia, edema periférico e fraqueza muscular. (Walter & Talbot 1996). Outra complicação da falta de tiamina é a síndrome de Wernicke-Korsakoff, que foi definida por Victor et al. (1971) (como citado por Thomson et al., 2012), como uma severa desordem neurológica em que a memória e a aprendizagem são afetadas, e que acomete, com maior freqüência, alcoolistas e pessoas com uma alimentação inadequada (Francini-Pesenti et al., 2009; Dror et al., 2010; Jhala et al., 2011; Schabelman et al., 2012; Thomson et al.,2012). Os principais sintomas dessa síndrome são anormalidades oculares, ataxias, distúrbios de consciência e de estado mental, apatia e quadros de amnésia (Homewood & Bond, 1999; Munir et al., 2001; Fellgiebel et al.,2003; Hazell, 2009)

Em estudos anteriores do nosso grupo, os animais deficientes em tiamina apresentaram diminuição do peso corporal (Figura 7), ataxia cerebelar, quando submetidos a testes comportamentais, e no teste de marcha, apresentaram uma base alargada e um maior comprimento da passada (Oliveira et al., 2007a). Em um estudo realizado por Gioda et al., 2010, em tecido cardíaco, foi verificado uma menor espessura e um menor número de cardiomiócitos, bem como, uma menor largura e comprimento dos mesmos no coração de ratos deficientes em tiamina. Acrescenta-se ainda que foi observada uma redução na atividade contrátil de células isoladas nos ratos deficientes em tiamina.

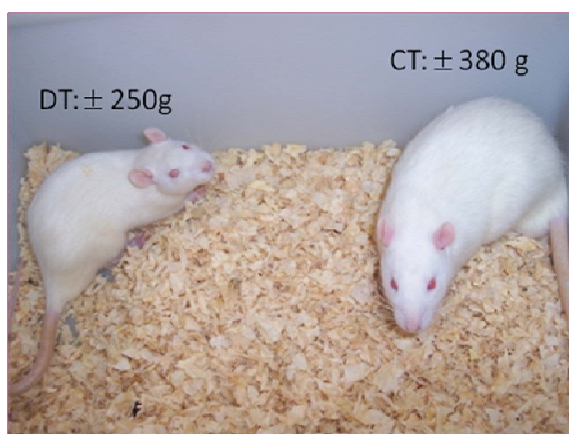


Figura 7 – Diferença de peso corporal entre animais controles e deficientes em tiamina.

O tratamento do beribéri e da síndrome de Wernicke-Korsakoff é a reposição de tiamina (oral, intra-venosa ou intra-muscular) que tem resposta rápida e leva a uma melhora progressiva do quadro (Munir et al., 2001; Thomson & Marshall, 2005; Lonsdale, 2006; Hazell, 2009; Thomson et al., 2012). O beribéri úmido necessita de tratamento imediato, pois conduz a morte repentina. Por outro lado, na síndrome de Wernicke-Korsakoff, a demora no tratamento pode conduzir a lesões cerebrais irreparáveis (Butterworth, 1982; Walter & Talbot, 1996; Hahn et al., 1998; Vasconcelos et al., 1999).

Um dos principais efeitos tóxicos da acidose láctica consequente da deficiência em tiamina é um aumento na produção de espécies reativas e da lipoperoxidação (Barc et al., 2004; Gioda et al., 2010). O estresse oxidativo é sugerido como causa de diversas doenças degenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Wernicke-Korsakoff (Mousseau et al., 1996; Andersen, 2004).

2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS), DEFESA ANTIOXIDANTE E O ESTRESSE OXIDATIVO

Um radical livre é definido como qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell et al., 1999; Fang et al., 2002; Gonzales et al., 2002; Valko et al., 2006). Isto resulta em instabilidade eletrônica e confere às espécies radicalares a capacidade de extrair elétrons de outras biomoléculas para completar seu orbital, conseqüentemente, estes compostos apresentam um tempo de vida extremamente curto. Devido à alta reatividade química, os radicais livres são capazes de reagir com outras moléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, modificando suas estruturas moleculares. As espécies reativas de oxigênio (ROS) incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}) e o peróxil (RO_2^{\cdot}), já as espécies reativas de nitrogênio (RNS), incluem o óxido nítrico ($\cdot NO$) e o dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$) (Fang et al., 2002; Valko et al., 2006; Dennery, 2010; Leornarduzzi et al., 2010). Existem ainda espécies não radicalares, que não apresentam elétrons desemparelhados, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Droge, 2002; Fang et al., 2002; Valko et al., 2006; Leornarduzzi et al., 2010).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas naturalmente em nosso organismo através de vários processos metabólicos (Urso et al., 2003; Dennery, 2010; Leornarduzzi et al., 2010; Reuter et al., 2010). A maior parte do oxigênio consumido na cadeia respiratória sofre redução tetravalente, uma adição de quatro elétrons ao oxigênio para a formação de água. O restante é reduzido de forma univalente propiciando a formação das espécies reativas de oxigênio (Halliwell et al., 1999; Fang et al., 2002; Valko et al., 2006; Chandel & Budinger, 2007; Leornarduzzi et al., 2010; Reuter et al., 2010) (Figura 8). A redução univalente do oxigênio, que resulta na formação do ânion superóxido, ocorre principalmente nos complexos I, II e III da cadeia respiratória, sendo que, a formação de ROS nos complexos I e II ocorre na matriz mitocondrial, e no complexo III, ocorre tanto na matriz mitocondrial quanto no espaço intermembranoso (Figura 7) (Fearon et al., 2009; Tahara et al., 2009; Leornarduzzi et al., 2010; Dhar et al., 2012).

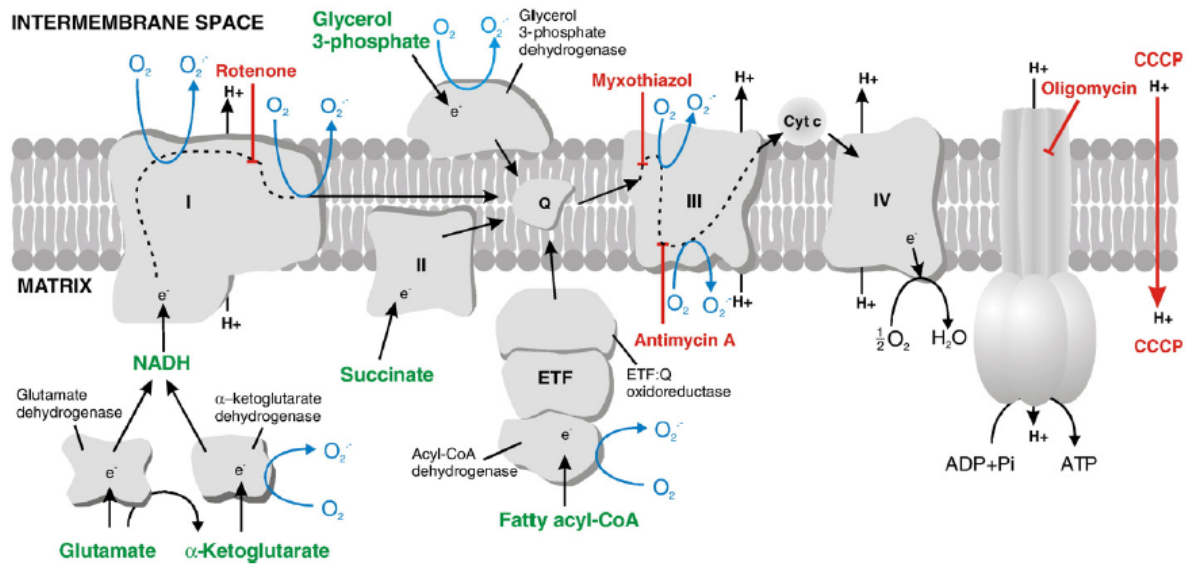


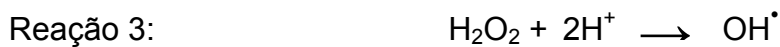
Figura 8 - Formação de espécies reativas de oxigênio nos complexos I, II e III da cadeia respiratória (Tahara et al., 2009).

Existem também outras fontes de produção de ROS, como a NADPH oxidase, uma enzima presente nos macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, do músculo liso vascular e no coração, que produz o ânion superóxido através da transferência de elétrons a partir do NADPH para o oxigênio molecular (Zhao et al., 2008; Fearon et al., 2009; Dennery, 2010; Leonarduzzi et al., 2010; Kryston et al., 2011). A enzima xantina oxidase também é responsável pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Esta enzima catalisa a conversão de hipoxantina em ácido úrico. Concentrações aumentadas de cálcio intramuscular podem ativar as proteases dependentes de cálcio, que convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase. A xantina oxidase usa oxigênio molecular ao invés de NAD^+ como acceptor de elétrons produzindo o ânion superóxido (Gonzales et al., 2002; Valko et al., 2006; Ji et al., 2007; Dennery, 2010;).

A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental resulta na formação do ânion superóxido (Reação 1). Este ao receber mais um elétron e dois íons de hidrogênio forma o peróxido de hidrogênio através do processo de dismutação, uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (Reação 2) (Fang et al., 2002; Urso et al., 2003).

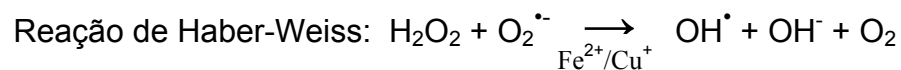
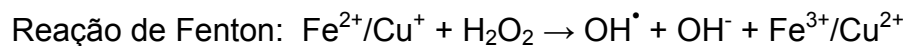


Quando o peróxido de hidrogênio recebe mais um elétron e um íon de hidrogênio é formado o radical hidroxil (Reação 3), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular (Fang et al.,2002; Urso et al.,2003).



O radical hidroxil pode ser formado também quando o peróxido de hidrogênio reage com íons de ferro e cobre, pela reação conhecida como Reação de Fenton e quando íons ferro, cobre e o ânion superóxido reagem com o peróxido de hidrogênio pela Reação de Haber-Weiss (Reação 4) (Valko et al.,2006; Chandel & Budinger, 2007) .

Reação 4:



As espécies reativas de oxigênio também têm papéis essenciais para a vida sob condições fisiológicas (Cnubben et al., 2001; Urso et al., 2003; Dennery, 2010; Leonarduzzi et al., 2010; Reuter et al.; 2010). Estes compostos estão envolvidos na defesa do organismo contra inflamação, angiogênese, na transcrição de genes, regulação do metabolismo e ativação de enzimas (Urso et al., 2003; Forman, 2007; Ji, 2007; Valko et al., 2007; Leonarduzzi et al., 2010).

Para manter a homeostase celular e evitar um desbalanço na produção de ROS, todas as células possuem sistemas de defesa antioxidantes que apresentam componentes enzimáticos e não enzimáticos (Molina & Garcia, 1997; Urso et al., 2003). O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD – isoformas CuZn e

Mn), catalase (CAT), e glutationa peroxidase (GPx) (Figura 9) (Matés et al., 2000; Valko et al., 2006; Leonarduzzi et al., 2010; Reuter et al., 2010; Kryston et al., 2011; Dhar et al., 2012).

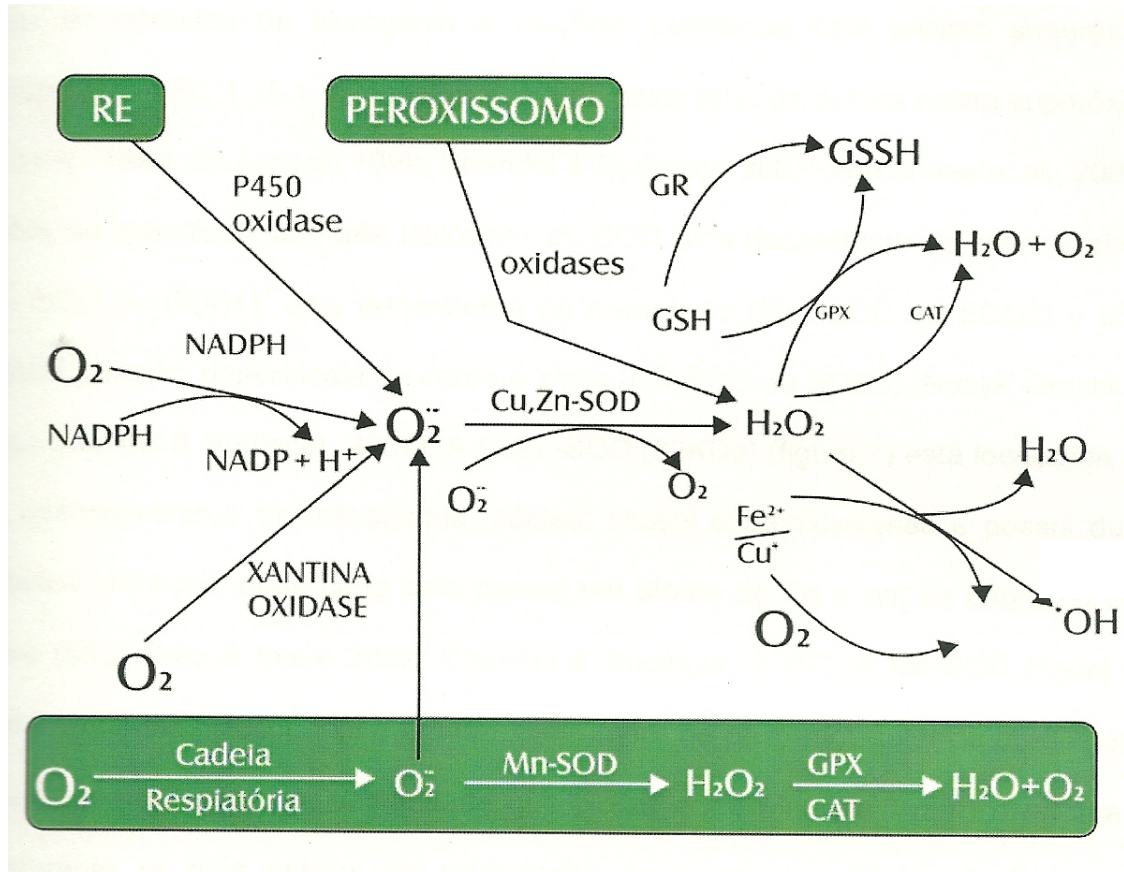


Figura 9 – Sistemas celulares de defesa antioxidantes enzimáticos (modificado de Matés et al., 2000)

A enzima superóxido dismutase (SOD), considerada a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido, é responsável por sua dismutação, que resulta na formação de peróxido de hidrogênio (Reação 5) (Matés et al., 1999; Chandel & Budinger, 2007; Reuter et al., 2010).



A SOD possui três isoformas, uma dependente de cobre e zinco (CuZn-SOD – 32kDa), que está localizada no espaço intermembranar da mitocôndria, núcleo, citosol e perioxossomas, uma dependente de manganês (Mn-SOD – 96 kDa), presente na matriz mitocondrial, e uma extracelular dependente de cobre e zinco (CuZn-SOD – 135 kDa) (Figura 10) (Matés et al., 1999; Matés et al., 2000; Valko et

al.,2006; Chandel & Budinger, 2007; Reuter et al.; 2010; Salmon et al., 2010; Dhar et al., 2012).

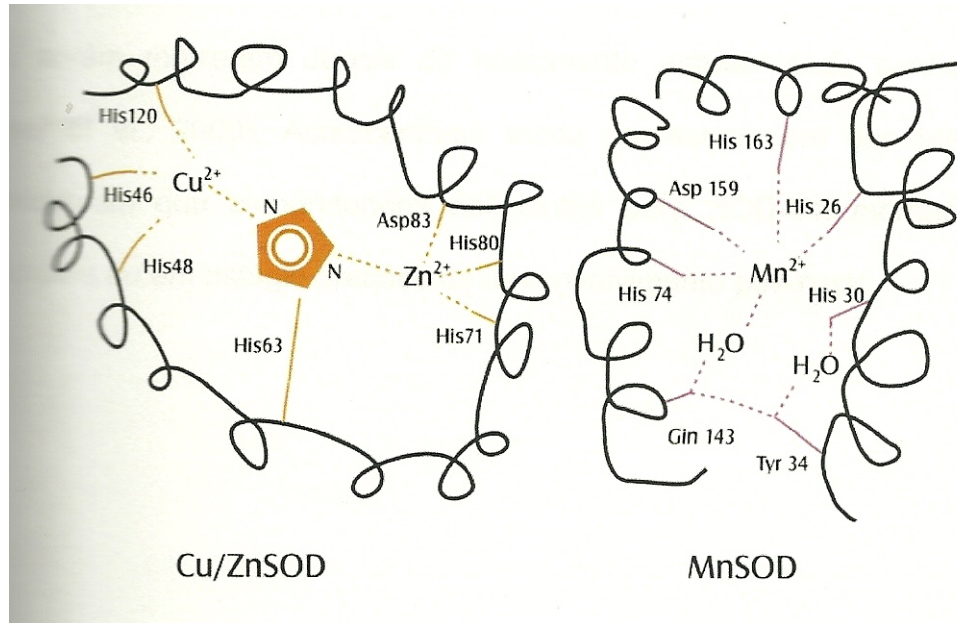
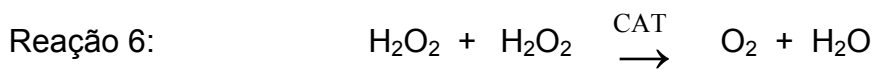


Figura 10 – Distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas superóxido dismutase dependente de Cu/Zn e de Mn (Landis & Tower, 2005).

A catalase (240 kDa) uma enzima dependente de ferro, é encontrada nos perixomos e em menores níveis no citosol. Ela atua decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Reação 6, Figura 11) (Molina & Garcia, 1997; Valko et al., 2006; Salmon et al., 2010; Nicholls, 2012).



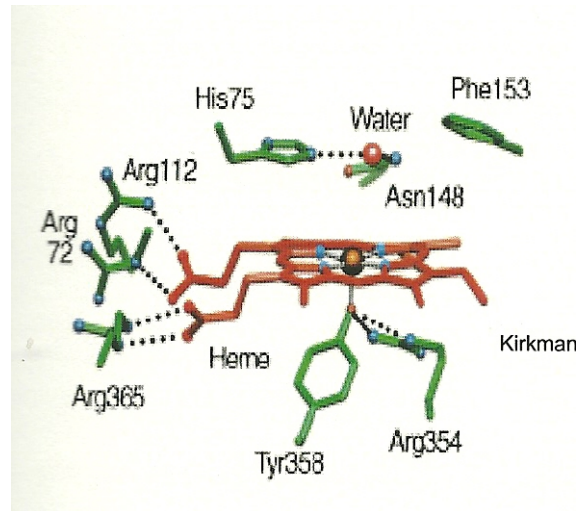
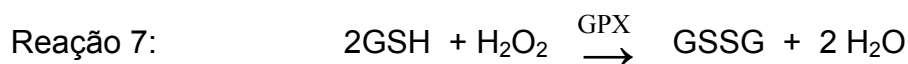


Figura 11 – Distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da catalase. Em destaque o grupamento heme. (Kirkman & Gaetani, 2006).

A glutathiona peroxidase (80 kDa), uma enzima dependente de selênio, é encontrada no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, e também tem o papel de decompor o peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos orgânicos em água e oxigênio através da oxidação de duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) formando a glutathiona oxidada (GSSG) (Reação 7, Figura 12) (Matés et al., 1999; Day et al., 2009; Salmon et al., 2010). Esta enzima é considerada o maior sistema de controle redox citosólico e é dependente da glutathiona reduzida (GSH) no meio intracelular para seu funcionamento. A enzima glutathiona redutase utiliza o NADPH para reduzir o GSSG e regenerar GSH que será utilizado pela GPx (Fang et al., 2002; Gonzales et al., 2002; Day et al., 2009). O metabolismo da glicose e o ciclo das pentoses fosfato exercem uma função crucial na produção de NADPH e manutenção da razão de GSH:GSSG e conseqüentemente o estado redox normal da célula (Fang et al., 2002).



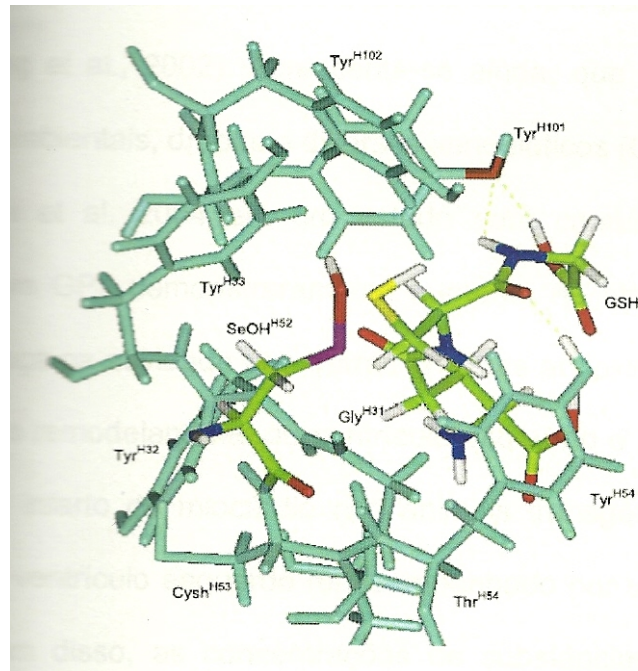


Figura 12 - Distribuição geométrica dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo glutathione peroxidase (Zhang et al., 2005).

Já o sistema antioxidante não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano, como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, ácido úrico, e outros, que são ingeridos através da dieta como vitamina C, vitamina E, β -caroteno e grupos fenóis (Matés et al., 1999; Fang et al., 2002; Urso et al., 2003; Fearon et al., 2009; Leornarduzzi et al., 2010; Reuter et al.; 2010; Kryston et al., 2011).

O termo estresse oxidativo é utilizado em situações em que as espécies radicalares causam dano tecidual, como danos ao DNA e membranas, degeneração de tecidos, envelhecimento prematuro e morte celular por apoptose. Pode-se dizer que ocorre um desequilíbrio entre os sistemas próoxidantes, geradores das espécies reativas, e antioxidantes, de modo que as defesas antioxidantes são insuficientes para destoxificar e neutralizar os níveis aumentados de ROS que são formados por reações metabólicas que envolvem o oxigênio (Matés et al., 2000; Leornarduzzi et al., 2010; Reuter et al.; 2010; Kryston et al., 2011).

Um dos principais mecanismos culminando com a degradação de macromoléculas produzido pelo estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, uma complexa seqüência de reações bioquímicas que atinge ácidos graxos poliinsaturados (Ahmad, 1995).

O processo de peroxidação lipídica se dá quando espécies reativas (OH^\bullet , HOO^\bullet , ONOO^-) abstraem um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular formando o radical lipídico (L^\bullet) (Reação 8). (Fang et al., 2002; Urso et al., 2003).



Este radical reage rapidamente com o O_2 gerando o radical peroxil (LOO^\bullet) (Reação 9), que por sua vez, abstrai um novo hidrogênio de outro ácido graxo poliinsaturado próximo, formando novamente o L^\bullet (Reação 10), e com isso o processo de peroxidação lipídica se propaga. (Fang et al., 2002; Urso et al., 2003).



Um dos produtos da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), um dialdeído reativo, capaz de reagir com proteínas, fosfolipídios ou ácidos nucleicos, induzindo modificações estruturais das biomoléculas, danificando a integridade celular (Fang et al., 2002; Urso et al., 2003; Leonarduzzi et al., 2010; Ma, 2010).

A peroxidação lipídica altera e desarranja a estrutura molecular lipídica. Essa perturbação da integridade da membrana mitocondrial pode resultar na produção adicional de radicais livres, com isso, pode ocorrer morte celular e comprometimento das funções orgânicas (Fang et al., 2002; Urso et al., 2003).

Em um estudo do nosso grupo, foi observado um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio, alterações nos sistemas de defesa antioxidantes, um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e a presença de processo apoptótico nos cardiomiócitos de ratos deficientes em tiamina (Gioda et al., 2010).

3. FÍGADO, RIM E MÚSCULO ESQUELÉTICO

Tecidos como o fígado, rim, músculo esquelético e cardíaco, são órgãos metabolicamente ativos que necessitam de energia, vinda do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, para executarem suas atividades vitais. Cada órgão tem um perfil metabólico característico, considerando que diferem na utilização de alimentos para satisfazerem suas necessidades energéticas e manterem suas atividades metabólicas (Stryer, 2008; Orman et al., 2011).

3.1 Fígado

O fígado tem importante função fisiológica, no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Orman et al., 2011). As atividades metabólicas desse tecido são essenciais para o provimento de material energético para cérebro, músculo e outros órgãos periféricos. O fígado, que pode ter de 2 a 4% do peso corporal, é a usina metabólica do organismo. A maior parte dos compostos absorvidos no intestino passa através do fígado, o que permite que ele regule o nível de muitos metabólitos no sangue (Rigby et al., 2001).

O fígado remove dois terços da glicose do sangue (glicose da dieta) e deixa o restante para a utilização dos outros tecidos. A glicose removida tem uma gama de destinos, embora o fígado utilize-a pouco para suas próprias necessidades energéticas (Girard & Lafontan, 2008). A maior parte da glicose é convertida em glicogênio e desta maneira, armazenada neste tecido. O excesso de glicose é metabolizado a Acetil-CoA, que é utilizado para formar ácidos graxos, colesterol e sais biliares. A via das pentoses também utiliza glicose para a produção de NADPH que será utilizado para biossínteses redutoras. O fígado pode também produzir glicose para a liberação no sangue, através da degradação do glicogênio e ativação da gliconeogênese (Girard & Lafontan, 2008; Tessari et al., 2009; Orman et al., 2011). O fígado desempenha também um importante papel no metabolismo do lactato, em sua transformação para a produção de glicose e glicogênio, através do Ciclo de Cori (Okorie & Dellinger, 2011).

O fígado também desempenha um papel importante na regulação do metabolismo lipídico. Ele determina o destino dos ácidos graxos no organismo. Quando há alimento abundante, os ácidos graxos derivados da dieta ou sintetizados

pelo fígado são secretados no sangue na forma de lipoproteína de muito baixa densidade, ou são exportados para o tecido adiposo e incorporados aos triglicerídeos. Contudo, no jejum prolongado, o fígado transforma os ácidos graxos em corpos cetônicos (Tessari et al., 2009; Orman et al., 2011). Além disso, esse órgão também desempenha papel essencial no metabolismo de aminoácidos. Ele absorve a maior parte deles, e deixa o restante para serem utilizados pelos tecidos periféricos. O uso prioritário dos aminoácidos é para a síntese protéica e não para o catabolismo, mas quando ocorre o catabolismo, ele se inicia com a remoção do nitrogênio. Os α -cetoácidos são então utilizados para a gliconeogênese ou para a síntese de ácidos graxos. Eles também são fonte de energia para o próprio fígado (Tessari et al., 2009; Orman et al., 2011).

3.2 Rim

A função principal do rim é produzir urina, que serve para excretar produtos indesejados do metabolismo e para manter a osmolaridade dos líquidos corporais. O plasma sanguíneo é filtrado quase que 60 vezes ao dia, e a maior parte do material filtrado é reabsorvido, e somente 1 a 2 litros de urina, em média, são produzidos (Berne e Levi, 2004).

Os rins são órgãos metabolicamente ativos e requerem uma quantidade de energia considerável para manter o processo de reabsorção e secreção tubular exigidos por bombas como as de próton, sódio-potássio ATPase. Embora constituindo apenas 0,5% da massa corporal, consomem 10% do oxigênio utilizado na respiração celular. Além disso, são responsáveis pela produção de eritropoetina, renina, calcitriol e regulação de mecanismos de ácido-base, hidroeletrolítico, osmoregulação (Berne e Levy et al., 2004). Os rins têm também papel importante no metabolismo de aminoácidos e proteínas, através da síntese, degradação, reabsorção de filtração, e a excreção urinária desses aminoácidos (Garibotto et al., 2010).

Durante o jejum, o rim torna-se um local importante de gliconeogênese e contribui com grande parte da glicose sanguínea (Okorie & Dellinger, 2011).

3.3 Músculo esquelético

As principais fontes energéticas para o músculo esquelético são a glicose, ácidos graxos e corpos cetônicos, sendo que no repouso, os ácidos graxos é que são predominantemente utilizados, proporcionando 85% das necessidades energéticas deste tecido (Cortright et al., 1997).

A fonte de energia imediata durante a contração muscular é o ATP. O armazenamento intracelular de ATP é pequeno e, se o músculo for totalmente ativado, os estoques se esgotariam dentro de 2 a 3 segundos (Westerblad et al., 2010). Portanto, outras vias metabólicas, devem ser ativadas para evitar o esgotamento de ATP. Estas vias podem ser divididas em anaeróbias e aeróbias, sendo a primeira mais rápida, atuando em atividades de alta intensidade e de curta duração, enquanto a última predomina durante o exercício submáximo prolongado (Westerblad et al., 2010).

Cerca de três quartos do glicogênio do organismo estão armazenados no músculo. Em atividades de alta intensidade e de curta duração, a via anaeróbia é predominantemente ativada, e este glicogênio é prontamente transformado em glicose-6-fosfato para o uso nas células musculares, já que a glicose é sua fonte energética preferida para atividades musculares intensas. A velocidade da glicólise excede aquela do Ciclo de Krebs, e muito do piruvato é reduzido a lactato, caracterizando a acidose metabólica. Já em atividades de baixa intensidade e longa duração, a fonte energética predominante é a via aeróbia, que utiliza os lipídeos para a geração de ATP (Reid, 2008; Pinheiro et al., 2010; Westerblad et al., 2010).

3.4 Fígado, rim, músculo esquelético e a deficiência em tiamina

A tiamina tem importante papel no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, e na produção de energia metabólica nos diferentes tecidos (Gibson et al., 2002; Bubber et al., 2004; Lonsdale, 2006; Jhala et al., 2011; Dror et al., 2010; Mayr et al., 2011). O desequilíbrio causado pela ausência desta vitamina pode levar ao aumento nos níveis de lactato (Klein et al., 2004; Hazell, 2009; Jhala et al., 2011; Schabelman et al., 2012) e a redução da produção de ATP (Singleton et al., 2001; Szweda et al., 2002; Hazell, 2009; Jhala et al., 2011)

O fígado, rim e músculo esquelético são órgãos metabolicamente ativos que desempenham um papel central no metabolismo energético (Rigby & Schwarz, 2001; Reid, 2008; Westerblad et al, 2010; Orman et al., 2011). Devido a isto, o comprometimento das enzimas que tem a tiamina como co-fator poderia levar a alterações nesses órgãos, o que poderia refletir na perda da homeostase do organismo e comprometer a sobrevivência do mesmo.

Na literatura existe uma lacuna que entendemos importante no que diz respeito aos efeitos de uma dieta deficiente em tiamina sobre a atividade das principais enzimas que participam dos sistemas antioxidantes nestes tecidos.

II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1. JUSTIFICATIVA

A tiamina é uma coenzima essencial para a atividade de importantes enzimas do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, ajudando na produção de energia celular (Gibson et al., 2002; Lonsdale, 2006). Sua ausência na dieta leva assim a uma redução significativa na obtenção de energia, o que contribui para desencadear o processo de morte celular (Singleton et al., 2001; Szweda et al., 2002; Stryer, 2008; Hazell, 2009; Jhala et al., 2011).

Estudos obtidos pelo nosso grupo confirmam a presença de desordem motora nos animais que foram submetidos a uma dieta livre de tiamina (Oliveira et al., 2007a). Em outro estudo, usando tecido cardíaco, foi verificado uma menor espessura e um menor número de cardiomiócitos, bem como, uma menor largura e comprimento dos mesmos no coração de ratos deficientes em tiamina. Um outro parâmetro observado foi uma redução na atividade contrátil de células isoladas nos ratos deficientes. Foi observado também um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio, alterações nos sistemas de defesa antioxidantes, um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e a presença de processo apoptótico no coração de ratos deficientes em tiamina (Gioda et al., 2010).

Órgãos como o fígado e rim, desempenham um papel central no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, enquanto o músculo esquelético desempenha papéis importantes no movimento, manutenção da postura e termogênese (Rigby & Schwarz, 2001; Reid, 2008; Westerblad et al., 2010). Devido a isto, alterações ocasionadas pela deficiência de tiamina podem ou não ocasionar danos oxidativos celulares nesses órgãos o que pode refletir na perda da homeostase do organismo e virem a comprometer a sobrevivência do mesmo.

Na literatura, está bem claro o efeito da deficiência em tiamina no sistema nervoso e cardiovascular, entretanto, nenhum estudo mostra os efeitos desta deficiência em órgãos metabólicos importantes como o fígado, rim e músculo esquelético. Isso nos levou a investigar os efeitos na atividade e expressão proteica de sistemas antioxidantes e, nos níveis de peroxidação lipídica nestes tecidos.

O tratamento de beribéri e síndrome de Wernicke-korsakoff é a reposição de tiamina (oral, intra-venosa ou intra-muscular) que tem resposta rápida e leva a uma melhora progressiva do quadro (Munir et al., 2001; Thomson & Marshall, 2005; Lonsdale, 2006; Hazell, 2009; Thomson et al., 2012). Devido a isto, este trabalho

objetiva investigar também o comportamento do estado redox no tecido cardíaco, antes afetado pela deficiência (Gioda et al., 2010), após a reversão deste quadro, com a reposição da tiamina na dieta dos ratos deficientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

PARTE I

Verificar a peroxidação lipídica e a atividade e expressão proteica de enzimas antioxidantes no fígado, rim e músculo esquelético de ratos submetidos a uma dieta deficiente em tiamina.

PARTE II

Verificar se a reversão da deficiência em tiamina ameniza os efeitos na produção de ROS, no estresse oxidativo e nos sistemas de defesa antioxidantes no tecido cardíaco.

2.2 Objetivos específicos

PARTE I

- ✓ Mensurar a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no fígado, rim e músculo esquelético de ratos submetidos a uma dieta deficiente em tiamina.
- ✓ Determinar os níveis de expressão protéica das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no fígado, rim e músculo esquelético de ratos submetidos a uma dieta deficiente em tiamina.
- ✓ Investigar os níveis de peroxidação lipídica, pela medida dos níveis de TBARs, no fígado, rim e músculo esquelético de ratos submetidos a uma dieta deficiente em tiamina.

PARTE II

- ✓ Investigar os níveis de peroxidação lipídica, pela medida dos níveis de TBARs, no coração após a reposição de tiamina na dieta durante 5 dias para a reversão da deficiência.
- ✓ Mensurar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no coração após a reposição de tiamina na dieta durante 5 dias para a reversão da deficiência.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Grupo experimental

Ratos Wistar machos (200-250g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, foram mantidos no biotério do ICB-UFMG, a 25°C, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a dieta e água. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética n° 042/2006.

PARTE I

Os animais foram divididos em dois grupos, controle que foram submetidos a uma dieta contendo tiamina durante 35 dias, e o grupo deficiente que foram submetidos a uma dieta deficiente em tiamina durante 35 dias (este período já foi previamente determinado por Oliveira et al., 2007b). Após este período, os animais foram sacrificados e o fígado, rim e músculo esquelético foram retirados para a realização das análises propostas.

PARTE II

Os animais foram divididos em dois grupos, controle que foram submetidos a uma dieta com tiamina durante 40 dias e o grupo deficiente que foram submetidos a uma dieta deficiente em tiamina durante 35 dias. Após este período de 35 dias, houve a reposição da tiamina na dieta dos animais deficientes durante 5 dias. Posteriormente, os animais foram sacrificados e o coração foi retirado para a realização das análises propostas.

2. Composição da dieta

As dietas controle e deficiente em tiamina foram preparadas no próprio laboratório como anteriormente descrito por Oliveira et al. (2007b). As duas dietas são isocalóricas e a única diferença entre elas é a presença ou não de tiamina. Na dieta deficiente em tiamina, a caseína é autoclavada, para garantir sua degradação, e a mistura de vitaminas não contém a tiamina.

NUTRIENTE	Quantidade em g/kg de ração
Amido de milho	676
Caseína	200
Óleo de soja	50
Mistura de sais	50
Mistura de vitaminas	10
Celulose	10
Colina – HCl	4
Alfa - Tocoferol	0,1
SAIS MINERAIS	Quantidade em g%
NaCl	13,93
KI	0,08
MgSO ₄ . 7H ₂ O	5,73
CaCO ₃	38,14
MnSO ₄ . H ₂ O	0,40
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,70
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,05
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,05
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,02
KH ₂ PO ₄	38,90
VITAMINA	Quantidade em g/kg
Acetato de retinol	4,0
Colecalciferol	0,6
Menadiona	0,5
i – Inositol	10,0
Niacina	4,0
Pantotenato de Cálcio	4,0
Riboflavina	0,8
Tiamina – HCl *	0,5
Piridoxina	0,5
Ácido fólico	0,2
Biotina	0,04
Vitamina B12	0,003
Sacarose	974,9

Tabela 1 – Composição química da dieta oferecida aos animais. Na dieta deficiente em tiamina faz-se a retirada dessa vitamina da mistura (*)

3. Preparação dos tecidos para a mensuração das atividades enzimáticas e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Fígado, rim, músculo esquelético e coração foram homogeneizados (Euro Turrax T20b IKA LABORTECHNIK) por cerca de 3 minutos em solução salina/Tampão fosfato (pH 7,2), sempre mantidos no gelo. Após este processo, os homogenatos foram centrifugados a 10.000g, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a mensuração da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Para os níveis de TBARS, os homogenatos foram centrifugados a 5.000 g, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Para a determinação da atividade da glutathione peroxidase, as amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl, (50mM, pH 7,5, contendo 5mM de EDTA e 1mM de ditioneitol (DTT)) e centrifugadas a 10.000g, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi retirado para a mensuração da atividade da glutathione peroxidase.

4. Determinação da concentração de proteína nos tecidos

Essa determinação foi feita pelo método de Lowry et al.,1951. Adiciona-se 0,02ml do sobrenadante obtido após a homogeneização dos tecidos, 2,5ml da mistura contendo Na₂CO₃ (2%), CuSO₄ (1%) e tartarato duplo de sódio (2%), nas proporções de 100:1:1. Após 10 minutos, são adicionados 0,25ml do reagente de Folin e a leitura de absorbância realizada em espectrofotômetro a 660nm após 20 minutos. Para a construção da curva padrão foi utilizada a albumina sérica bovina.

5. Determinação dos níveis de TBARS

O TBARS é um ensaio bioquímico utilizado para determinar a presença de peroxidação lipídica nos tecidos pela reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA) que é o principal produto da peroxidação lipídica. Os níveis de TBARS foram mensurados de acordo com o método descrito por Ohkawa et al (1979). Alíquotas do homogeneizado foram adicionadas em duodecil sulfato de sódio

(SDS) a 8,1%, ácido acético 2,5M (pH 3,4), ácido tiobarbitúrico a 0,8%. A mistura foi incubada por 60 minutos a 95° C. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em um espectrofotômetro à 532nm. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de MDA/mg proteína.

6. Atividade da Superóxido Dismutase

Este ensaio foi realizado de acordo com Dieterich et al. (2007), com algumas modificações feitas pelo nosso grupo. Foi adicionado 1ml de tampão fosfato de sódio (50mM, pH 7,8) contendo 1mM de DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético). Alíquotas do homogenato foram adicionadas e a reação foi iniciada com a adição de pirogalol (0,2mM). A leitura foi realizada durante 3 minutos à 37°C no espectrofotômetro a 420 nm. A determinação da atividade da enzima dada em U.mg proteína, foi determinada a partir da capacidade da superóxido dismutase em inibir a autoxidação do pirogalol, onde 1U = 50% de inibição da autoxidação do pirogalol.

7. Atividade da Catalase

O ensaio da catalase foi realizado conforme o método de Nelson & Kiesov (1972), com algumas modificações feitas pelo nosso grupo. Foram adicionados 2 mL de tampão fosfato (50mM, pH 7.0) junto a alíquota do sobrenadante obtido após a homogeneização dos tecidos, e em seguida foi adicionado o substrato (H₂O₂, 3M). A leitura foi realizada durante 1 minuto à 25°C em espectrofotômetro a 240nm. A atividade da catalase foi expressa em $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, sendo que ΔE corresponde a variação da atividade da enzima durante um minuto.

8. Atividade da Glutaciona Peroxidase

O experimento foi realizado de acordo com a descrição do Kit Cayman, adicionando-se o sobrenadante obtido após a homogeneização dos tecidos em 0,12ml do tampão para o ensaio (50mM - Tris HCl pH7.6, 5mM EDTA), 0,05ml da

mistura dos co-substratos (NADPH, glutationa, glutationa redutase). Logo após, adiciona-se 0,02ml do substrato (Hidroperóxido de cumeno) e a leitura foi realizada durante 1 minuto à 25°C a 340nm. O ensaio baseia-se na oxidação do NADPH para NADP⁺ que é acompanhada pela queda da absorção do NADPH. A determinação da atividade da enzima foi dada em nmol NADPH consumido/min/mL.

9. Western Blotting

Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA - Na₂ 5 mM, MgCl₂ 1mM, 1% Nonidet P40, 0,3% triton X-100, 0,5% de SDS e DTT 100mM) e centrifugados a 10.000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e imediatamente congelado a -80°C para uso posterior. As amostras são aplicadas nas canaletas de um gel de poliacrilamida (10%) durante 1 h para que as proteínas sejam separadas de acordo com sua massa molecular. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, mantendo a mesma disposição que apresentavam no gel de poliacrilamida, no processo chamado de transferência, com duração de 1:30h. Após a transferência, é feito o bloqueio da membrana com leite em pó (5%) diluído em PBS-Tween (0,3 %) por 1h. Posteriormente, a membrana foi incubada com uma solução contendo 5% de leite em pó (diluído em PBS-Tween - 0,3%) com anticorpos anti catalase, anti GPx, anti CuZn-SOD e anti Mn-SOD. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário por 2 horas. Logo após isso, a membrana foi revelada por detecção quimioluminescente (Amersham Biosciences do Brasil Ltda).

10. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média ($\bar{x} \pm e.p.m.$) e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student”, com nível de significância $p < 0.05$.

IV RESULTADOS

1. Efeitos na atividade e expressão protéica de sistemas antioxidantes e, nos níveis de peroxidação lipídica no fígado, rim e músculo esquelético de ratos submetidos a uma dieta deficiente em tiamina por um período de 35 dias.

A primeira parte deste estudo objetivou primeiramente verificar se a privação de tiamina causaria alterações na atividade e/ou na expressão protéica das principais enzimas antioxidantes no fígado, rim e músculo esquelético de ratos submetidos a uma dieta livre de tiamina.

Inicialmente, avaliamos a atividade da superóxido dismutase no fígado. Na Figura 13, a barra preta representa o grupo controle e a barra vermelha o grupo deficiente em tiamina. Não houve diferença significativa na atividade desta enzima quando comparamos os grupos controle e deficiente (CT: $1,04 \pm 0,05$ U/mg proteína - n=7; DT: $0,87 \pm 0,08$ U/mg proteína - n=7).

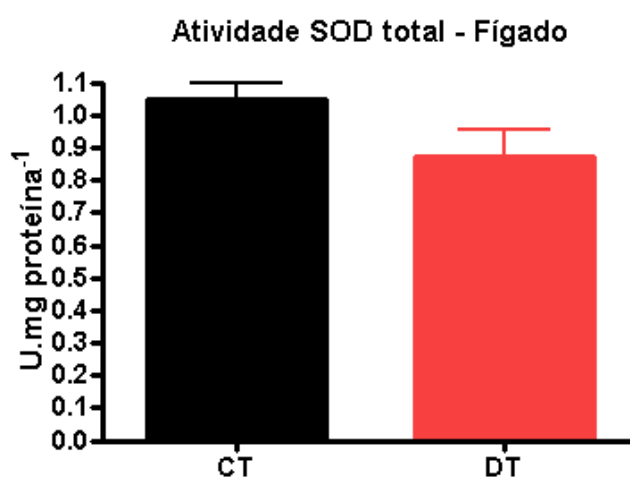


Figura 13 – Atividade da enzima superóxido dismutase no fígado obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

Verificamos então a expressão protéica das duas isoformas da superóxido dismutase, CuZn-SOD e Mn-SOD, e podemos observar na Figura 14, que a expressão protéica destas enzimas também não sofreu alteração com a ausência da tiamina na dieta.

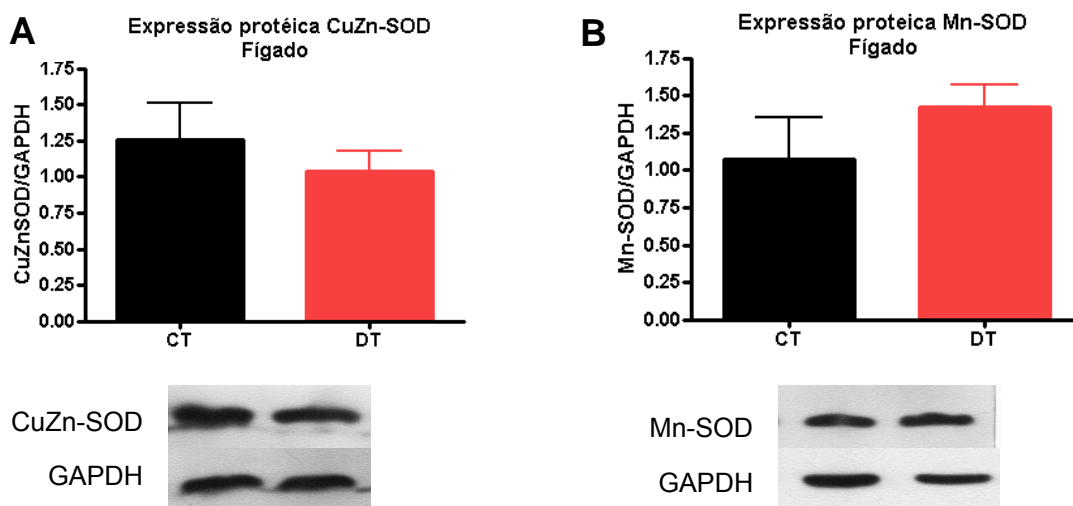


Figura 14 – Expressão protéica da CuZn-SOD (A) e Mn-SOD (B) no fígado obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3). Os dados são representados como a média \pm EPM.

A atividade da catalase está representada na Figura 15, e podemos observar que não houve diferença significativa na atividade desta enzima no fígado de animais controles e deficientes (CT: $10,51 \pm 0,80 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ - n=7; DT: $10,14 \pm 0,67 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ - n=7) e nem em sua expressão proteica (Figura 16).

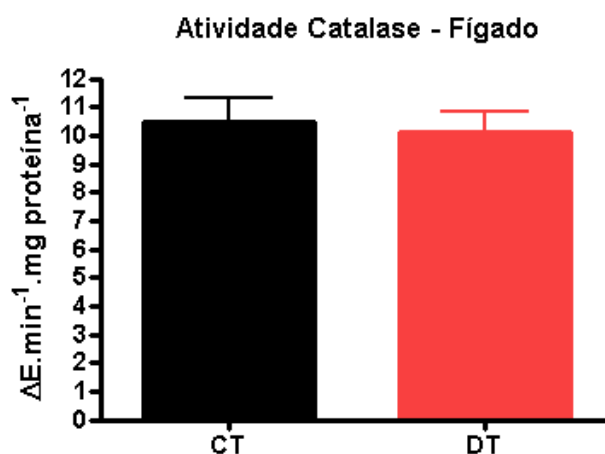


Figura 15 – Atividade da enzima catalase no fígado obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

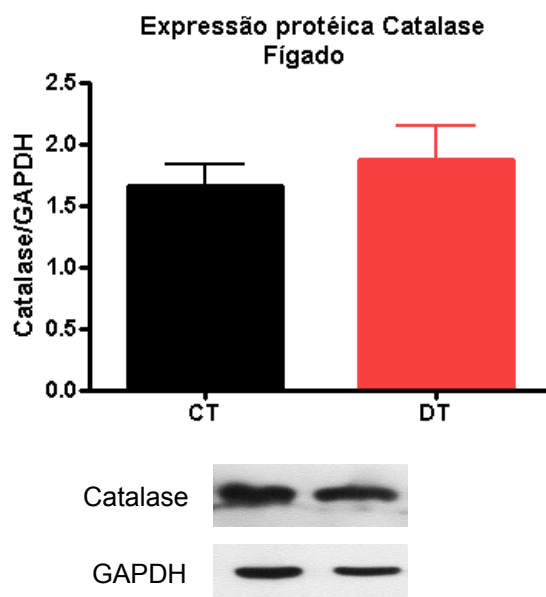


Figura 16 - Expressão protéica da catalase no fígado obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3). Os dados são representados como a média \pm EPM.

A última enzima a ser avaliada foi a glutathiona peroxidase, e como representado na Figura 17, não houve diferença significativa na atividade desta enzima no fígado de animais controles e deficientes (CT: $53,74 \pm 4,63$ nmol NADPH.min⁻¹.ml⁻¹ - n=7; DT: $38,35 \pm 7,69$ nmol NADPH.min⁻¹.ml⁻¹ - n=7) e nem em sua expressão protéica (Figura 18).

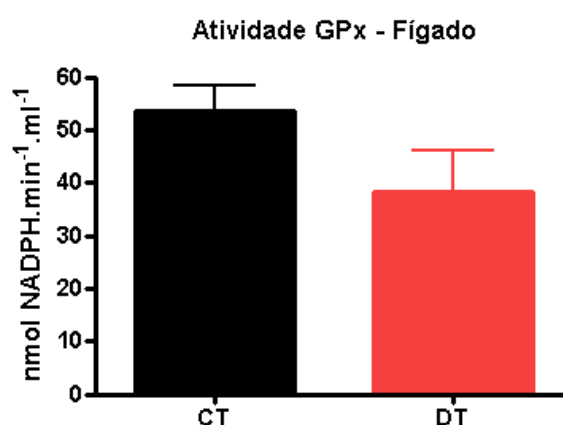


Figura 17 – Atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

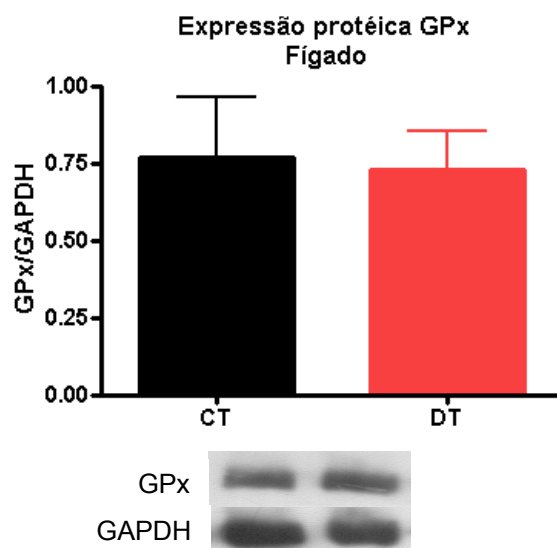


Figura 18 - Expressão protéica da glutatona peroxidase no fígado obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3). Os dados são representados como a média \pm EPM.

O próximo tecido avaliado foi o rim. Nas Figuras 19 e 20 podemos observar que, como no fígado, não houve diferença significativa na atividade (CT: $1,06 \pm 0,06$ U/mg proteína - n=7; DT: $0,87 \pm 0,14$ U/mg proteína - n=7) nem na expressão protéica da enzima superóxido dismutase entre animais controles e deficientes.

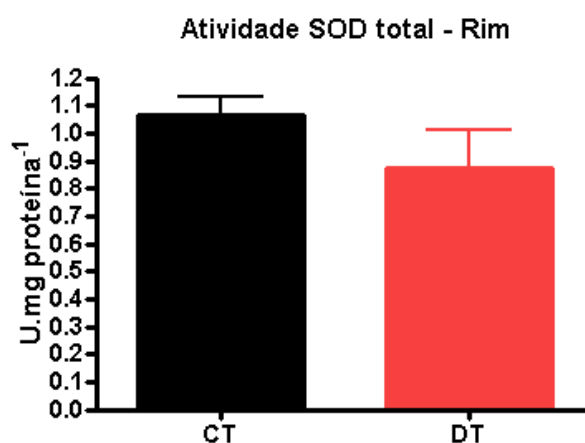


Figura 19 – Atividade da enzima superóxido dismutase no rim obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

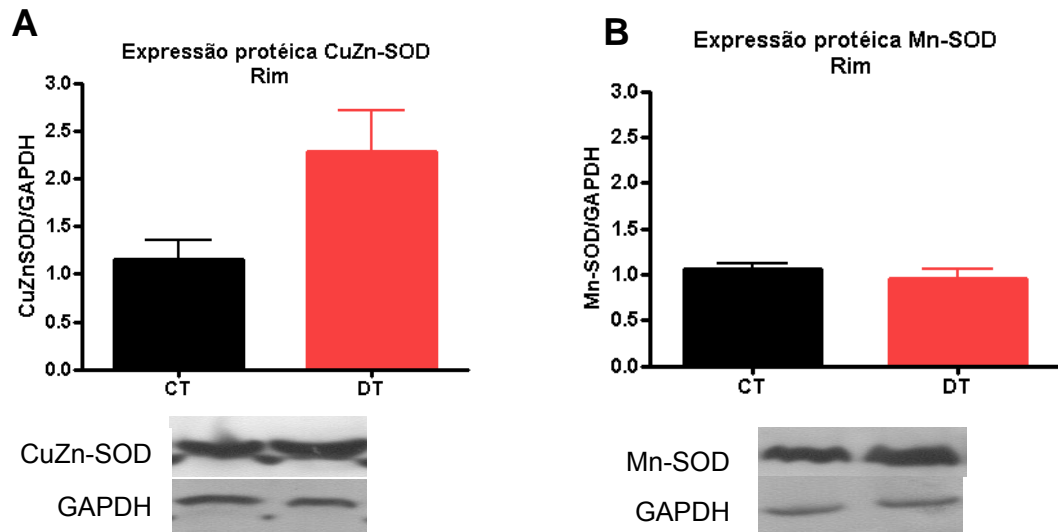


Figura 20 - Expressão protéica da CuZn-SOD (A) e Mn-SOD (B) no rim obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3). Os dados são representados como a média \pm EPM.

Na Figura 21, detectamos uma menor atividade da catalase (aproximadamente 40%) no rim de animais deficientes quando comparados com animais controles (CT: $7,85 \pm 0,38 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ - n=7; DT: $5,56 \pm 0,59 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ - n=7), entretanto, sua expressão protéica não foi alterada significativamente com a ausência da tiamina na dieta (Figura 22).

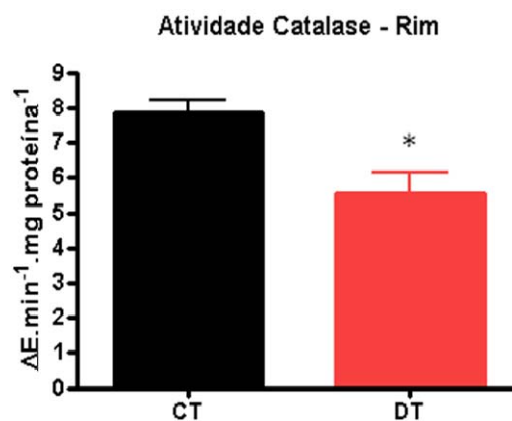


Figura 21 – Atividade da enzima catalase no rim obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7) (* $p < 0,05$). Os dados são representados como a média \pm EPM.

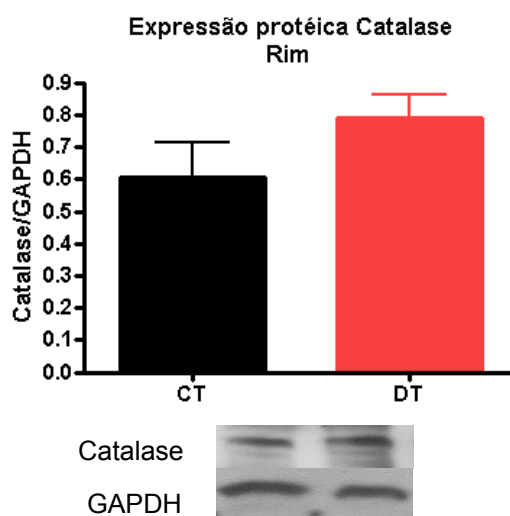


Figura 22 - Expressão protéica da catalase no rim obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3) Os dados são representados como a média \pm EPM.

A atividade da glutathiona peroxidase no rim, assim como no fígado, não foi significativamente diferente entre os grupos controle e deficiente (CT: $18,15 \pm 2,86$ nmol NADPH.min⁻¹.ml⁻¹ - n=7; DT: $14,13 \pm 0,59$ nmol NADPH.min⁻¹.ml⁻¹ - n=7) (Figura 23). Não houve também diferença significativa na expressão proteica desta enzima em animais controles e deficientes (Figura 24).

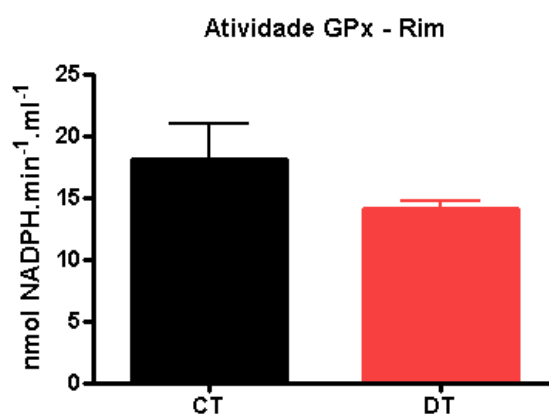


Figura 23 – Atividade da enzima glutathiona peroxidase no rim obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

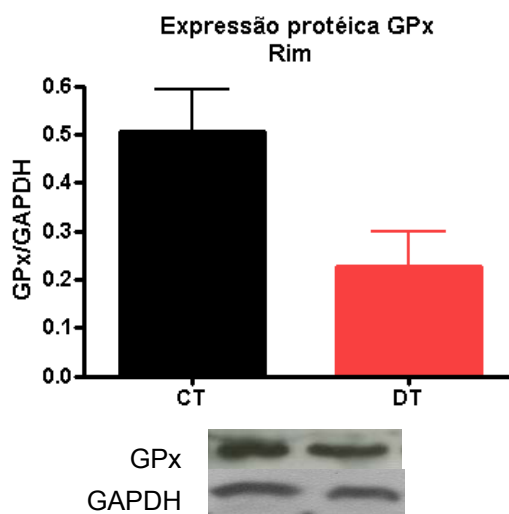


Figura 24 - Expressão protéica da glutiona peroxidase no rim obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3). Os dados são representados como a média \pm EPM.

Diante desta diminuição na atividade da catalase no rim de animais deficientes em tiamina, resolvemos verificar se esta alteração afetaria o estado redox deste tecido. Para isso, avaliamos o nível de peroxidação lipídica, através do método de TBARS, e observamos que não houve diferença significativa entre os grupos controle e deficiente (CT: $3,02 \pm 0,31$ nmol MDA.min⁻¹.mg proteína⁻¹ - n=7; DT: $3,44 \pm 0,55$ nmol MDA.min⁻¹.mg proteína⁻¹ - n=7) (Figura 25).

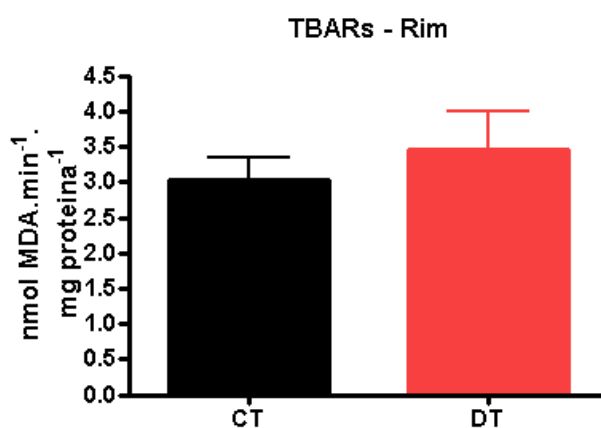


Figura 25 – Níveis de TBARS no rim obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

O último tecido a ser verificado foi o músculo esquelético, que apresentou o mesmo comportamento do fígado e rim na atividade e expressão da superóxido dismutase. Como podemos observar na Figura 26, não houve diferença significativa na atividade da superóxido dismutase (CT: $0,07 \pm 0,01$ U/mg proteína - $n=7$; DT: $0,09 \pm 0,01$ U/mg proteína - $n=7$) nem na expressão protéica entre animais controle e deficientes (Figura 27).

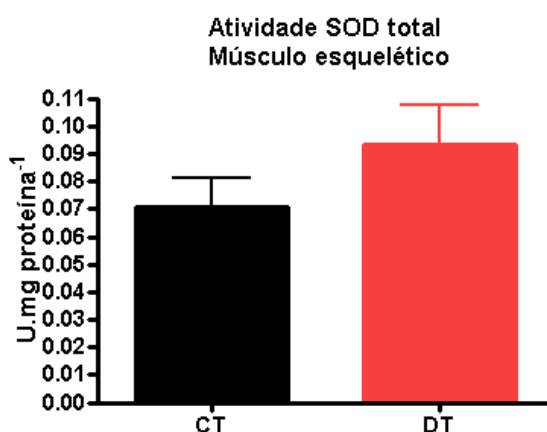


Figura 26 – Atividade da enzima superóxido dismutase no músculo esquelético obtido de animais controles ($n=7$) e deficientes em tiamina ($n=7$). Os dados são representados como a média \pm EPM.

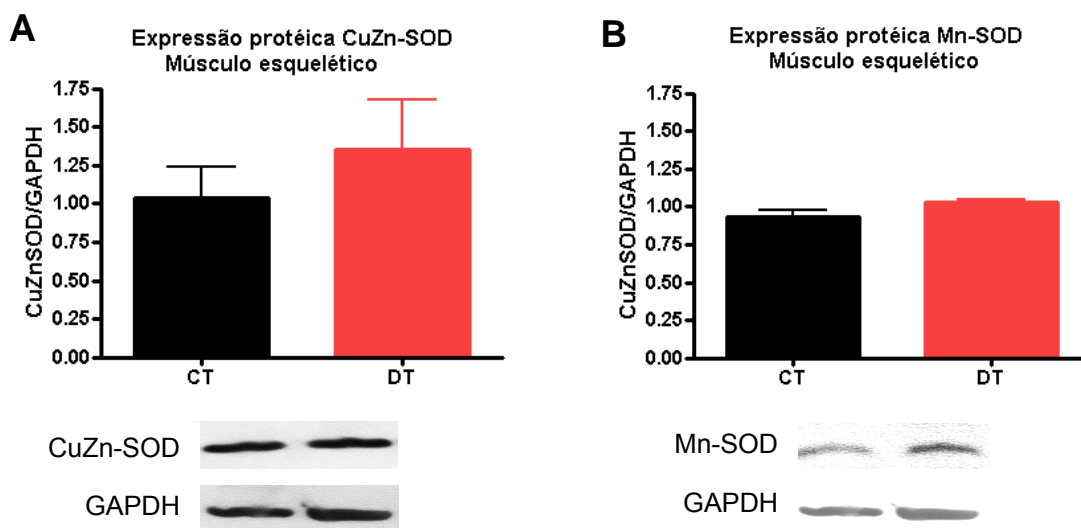


Figura 27 - Expressão protéica da CuZn-SOD (A) e Mn-SOD (B) no músculo esquelético obtido de animais controles ($n=3$) e deficientes em tiamina ($n=3$). Os dados são representados como a média \pm EPM.

Na Figura 28, verificamos uma maior atividade da catalase (cerca de 70%) no músculo esquelético de animais deficientes quando comparados com animais controles (CT: $0,36 \pm 0,03 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$ - $n=7$; DT: $0,61 \pm 0,06 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$ - $n=7$), no entanto, a express\u00e3o prot\u00e9ica da catalase n\u00e3o foi alterada com a aus\u00eancia da tiamina na dieta (Figura 29).

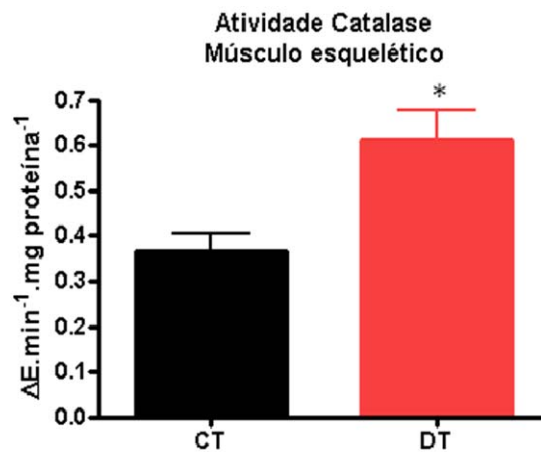


Figura 28 – Atividade da enzima catalase no m\u00fasculo esquel\u00e9tico obtido de animais controles ($n=7$) e deficientes em tiamina ($n=7$) (* $p<0,05$). Os dados s\u00e3o representados como a m\u00e9dia \pm EPM.

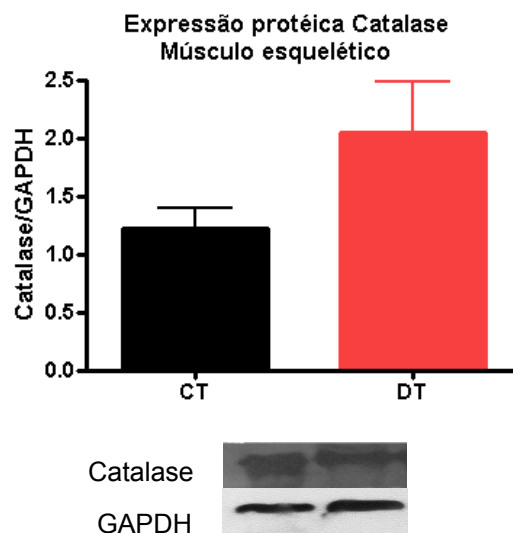


Figura 29 - Express\u00e3o prot\u00e9ica da catalase no m\u00fasculo esquel\u00e9tico obtido de animais controles ($n=3$) e deficientes em tiamina ($n=3$). Os dados s\u00e3o representados como a m\u00e9dia \pm EPM.

A atividade da glutatona peroxidase também foi avaliada. Na Figura 30 podemos observar que não houve diferença significativa na atividade da glutatona peroxidase no músculo esquelético de animais controle e deficientes (CT: $4,45 \pm 1,90$ nmol NADPH.min⁻¹.ml⁻¹ - n=7; DT: $10,44 \pm 2,80$ nmol NADPH.min⁻¹.ml⁻¹ - n=7). No entanto a expressão protéica desta enzima no músculo esquelético foi diminuída nos animais deficientes (aproximadamente 80%) quando comparados com os animais controles (Figura 31).

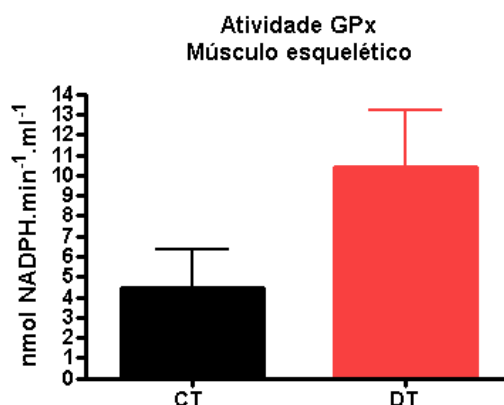


Figura 30 – Atividade da enzima glutatona peroxidase no músculo esquelético obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

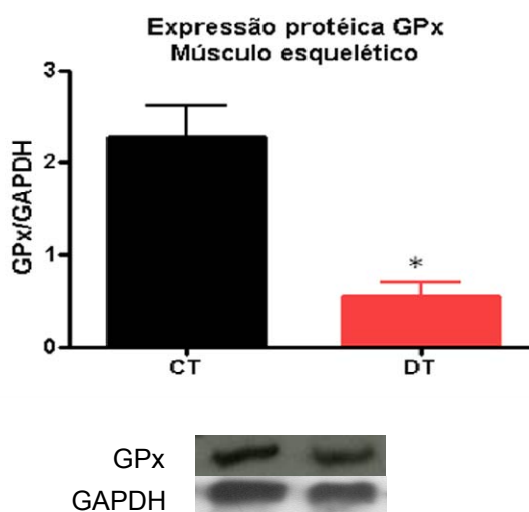


Figura 31 - Expressão protéica da glutatona peroxidase no músculo esquelético obtido de animais controles (n=3) e deficientes em tiamina (n=3) (*p<0,05). Os dados são representados como a média \pm EPM.

Diante deste aumento na atividade da catalase e da redução na expressão protéica da glutatona peroxidase no músculo esquelético de animais deficientes em tiamina, fomos investigar se estas alterações afetariam o estado redox deste tecido. Para isso, avaliamos o nível de peroxidação lipídica, através do método de TBARS, e observamos que não houve diferença significativa entre animais controles e deficientes (CT: $2,31 \pm 0,18$ nmol MDA.min⁻¹.mg proteína⁻¹ - n=7; DT: $2,14 \pm 0,31$ nmol MDA.min⁻¹.mg proteína⁻¹ - n=7) (Figura 32).

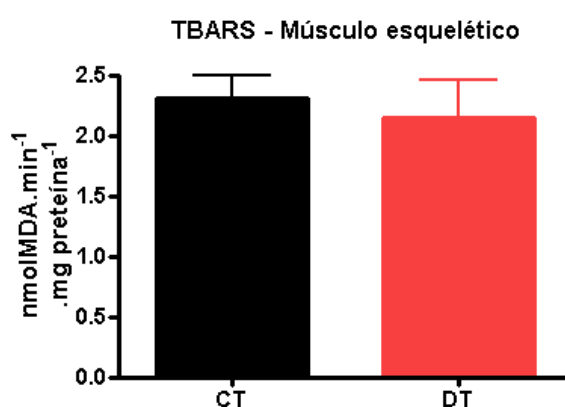


Figura 32 – Níveis de TBARS no músculo esquelético obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

2. Efeito nos níveis de peroxidação lipídica e na atividade de sistemas antioxidantes no tecido cardíaco, após a reposição da vitamina na dieta dos ratos deficientes por um período de 5 dias.

Um estudo do nosso grupo sugere que a deficiência em tiamina afeta a homeostase do tecido cardíaco (Gioda et al.,2010). Estudos na literatura mostram que a reposição de tiamina (oral, intra-venosa ou intra-muscular) ameniza os efeitos da deficiência desta vitamina e leva a uma melhora progressiva do quadro (Munir et al., 2001; Thomson & Marshall, 2005; Lonsdale, 2006; Hazell, 2009; Thomson et al.,2012). Devido a isto, objetivamos investigar o comportamento do estado redox no tecido cardíaco, antes afetado pela deficiência desta vitamina (Gioda et al., 2010), após a reversão deste quadro, com a reposição da tiamina na dieta dos ratos deficientes.

O primeiro aspecto a ser analisado foi o nível de peroxidação lipídica, que estava aumentado com a deficiência em tiamina (Gioda et al., 2010) (Figura 33).

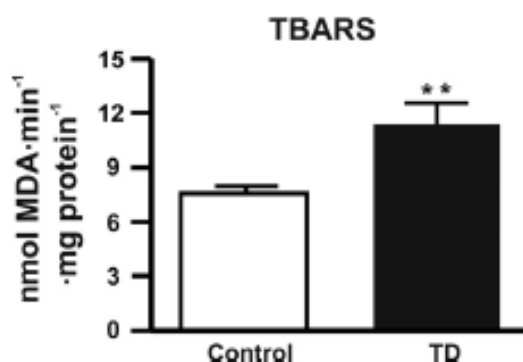


Figura 33 – Níveis de TBARS no coração obtido de animais controles (n=4) e deficientes em tiamina (n=5) (Gioda et al., 2010).

Na Figura 34 podemos observar que após a reposição da tiamina na dieta, os níveis de TBARS nos animais deficientes voltaram aos níveis dos animais controles (CT: $0,17 \pm 0,05$ nmol MDA.min⁻¹.mg proteína⁻¹ - n=7; DT: $0,10 \pm 0,02$ nmol MDA.min⁻¹.mg proteína⁻¹ - n=7).

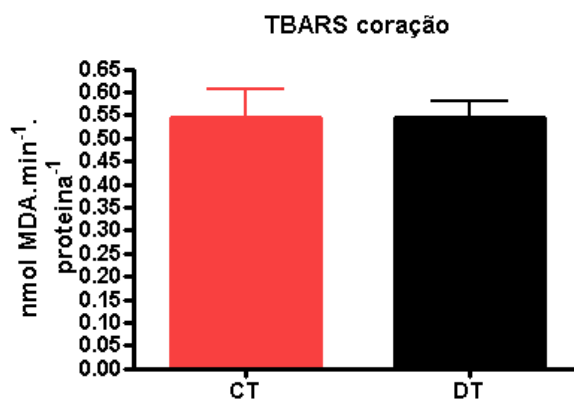


Figura 34 – Níveis de TBARS no coração obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina após reposição da vitamina na dieta (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

Diante desta mudança no quadro redox do tecido cardíaco, resolvemos investigar se a atividade das enzimas antioxidantes dos animais deficientes também se igualaram aos animais controle após a reposição da tiamina na dieta.

A enzima superóxido dismutase foi a primeira a ser avaliada. Segundo Gioda et al. (2010), a atividade desta enzima não se alterou com a deficiência em tiamina (Figura 35). Em nosso estudo, observamos também que não houve diferença significativa na atividade desta enzima, no tecido cardíaco, entre os grupos controle e deficiente após a reposição da tiamina na dieta (CT: $0,104 \pm 0,006$ U/mg proteína - n=7; DT: $0,107 \pm 0,003$ U/mg proteína - n=7) (Figura 36).

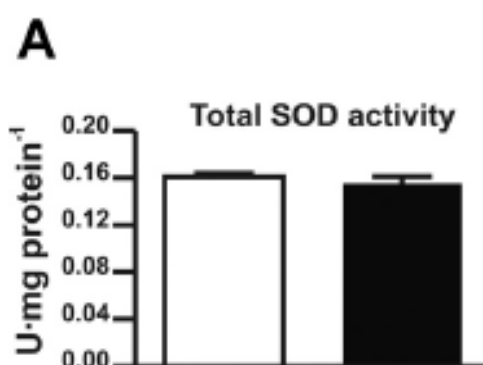


Figura 35 – Atividade da enzima superóxido dismutase no coração obtido de animais controles (n=5) e deficientes em tiamina (n=6) (Gioda et al., 2010).

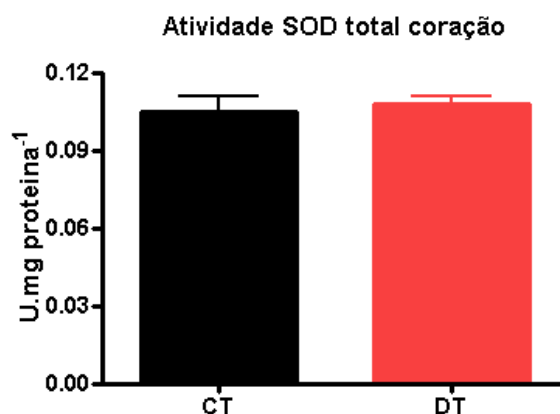


Figura 36 – Atividade da enzima superóxido dismutase no coração obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina após reposição da vitamina na dieta (n=7). Os dados são representados como a média \pm EPM.

A atividade da catalase, que estava aumentada com a deficiência em tiamina (Gioda et al., 2010) (Figura 37), voltou aos níveis dos animais controles após a reposição de tiamina na dieta (Figura 38) (CT: $0,17 \pm 0,05 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ - n=7; DT: $0,10 \pm 0,02 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ - n=7).

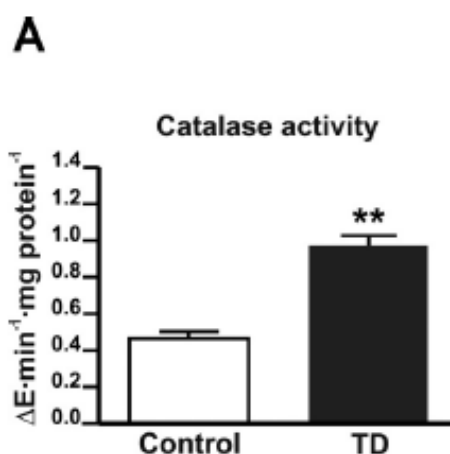


Figura 37 – Atividade da enzima catalase no coração obtido de animais controles (n=5) e deficientes em tiamina (n=6) (Gioda et al., 2010).

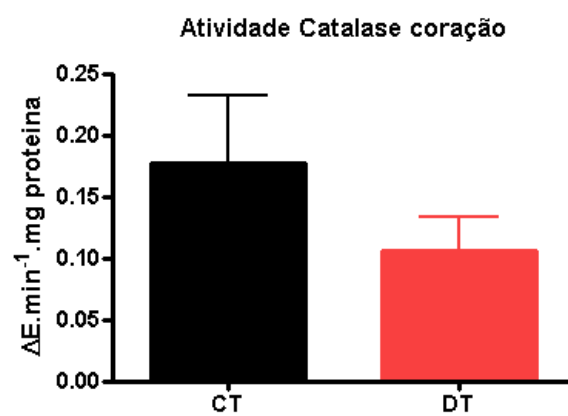


Figura 38 – Atividade da enzima catalase no coração obtido de animais controles (n=7) e deficientes em tiamina após reposição da vitamina na dieta (n=7). Os dados são representados como a média ± EPM.

VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

1. DISCUSSÃO

A tiamina é uma vitamina considerada importante para a manutenção de várias atividades vitais (Lonsdale, 2006; Jhala et al., 2011). A ausência desta vitamina na dieta leva a alterações no metabolismo energético, interferindo assim na produção global de ATP e contribuindo para os níveis aumentados de lactato (Hazell, 2009; Gioda et al., 2010; Jhala et al., 2011; Okorie & Dellinger, 2011). Estas alterações levam a um aumento na produção de radicais livres, estresse oxidativo, e apoptose. (Singleton et al., 2001; Szweda et al., 2002; Hazell, 2009; Gioda et al., 2010; Jhala et al., 2011).

Neste estudo, animais submetidos a uma dieta deficiente em tiamina, apresentaram perda de peso a partir da segunda semana de tratamento em função da redução da ingestão de ração (dados não mostrados). Esses sinais juntamente com a dosagem da atividade da transcetolase sanguínea nos permitem afirmar que os animais estavam entrando no quadro de deficiência em tiamina, confirmando que o tratamento realizado foi efetivo.

Está bem descrito na literatura que a deficiência em tiamina causa danos ao sistema nervoso e cardíaco (Oliveira et al., 2007; Roman-Campos et al., 2010; Gioda et al., 2010), mas nenhum estudo mostra os efeitos desta deficiência em órgãos metabólicos importantes como o fígado, rim e músculo esquelético.

Em um estudo realizado por Gioda et al (2010), foi verificado um aumento nos níveis de lactato no plasma de ratos com deficiência em tiamina. Este aumento está associado a uma diminuição na atividade da piruvato desidrogenase, na qual a tiamina é cofator (Klein et al., 2004; Hazell, 2009; Jhala et al., 2011; Schabelman et al., 2012). Já a redução na produção dos níveis de ATP foi confirmada, ao verificar neste mesmo estudo, uma diminuição no consumo de oxigênio em ratos com deficiência em tiamina. Esta diminuição está associada a uma diminuição na atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase, na qual a tiamina também é cofator (Singleton et al., 2001; Szweda et al., 2002; Hazell, 2009; Jhala et al., 2011).

Um dos principais efeitos tóxicos da acidose metabólica presente neste modelo é a estimulação da formação de radicais livres e a peroxidação lipídica (Barc et al.; 2004; Gioda et al., 2010). Neste modelo de deficiência em tiamina, foi verificado um aumento na produção de radicais livres, nos níveis de TBARS e

processo apoptótico no coração de animais deficientes em tiamina, além de apresentarem também alterações nos sistemas antioxidantes (Gioda et al.; 2010).

O lactato é metabolizado principalmente no fígado (60%), rins (30%), e coração (10%) (Okorie & Dellinger, 2011). Os hepatócitos utilizam o lactato para a produção de glicogênio e glicose através do Ciclo de Cori (Okorie & Dellinger, 2011). Esta capacidade do tecido hepático em dar um destino metabólico para o lactato, talvez possa explicar o fato do fígado ter sido menos afetado pelo aumento dos níveis de lactato e déficit na produção de energia, no modelo de deficiência em tiamina, já que não apresentou nenhuma alteração na atividade e expressão protéica de sistemas antioxidantes e também nos níveis de TBARS. Este fato se explica também pelo fato do fígado ter uma importante função fisiológica no metabolismo energético e ser um órgão de grande plasticidade (Rigby et al., 2001; Orman et al., 2011).

No presente estudo, tecidos como rim e músculo esquelético sofreram alterações na atividade e expressão protéica de algumas enzimas antioxidantes, sem estabelecer um quadro de estresse oxidativo. O córtex renal, assim como o fígado, também utiliza lactato, através da gliconeogênese, para produzir glicose (Okorie & Dellinger, 2011). Este tecido sofreu maiores alterações nos sistemas antioxidantes na deficiência em tiamina quando comparado ao fígado. A atividade de catalase foi reduzida neste estudo, sem alterações nos níveis de TBARS.

No músculo esquelético durante atividade contrátil, a demanda energética pode superar a demanda de repouso, ocorrendo, dessa forma, um grande aumento no consumo de oxigênio e conseqüentemente da produção de espécies reativas de oxigênio através da cadeia respiratória mitocondrial, NADPH oxidase e xantina oxidase (Urso et al., 2003; Reid, 2008; Jackson, 2009; Pinheiro et al., 2010). Em atividades físicas de alta intensidade, a maior parte das mudanças que ocorrem no músculo esquelético são devido a fadiga muscular por causa da necessidade de níveis elevados de ATP. Este fato acelera a via glicolítica anaeróbia e, conseqüentemente, aumenta os níveis de lactato, levando a uma acidose metabólica (Reid, 2008; Westerblad et al., 2010). Apesar de que os ratos deficientes em tiamina não tenham sido submetidos a uma condição de exercício, um mecanismo semelhante acontece devido ao aumento da glicólise anaeróbia e diminuição da produção de ATP.

Embora neste estudo tenham ocorrido um aumento na atividade da catalase e diminuição na expressão protéica da glutathiona peroxidase, não houveram alterações nos níveis de TBARS no músculo esquelético de ratos deficientes em tiamina quando comparados com os ratos controles. Estes resultados confirmam possíveis alterações na produção de radicais livres neste tecido devido a deficiência em tiamina, já que, houveram alterações na expressão e atividade dos sistemas antioxidantes como um indicativo de alterações oxidativas.

Na deficiência em tiamina, a fraqueza muscular está bem caracterizada, (Butheworth et al., 2003; Martin et al., 2003). A perda de peso gradual a partir do décimo sétimo dia (dados não mostrados), demonstraram uma depleção de massa muscular que foi necessária para a sobrevivência do organismo. Portanto um mecanismo adaptativo deve ter sido desenvolvido neste tecido para a realização da mobilização das proteínas e reações de transaminação com a exigência energética. Os resultados deste estudo adicionados ao realizado por Gioda et al. (2010) demonstram a diferente suscetibilidade e capacidade de adaptação de alguns tecidos importantes ao quadro de acidose metabólica e déficit de energia devido a falta de tiamina na dieta.

Estudos mostram que a reversão da deficiência em tiamina é feita através da reposição de tiamina na dieta (oral, intra-venosa ou intra-muscular), que tem uma resposta rápida e leva a uma melhora progressiva do quadro, eficaz principalmente no tratamento do beribéri e da síndrome de Wernicke-Korsakoff (Munir et al., 2001; Thomson & Marshall, 2005; Lonsdale, 2006; Hazell, 2009; Thomson et al., 2012). Neste estudo, submetemos animais deficientes em tiamina a uma reposição desta vitamina na dieta durante 5 dias, a fim de avaliar se haveria uma pronta reversão no quadro de estresse oxidativo e retorno da atividade das enzimas antioxidantes aos níveis dos animais controle no coração e observamos que tanto os níveis de TBARS e atividade da catalase, que estavam alterados nos animais deficientes em tiamina (Gioda et al., 2010), retornaram aos níveis basais. Estes achados confirmam que a reposição da tiamina na dieta reverte o quadro de estresse oxidativo nos animais deficientes.

1.1 Comportamento do metabolismo energético no fígado na presença e na ausência de tiamina

Na presença da tiamina na dieta, a glicose que chega ao hepatócito se transforma em piruvato, em uma seqüência de reações da via glicolítica. Uma pequena parte deste piruvato é transformado em lactato, através da ação da enzima lactato desidrogenase. Este lactato logo é transformado novamente em piruvato através do Ciclo de Cori, reduzindo assim a acidose metabólica no tecido, impedindo uma maior produção de radicais livres. O restante do piruvato se transforma em AcetilCoA, pela piruvato desidrogenase, e entra no ciclo de Krebs que produz equivalentes redutores (NADH e FADH₂) através de diversas reações bioquímicas, os quais são re-oxidados pelos complexos I e II da cadeia respiratória. Ocorre um bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso, gerando um gradiente eletroquímico que favorece a produção de ATP. O oxigênio é o aceptor final do fluxo de elétrons da cadeia respiratória, formando H₂O. Uma pequena quantidade de ânion superóxido é formado, através da redução univalente de oxigênio.

Na ausência de tiamina na dieta, a glicose que chega ao hepatócito se transforma em piruvato, em uma seqüência de reações da via glicolítica. Neste caso, uma grande parte deste piruvato é transformado em lactato, já que a enzima lactato desidrogenase está comprometida pela falta de tiamina, reduzindo assim a produção de AcetilCoA. É gerado um quadro de acidose metabólica, que se caracteriza pela redução de pH, que leva ao aumento da produção das espécies reativas de oxigênio. Como o fígado tem um importante papel no metabolismo do lactato, logo este se transforma em piruvato através do Ciclo de Cori, reduzindo assim o quadro de acidemia e amenizando os danos causados pelos radicais livres. A velocidade do Ciclo de Krebs também está reduzida, pois a enzima α -cetoglutarato desidrogenase está comprometida devido a ausência de tiamina. Com isso, ocorre uma redução da produção de ATP e uma redução na velocidade do fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Devido a isso, uma quantidade maior de elétrons é perdido, e conseqüentemente uma maior produção de radicais livres. Os sistemas antioxidantes são responsáveis por amenizar os efeitos deletérios destas espécies radicalares no fígado, impedindo um quadro de estresse oxidativo causado pela deficiência em tiamina (Figura 39).

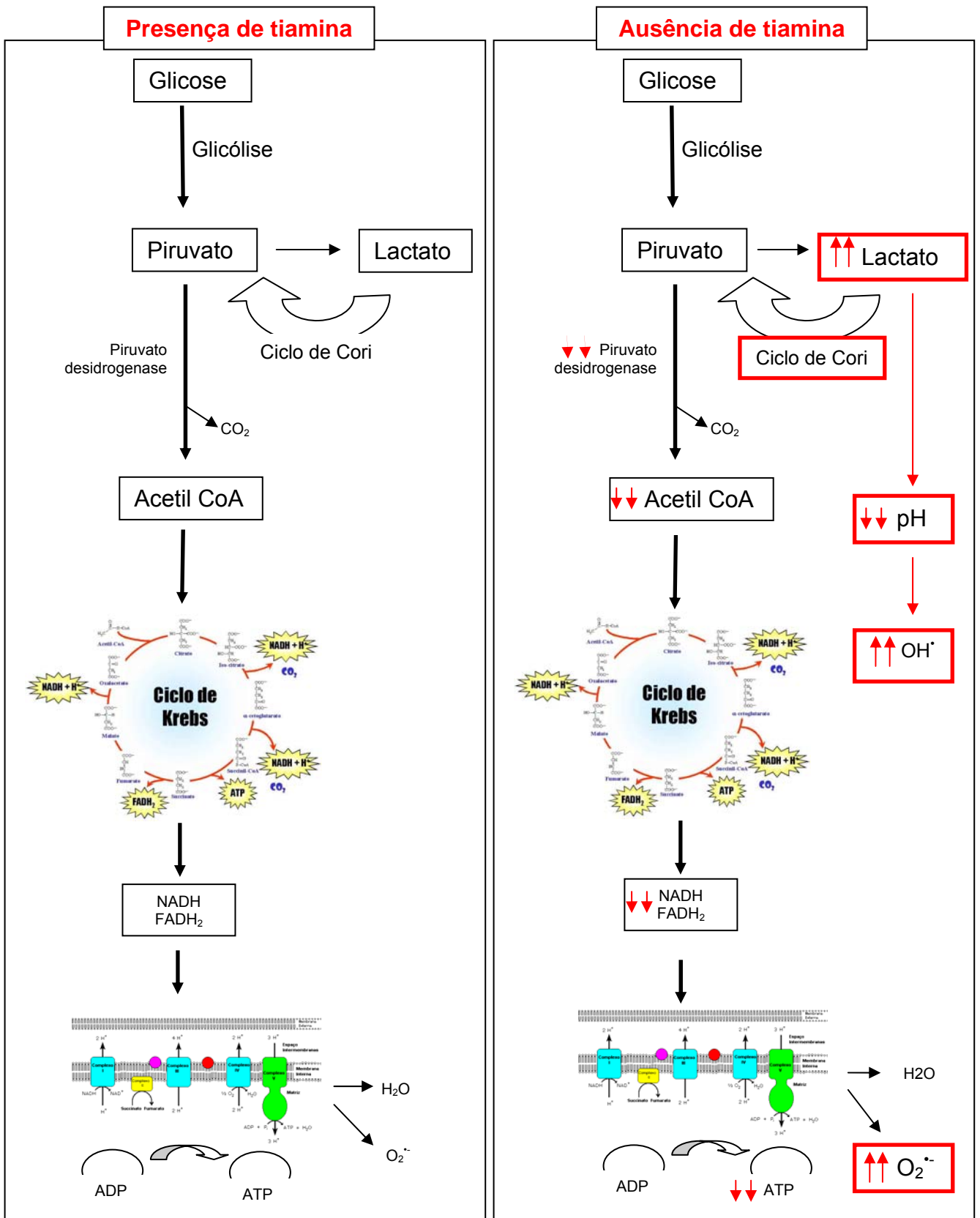


Figura 39 – Desenho esquemático do comportamento do metabolismo energético no fígado na presença e ausência de tiamina.

1.2 Comportamento do metabolismo energético no rim na presença e na ausência de tiamina

O metabolismo do rim na presença de tiamina se assemelha ao do fígado. Na ausência de tiamina na dieta, o que difere é o destino do lactato produzido em excesso. Este lactato é transformado em glicose através da gliconeogênese, reduzindo assim a acidose metabólica no tecido e impedindo um quadro de estresse oxidativo causado pela deficiência em tiamina (Figura 40).

1.3 Comportamento do metabolismo energético no músculo esquelético na presença e na ausência de tiamina

O metabolismo do músculo esquelético na presença de tiamina se assemelha ao do fígado. Na ausência de tiamina na dieta, o que difere também é o destino do lactato produzido em excesso. Este lactato é transportado para o fígado para ser metabolizado no Ciclo de Cori, reduzindo assim a acidose metabólica no tecido e impedindo um quadro de estresse oxidativo causado pela deficiência em tiamina (Figura 41).

1.4 Comportamento do metabolismo energético no coração na presença e na ausência de tiamina

O metabolismo do coração na presença de tiamina se assemelha ao do fígado. Na ausência de tiamina na dieta, o que difere é o destino do lactato produzido em excesso. Este lactato, como no músculo esquelético, é transportado para o fígado para ser metabolizado no Ciclo de Cori, reduzindo assim a acidose metabólica no tecido e impedindo um quadro de estresse oxidativo causado pela deficiência em tiamina. No caso da reposição de tiamina na dieta, o metabolismo dos animais deficientes retorna ao comportamento na presença de tiamina (Figura 41).

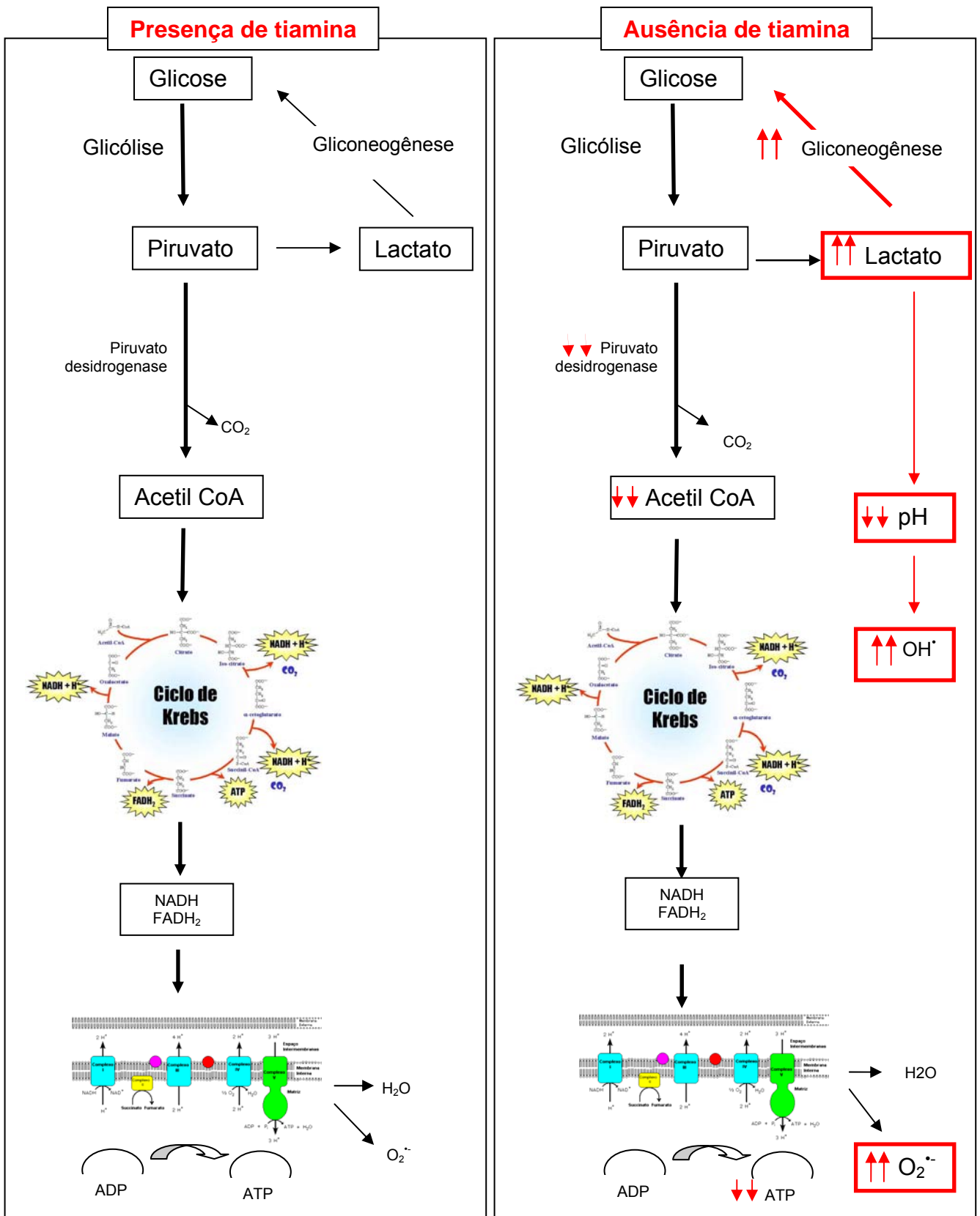


Figura 40 – Desenho esquemático do comportamento do metabolismo energético no rim na presença e ausência de tiamina.

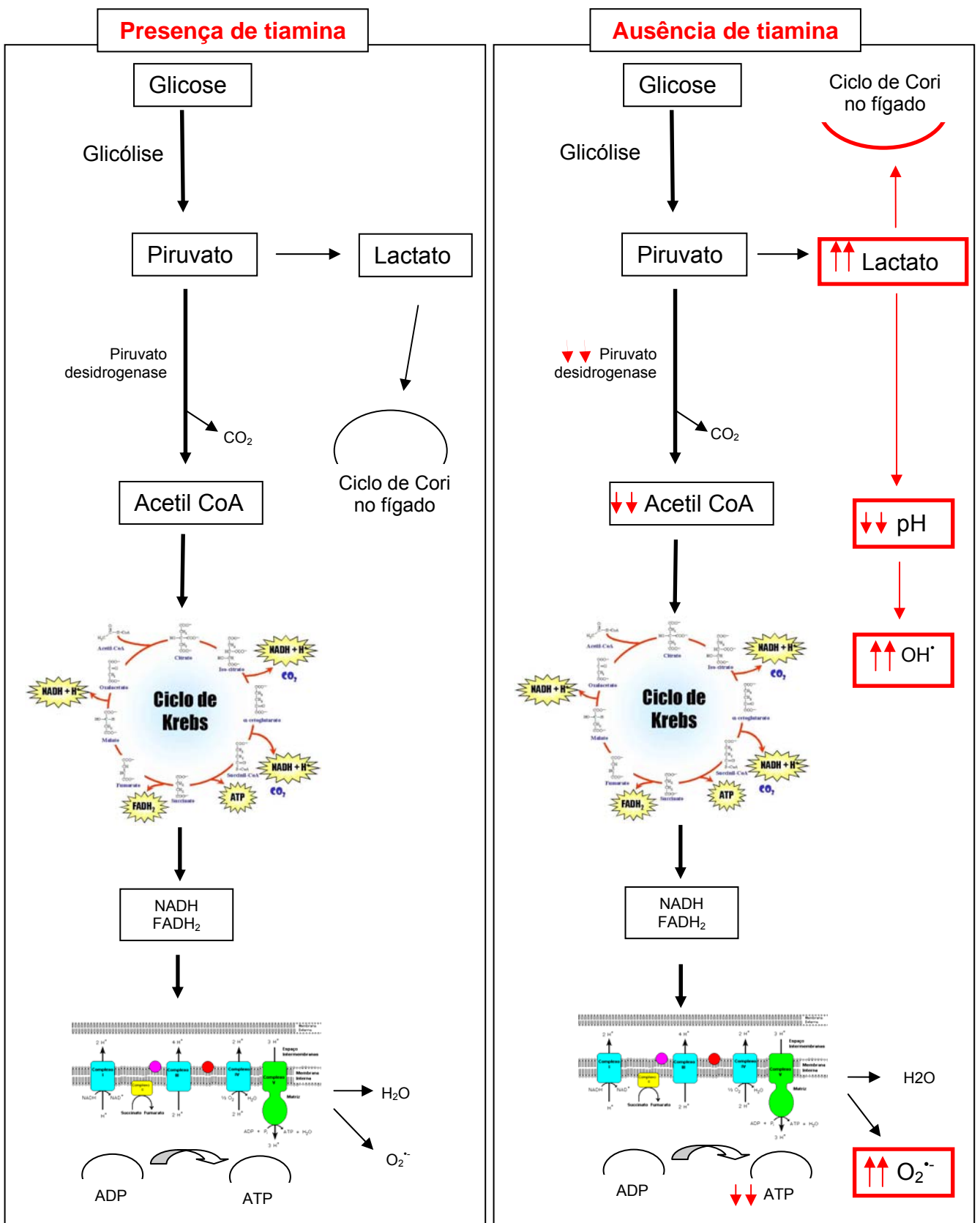


Figura 41 – Desenho esquemático do comportamento do metabolismo energético no músculo cardíaco e esquelético na presença e ausência de tiamina.

2. CONCLUSÃO

Baseando-se nos nossos resultados podemos concluir que:

- ✓ A deficiência em tiamina, causada pela dieta, não afetou os sistemas antioxidantes e os níveis de peroxidação lipídica no fígado de animais deficientes.
- ✓ A atividade da catalase foi diminuída no rim de animais submetidos a uma dieta livre de tiamina, entretanto não houve alteração nos níveis de peroxidação lipídica neste tecido.
- ✓ A atividade da catalase foi aumentada e a expressão protéica da glutathione peroxidase foi diminuída no músculo esquelético de animais submetidos a uma dieta livre de tiamina, entretanto não houve alteração nos níveis de peroxidação lipídica neste tecido.
- ✓ A reposição de tiamina na dieta foi capaz de reverter o quadro de estresse oxidativo e alterações nos sistemas antioxidantes no coração de animais deficientes.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, S. **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology**, New York: Chapman e Hall, 1995.
- Andersen, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature Medicine**, (10): S18-S25, 2004)
- Barc, S., Ingrand, S.S., Fauconneau, B., Page, G., Piriou, A., Barrier, L. Effect of ischemia on TBARs and lactate production in several cerebral regions of anaesthetised and awake rats. **Life Sciences**, 74:3103-3113, 2004.
- Begley, T.P.; Downs, D.M.; Ealick, S.E.; McLafferty, F.W.; Van Loon, A.P.; Taylor, S.; Campobasso, N.; Chiu, H.J.; Kinsland, C.; Reddick, J.J.; Xi, J. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. **Archives of microbiology**, 171: 293-300, 1999.
- Berne, R.M.; Levy, M.N. **Fisiologia**. Editora Guanabara Koogan, 5° edição, 2004.
- Bubber P., Zun-Ji, K., Gibson, G.E. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. **Neurochemistry International**, 45: 1021-1028, 2004.
- Butterworth, R.F. Neurotransmitter function in thiamine-deficiency encephalopathy. **Neurochemistry International**, 4: 449-464, 1982.
- Butterworth, R.F. Thiamin deficiency and brain disorders. **Nutritional Research Review**, 16(2): 277-283, 2003.
- Chandel, N.S.; Budinger, G.R.S. Serial Review: Redox signaling in immune function and cellular responses in lung injury and diseases. The cellular basis for diverse responses to oxygen. **Free Radical Biology & Medicine**, 42:165-174, 2007.
- Cnubben, N.H.P.; Rietjens, I.M.C.M.; Wortelboer, H.; Van Zanden, J.; Van Bladeren, P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 10: 141-152, 2001.
- Cook, G.C. **Manson's Tropical Diseases**, 12 ed. WB Saunders Company Ltd. 1996.
- Cortright, R.N.; Muoio, D.M.; Dohm, G.L. Skeletal muscle lipid metabolism: A frontier for new insights into fuel homeostasis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 8(5): 228-245, 1997.
- Da Cunha, S., Cunha Bastos, J., Salles, J.B., Silva, M.C., Cunha Bastos, V.L., Mandarim-de-Lacerda, C.A. Cardiac alterations in furosemide-treated thiamine-deprived rats. **Journal of Cardiac Failure**, 13(9): 774-784, 2007.
- Day, B.J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochemical Pharmacology**, 77:285-296, 2009.
- Dhar, S.K.; Clair, D.K. Manganese superoxide dismutase regulation and câncer. **Free Radical Biology and Medicine**, 52:2209-2222, 2012.
- Dennerly, P.A. Oxidative stress in development: Nature or nurture? **Free Radical Biology and Medicine**, 49:1147-1151, 2010.
- Dieterich, S.; Bielgk, U.; Beulich, K.; Hasenfuss, G.; Prestle, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, 101: 33-39, 2000.
- Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, 82:47-95, 2002.
- Dror, V.; Eliash, S.; Rehavi, M.; Assaf, Y.; Biton, I.E.; Fattal-Valevski, A. Neurodegeneration in thiamine deficient rats - A longitudinal MRI study. **Brain Research**, 1308:176-84, 2010.

Elliot,K.A.C., Page,I.H., Quastel,J.H. **Neurochemistry – the chemical dynamics of brain and nerve. Bannerstone House**, 1995.

Fang,Y.Z.; Yang,S.; Wu,G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, 18(10):872-878, 2002.

Fearon,I.M.; Faux,S.P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 47:372–381, 2009.

Fellgiebel,A., Scheurich,A., Siessmeier,T., Schmidt,L.G., Bartenstein,P. Persistence of disturbed thalamic glucose metabolism in a case Wernicke-Korsakoff syndrome. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, 124: 105-112, 2003.

Forman,H.J. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, 42:926-932, 2007.

Francini-Pesenti,F.; Brocadello,F.; Manara.R.; Santelli,L.; Laroni,A.; Caregaro,L. Wernicke's syndrome during parenteral feeding: not an unusual complication. **Nutrition**, 25(2):142-6, 2009.

Funk,C. On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. Bio-chemical Department, Lister Institute of Preventive Medicine, 43: 395-400, 1911.

Garibotto,G.; Sofia,A.; Saffioti,S.; Bonanni,A.; Mannucci,I.; Verzola,D. Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease. **Clinical Nutrition**, 29: 424-433, 2010.

Gibson,G.E.; Zhang,H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. **Neurochemistry International**, 40:493-504, 2002.

Gioda,C.R.; Barreto,T.O.; Prímola-Gomes,T.N.; Lima,D.C.; Campos,P.P.; Capettini,L.S.; Lauton-Santos,S.; Vasconcelos AC, Coimbra,C.C.; Lemos,V.S.; Pesquero,J.L.; Cruz,J.S. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. **American Journal Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, 298(6):H2039-45, 2010.

Girard,J.; Lafontan,M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. **Diabetes & Metabolism**, 34:439–445, 2008.

Gonzalez,C.; Sanz-Alfayate,G.; Agapito,M.T.; Gomez-Niño,A.; Rocher.A.; Obeso,A. Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitivity to physiological hypoxia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, 132(1):17-41, 2002.

Hahn,J.S., Berquist,W., Alcorn,D.M., Chamberlain,L., Bass,D. Wernicke encephalopathy and beriberi during total parenteral nutrition attributable to multivitamin infusion shortage. **Pediatrics**, 101(1): 1-4, 1998.

Halliwell,B; Gutterige,J.M.C. **Free radical in biology and medicine**. 3rd ed. New York: Oxford, 1999.

Hazell,A.S. Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy. **Neurochemistry International**, 55(1-3):129-35, 2009.

Homewood,J., Bond,N.W. Thiamin deficiency and Korsakoff's syndrome: Failure to find memory impairments following nonalcoholic Wernicke's encephalopathy. **Alcohol**, 19(1): 75-84, 1999.

Jackson,M.J. Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity. **Free Radical Biology & Medicine**, 47:1267–1275, 2009.

Jhala,S.S.; Hazell,A.S. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. **Neurochemistry International**, 58(3):248-60, 2011.

Ji,L.L. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. **Experimental Gerontology**, 42(7):582-93, 2007.

Ji,L.L.; Gomez-Cabrera,M.C.; Vina,J. Role of nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, 32:930-935, 2007.

Kirkman,H.N.; Gaetani,G.F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochemical Sciences**, 32(1):44-50, 2006.

Klein,M., Weksler,N., Gurman,G.M. Fatal metabolic acidosis caused by thiamine deficiency: Analysis of a case. **Journal of Cardiac Failure**, 12(5): 381-391, 2006.

Kryston,T.B.; Georgiev,A.B.; Pissis,P.; Georgakilas,A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, 711:193–201, 2011.

LandisG.N.; Tower,J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of ageing and development**, 126:365-379, 2005.

Leonarduzzi,G.; Sottero,B.; Poli,G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. **Pharmacology & Therapeutics**, 128(2):336-74, 2010.

Lonsdale,D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 3: 49-59, 2006.

Ma,Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, 125(3): 376–393, 2010.

Martin,P.R.; Singleton,C.K.; Hiller-sturmhofel,S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Research & Health**, 27: 134-142, 2003.

Matés,J.M.; Perez-Gomez,C.; De Castro,I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, 32(8):595-603, 1999.

Matés,J.M.; Sanchez-Jimenez,F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 32:157-170, 2000.

Mayr,J.A.; Freisinger,P.; Schlachter,K.; Rolinski,B.; Zimmermann,F.A.; Scheffner,T.; Haack,T.B.; Koch,J.; Ahting,U.; Prokisch,H.; Sperl,W. Thiamine Pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway. **The American Journal of Human Genetics**, 89: 806-812, 2011.

Molina,H.; Garcia,M. Enzymatic defenses of the heart against lipid peroxidation. **Mechanisms of Ageing and Development**, 97:1-7, 1997.

Mousseau,D.D., Rao,R.F., Butterworth,R.F. Vesicular dysfunction during experimental thiamine deficiency is indicated by alterations in dopamine metabolism. **European Journal of Pharmacology**, 317:263-267, 1996.

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

Munir,A., Hussain,S.A., Sondhi,D., Ameh,J., Rosner,F. Wernicke's encephalopathy in non-alcoholic man: case report and brief. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, 68(3): 216-218, 2001.

Nelson,D.P.; Kiesow,L.A., Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). **Analytical Biochemistry**, 49: 474 - 478, 1972.

Nicholls,P. Classical catalase: Ancient and modern. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 525:95–101, 2012.

Ohkawa,H.; Ohishi,N.; Yagi,K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95: 351- 358, 1979.

Okorie,O.N.; Dellinger,P. Lactate: biomarker and potential therapeutic target. **Critical Care Clinics**, 27(2):299-326, 2011.

Oliveira,F.A., Dalan,D.T., Ribeiro,A.M., Cruz,J.S. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K^+ channels. **Brain Research**, 1134(1): 79-86, 2007a.

Oliveira,F.A.; Guatimosim,S.; Castro,C.H.; Dalan,D.T.; Lauton-Santos,S.; Ribeiro,A.M.; Almeida,A.P.; Cruz,J.S. Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. **American Journal of Physiology: Heart Circulation Physiology**, 293(1): 394-401, 2007b.

Orman,M.A.; Berthiaume,F.; Androulakis,I.P.; Ierapetritou,M.G. Pathway analysis of liver metabolism under stressed condition. **Journal of Theoretical Biology**, 272:131–140, 2011.

Pinheiro,C.H.J.; Silveira,L.R.; Nachbar,R.T.; Vitzel,K.F.; Curi,R. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. **Free Radical Biology & Medicine**, 48:953–960, 2010.

Pires,R.G.W., Pereira,S.R.C., Oliveira-Silva,I.F., Franco,G.C., Ribeiro,A.M. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: A study using a model of Wernick-Korsakoff Syndrome. **Behavioral Brain Research**, 162: 11-21, 2005.

Reid,M.B. Free radicals and muscle fatigue: of ROS, canaries, and the IOC. **Free Radical Biology and Medicine**, 44:169-179, 2008.

Reuter,S.; Gupta,S.C.; Chaturvedi,M.M.; Aggarwal,B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, 49:1603–1616, 2010.

Rigby,S.H. & Schwarz,K.B. **Nutrition and liver disease**, 2001.

Rindi,G. & Laforenza,U. Thiamine intestinal transport and relates issues: recent aspects. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, 224: 246-255, 2000.

Salmon,A.B.; Richardson,A.; Pérez,V.I. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? **Free Radical Biology and Medicine**, 48:642–655, 2010.

Schabelman,E.; Kuo,D. Glucose before thiamine for Wernicke encephalopathy: a literature review. **The Journal of emergency medicine**, 42(4):488-94, 2012.

Singleton,C.K. & Martin,P.R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Current Molecular Medicine**, 1: 197-207, 2001.

Stepuro,I.I. Thiamine and vasculopathies. **Prostaglandins, Leokotrienes and Essential Fatty Acids**, 72(15): 115-127, 2005.

Stryer,L., Tymoczko,J.L., Berg,J.M. **Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan, 6° edição, 2008.

Tahara,E.B.; Navarete,F.D.; Kowaltowski,A.J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, 46: 1283-1297, 2009.

Tessari,P.; Coracina,A.; Cosma,A.; Tiengo,A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, 19:291-302, 2009.

Thomson,A.D.; Guerrine,I.; Marshall,J.E. The evolution and treatment of Korsakoff's syndrome: out of sight, out of mind? **Neuropsychol review**, 22: 81-92, 2012.

Thomson,A.D., Marshall,E.J. The natural history and pathophysiology of wernick's encephalopathy and Korsakoff's psychosis. **Alcohol & Alcoholism**, 41(2): 151-158, 2005.

Urso,M.L.; Clarkson,P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. **Toxicology**, 189:41-54, 2003.

Valko,M.; Rhodes,C.J.; Moncol,J.; Izakovic,M.; Mazur,M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, 160(1):1-40, 2006.

Valko,M.; Leibfritz,D.; Moncol,J.; Cronin,M.T.; Mazur,M.; Telser,J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry& Cell Biology**, 39(1), 44-84, 2007.

Vasconcelos,M.M., Silva,K.P., Vidal,G., Silva,A.F., Domingues,R.C., Berditchevsky,C.R. Early diagnosis of pediatric Wernicke's encephalopathy. **Pediatric Neurology**, 20: 289-294, 1999.

Victor,M.; Adams,R.D.; Collins,G.H. The Wernicke-Korsakoff Syndrome. Philadelphia, PA: F.A.Davis,1971.

Walter,J.B. & Talbolt,I.C. **General Pathology**, 7ed., Churchill Livingstone, 1996.

Westerblad,H.; Bruton,J.D.; Katz,A. Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. **Experimental Cell Research**, 316:3093-3099, 2010.

Zhao,W.; Zhao,D.; Yan,R.; Sun,Y. Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Pathology**, 317(2): 310-321, 2006.