



Implantação de um método para determinação da atividade da transcetolase eritrocitária para avaliação indireta da tiamina

Implementation of a method for determining the erythrocyte transketolase activity for indirect evaluation of thiamin

RIALA6/1688

Marilena OSHIRO*, Karen MIGUITA

*Endereço para correspondência: Núcleo de Hematologia e Bioquímica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. Tel: 11 3068 2873. E-mail: maoshiro@ial.sp.gov.br

Recebido: 13.11.2015 - Aceito para publicação: 14.03.2016

RESUMO

O teste de ativação da transcetolase eritrocitária (TK-E) pelo pirofosfato de tiamina (TPP) exógeno é um método indireto para mensurar a tiamina (vitamina B1). A diminuição da atividade da transcetolase eritrocitária e o aumento da estimulação *in vitro* com o TPP maior do que 17 % indicam deficiência de tiamina. Este é um método plausível, pois são nos eritrócitos que estão concentradas a maior parte desta vitamina. Em virtude de surtos de beribéri que tem ocorrido no Brasil desde 2006, o Instituto Adolfo Lutz (IAL), como Laboratório Central de Saúde Pública, propôs a implantação desse método para auxiliar na investigação de novos surtos ou de casos isolados. Foram avaliados o teste de precisão, a linearidade, a estabilidade do hemolisado e da amostra, e estimados os limites de detecção e de quantificação. A atividade da TK-E sem ativação pelo TPP foi de 0,732 UI/gHb e com ativação foi de 0,827 UI/gHb. Todos os resultados dos parâmetros avaliados neste estudo apresentaram-se dentro dos critérios de aceitabilidade garantindo-se a confiabilidade do método. Fica, assim, disponível mais um ensaio bioquímico para a Rede Pública de Saúde, mas ainda necessário definir os valores de referência para estabelecer os limites clínicos da deficiência de tiamina.

Palavras-chave. transcetolase, tiamina, diagnóstico, beriberi.

ABSTRACT

Erythrocyte transketolase activation test (TK-E) by exogenous thiamine pyrophosphate (TPP) is an indirect method to measure thiamine (vitamin B1). The decrease in the erythrocyte transketolase activity and the increase of *in vitro* stimulation with TPP greater than 17 % indicate thiamine deficiency. It is a reasonable method as the major portion of this vitamin are concentrated in erythrocytes. Due to the beriberi outbreaks that have occurred in Brazil since 2006, the Adolfo Lutz Institute (IAL), as a Central Public Health Laboratory, proposed the implementation of this method to give support to the investigation on the new outbreaks or isolated cases. The evaluated parameters were precision, linearity, hemolysate and sample stability, and the limits of detection and quantification were estimated. The TK-E activity without activation by TPP was 0.732 UI/gHb, and with activation was 0.827 UI/gHb. All of the results obtained from the evaluated parameters showed to be within the eligibility criteria, ensuring the reliability of the proposed methods. Thus, this method showed to be adequate as biochemical assay for the Public Health Network. However, there is a need to define the reference values to establish the clinical limits of thiamine deficiency.

Keywords. transketolase, thiamine, diagnosis, beriberi.

INTRODUÇÃO

Existem enzimas nos glóbulos vermelhos que são dependentes de vitaminas e suas atividades são correlacionadas para avaliar o estado nutricional dessas vitaminas¹, a transcetolase eritrocitária (TK-E) é um exemplo. Utiliza como cofator o pirofosfato de tiamina (TPP), a forma biologicamente ativa da tiamina (vitamina B1)². Esta enzima atua amplamente no ciclo das pentoses contribuindo na formação do NADPH³, coenzima importante no restabelecimento da glutathione na sua forma reduzida² e, também, participa na síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos³. Como o ciclo das pentoses é mais ativo nos glóbulos vermelhos e aproximadamente 80 % da tiamina se encontram neles^{4,5}, é sensato utilizar a atividade da transcetolase nestas células como marcador das alterações metabólicas da tiamina^{6,7}.

O teste de ativação da transcetolase eritrocitária pelo TPP exógeno é um método indireto de mensurar a tiamina⁵. A diminuição da atividade da transcetolase eritrocitária e o aumento da estimulação *in vitro* com o TPP maior que 17 % indicam deficiência de tiamina⁷.

O beribéri é uma doença causada por deficiência de tiamina caracterizada por manifestações neurológicas e cardiovasculares^{8,9}. Casos extremos de deficiência podem afetar o coração, dando origem a uma cardiomiopatia por deficiência nutricional, conhecida como beribéri cardíaca ou afetar o sistema nervoso central, provocando a encefalopatia de Wernicke que se caracteriza por confusão mental, oftalmoplegia e taxia podendo evoluir para o coma e morte^{9,10}. A deficiência também tem sido relatada como causa de hipertensão pulmonar¹¹ e de perda visual devido a neuropatia óptica¹².

A deficiência de tiamina quando não está associada à carência alimentar, pode estar relacionada com o aumento de demandas metabólicas ou situações que interferem na sua biodisponibilidade⁴. É comum encontrar a deficiência em etilista crônico, pacientes com anorexia nervosa¹³, doenças gastrointestinais associadas com diarreia crônica e vômitos frequentes¹⁴, pacientes submetidos à cirurgia

gástrica¹⁵ ou intestinal¹⁴ e nos cardiopatas¹⁶.

Em 2012, o Ministério da Saúde publicou o “Guia de consulta para Vigilância Epidemiológica, Assistência e Atenção Nutricional dos casos de Beribéri”, em vista das notificações de beribéri ocorridas nos estados do Maranhão, Tocantins e Roraima. Até então, não se tinha registro de surto no país há mais de oitenta anos⁴.

A tiamina pode ser avaliada no sangue ou na urina. Porém, estes exames não estão disponíveis no Sistema Único de Saúde⁴, sendo raro encontrar em outros serviços¹³.

Assim, o objetivo deste estudo foi implantar a metodologia que determinasse a atividade enzimática da transcetolase eritrocitária com e sem a estimulação do TPP exógeno, para ser utilizada como indicador do estado nutricional quanto à tiamina, disponibilizando mais um exame específico para a Rede Pública de Saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12/12/2012 do Ministério da Saúde / Conselho Nacional da Saúde, e teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz, Protocolo nº 035/2009 emitida em 24/11/2009.

As amostras de sangue foram obtidas de voluntários, após concordarem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram utilizados para coleta tubos a vácuo contendo anticoagulante K₃EDTA. As amostras foram armazenadas em temperatura entre 4 e 8 °C até o momento da análise.

Preparo do hemolisado

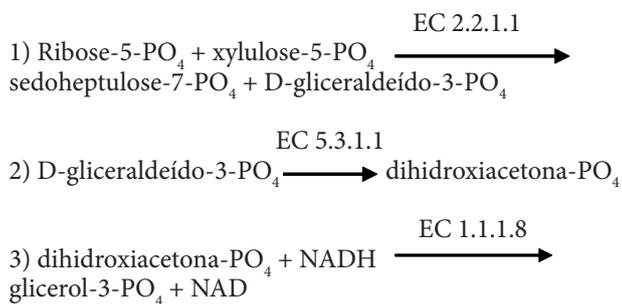
As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2.500 rpm em temperatura de 8 °C, e o plasma e a camada de leucócitos foram descartados. As hemácias foram submetidas a três lavagens sucessivas com solução de NaCl 0,9 % gelada, o sobrenadante e a camada de leucócitos foram descartadas em cada ciclo. Os hemolisados foram preparados adicionando-se água bi-destilada nas hemácias lavadas na proporção de 2:1 (hemácias: água).

Em seguida, foram submetidas ao congelamento e descongelamento por duas vezes para assegurar total hemólise. As concentrações de hemoglobina foram ajustadas para ficarem entre 3,5 a 4 g/dL com solução Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 + Triton X-100 (na proporção 1:100). Foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante separado e mantido entre 4 a 8 °C até o momento da análise. A concentração de hemoglobina foi determinada em contador hematológico automatizado.

Atividade da TK-E com e sem o TPP

O método para a determinação da atividade da TK-E com e sem TPP foi realizada conforme Bayoumi e Rosalki¹ com algumas modificações. O sistema reagente utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), que absorve luz no comprimento de onda de 340nm. A variação de absorbância por minuto obtida pela oxidação da coenzima NADH a NAD, reflete diretamente a atividade da transcetolase.

As sequências das reações estão abaixo descritas:



EC 2.2.1.1 = Transcetolase
 EC 5.3.1.1 = Triosefosfato isomerase
 EC 1.1.1.8 = Glicerol-3-fosfato desidrogenase

Soluções	Sem TPP	Com TPP
	µl	µl
Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6	50	0
Ribose-5-fosfato 15mM	915	915
Hemolisado	20	20
GDH/TPI (7kU/L - 1800kU/L)	5	5
TPP 10mM	0	50
Incubar 15 minutos a 37 °C		
NADH 10 mM	10	10
Leitura 10 minutos a 37 °C		

$$\text{Cálculo: } \frac{\Delta\text{DO} \times 10^5}{E \times \text{Hb} \times 20} = \text{UI/gHb. min. a } 37^\circ\text{C}$$

ΔDO = Variação da densidade ótica por minuto
 10⁵= Correção da unidade da hemoglobina
 E = Coeficiente de extinção molar da coenzima NAD (6,22)
 Hb = Concentração da hemoglobina no hemolisado
 20= volume da amostra

As soluções de Ribose-5-fosfato (Sigma) 15mM, o TPP (Sigma) 10mM e NADH (Sigma) 10mM foram preparados com Tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6. Todos foram preparados no dia do uso e mantidos na temperatura entre 4 e 8 °C. A enzima GDH/TPI (Sigma) estava pronta para o uso, sem necessidade prévia de diluição, porém foi mantida na temperatura constante entre 4 e 8 °C.

A porcentagem de Ativação foi obtida através da seguinte equação:

$$\% \text{ ativação} = \frac{\text{TK-E c/ TPP} - \text{TK-E s/ TPP}}{\text{TK-E s/ TPP}} \times 100$$

Métodos estatísticos

Além da análise descritiva como média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos e máximos e limite de repetibilidade (Lrepê), foram utilizados outros métodos conforme o propósito de cada estudo: teste de normalidade (Anderson Darling); avaliação das variâncias (Cochran, Levene ou Bartlett); análise de comparabilidade (ANOVA), Teste F e t de Student; avaliação de linearidade (Regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, polinômio linear e quadrática).

Foi utilizado nível de confiança de 95 %.

RESULTADOS

Para confirmar que este método implantado atende aos propósitos, foram realizados alguns experimentos de validação, conforme orientações DOQ-CGCRE-008/2011¹⁷, RDC n°27/2012-ANVISA/MS¹⁸ e Oliveira e Mendes¹⁹, quando aplicáveis.

Avaliação da precisão

Primeiramente, foi realizado um estudo preliminar de precisão para identificar discrepâncias frente o esperado e, se fosse necessário, fazer ajustes no sistema antes de prosseguir com estudos mais completos. Desta forma, foram avaliadas três amostras com atividades enzimáticas diferentes da TK-E, analisadas por sistema de repetitividade, ou seja, as oito medições de cada amostra foram realizadas no mesmo dia e sem alterações de local, equipamento, reagentes e do técnico. Os resultados estão consignados na **Tabela 1**.

Neste estudo preliminar foi possível verificar que o método apresentou um CV médio de 6,67 %. E, pela semelhança dos CVs apresentados nas três amostras, podemos

concluir que a imprecisão é constante não variando em diferentes níveis de atividade enzimática.

O limite de repetitividade (Lrepê) obtido neste estudo foi utilizado para identificar valores discrepantes ou *outliers* nos demais experimentos. É a diferença máxima permitida entre um par de replicatas de cada corrida, tendo o cuidado de não rejeitar mais de 5 % das análises¹⁹.

A precisão intermediária ou interensaio foi realizada em duas amostras com níveis de atividade enzimática diferentes, porém previamente conhecido. Cada amostra foi dividida em quatro partes e analisada diariamente em duplicata por cinco dias. Os resultados estão consignados na **Tabela 2**.

Tabela 1. Estudo preliminar intraensaio

Replicatas	TK-E sem TPP em UI/gHb			TK-E com TPP em UI/gHb		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
1	0,59	0,94	1,19	0,68	1,16	1,3
2	0,63	0,81	1,06	0,7	1,02	1,12
3	0,52	0,9	1,18	0,74	0,98	1,29
4	0,62	0,85	1,02	0,6	1,09	1,24
5	0,57	0,93	1,22	0,66	1,06	1,28
6	0,58	0,94	1,16	0,72	1,15	1,29
7	0,52	0,83	1,18	0,7	1,02	1,14
8	0,61	0,96	1,04	0,64	0,98	1,16
Média	0,58	0,895	1,131	0,68	1,058	1,228
DP	0,042	0,057	0,078	0,045	0,071	0,075
CV %	7,257	6,405	6,903	6,67	6,682	6,139
Lrepê*	0,118	0,16	0,219	0,127	0,198	0,211

Lrepê*: desvio padrão x 2,8 (para duplicata e nível de confiança de 95 %)

Tabela 2. Resumo estatístico do estudo de precisão completa

Parâmetros analisados	TK-E sem TPP		TK-E com TPP	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Média	0,58	0,85	0,67	1,11
DP intraensaio	0,04	0,06	0,05	0,06
CV % intraensaio	6,74	6,95	6,8	5,13
DP interensaio	0,02	0,03	0,02	0,04
CV % interensaio	3,79	4,06	2,72	3,22
DP total	0,04	0,06	0,04	0,06
CV % total	6,96	7,26	6,48	5,49
Erro aleatório total	11,0 %	12,0 %	11,0 %	9,0 %
Critério de aceitabilidade entre replicatas	0,12	0,16	0,13	0,2

Linearidade

O estudo da linearidade teve como objetivo verificar se o método tem a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração, dentro de um intervalo específico (Figura 1). Foram realizadas diluições seriadas de uma amostra com atividade alta (obtida com acréscimo de TK) e uma amostra com atividade baixa, resultando em 7 amostras. Cada amostra foi analisada três vezes. Aos resultados obtidos foram aplicados testes estatísticos. A homocedasticidade das variâncias foi comprovada através do teste de Cochran, o C calculado de 0,287 foi menor do que o C tabelado 0,561 (triplicata em sete níveis de concentração, em nível de confiança de 95 %). Através da análise de regressão linear e ANOVA foi possível observar que a regressão foi significativa ($p < 0,05$), porém os desvios de

linearidade de todas as concentrações foram menores que 5 % quando comparado com a regressão polinomial de 2º grau (regressão quadrática), desconsiderando a relevância da não linearidade detectada. O coeficiente de correlação de Pearson(r) foi de 0,9923.

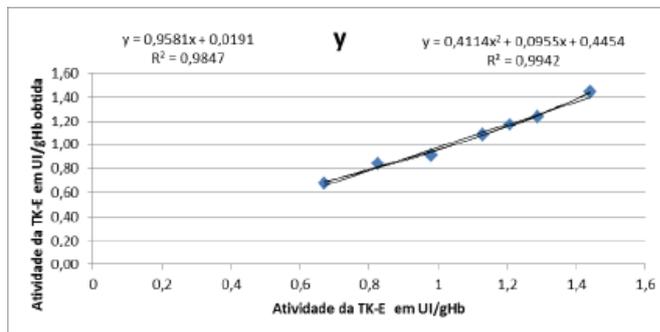


Figura 1. Gráfico da linearidade com as equações polinomiais de 1º e 2º graus

Limite de detecção e de quantificação

A determinação do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foi estimada através das equações: $LD = \text{média} + tDP$ e $LQ = \text{média} + 10DP$, onde t (Student) com nível de confiança de 95 % e DP é o desvio padrão. Os resultados estão representados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

	LD	LQ
TK-E s/TPP	0,091	0,296
TK-E c/TPP	0,121	0,398

Estabilidade

A estabilidade do hemolisado foi conferida através da avaliação de sete amostras distintas com quatro replicações em cada amostra. Os hemolisados foram analisados no dia do preparo e no dia seguinte. Foram mantidas por 24 horas em temperatura entre 4 a 8 °C (geladeira) e entre -16 e -20 °C (freezer). A comparação entre os valores do dia e do posterior, nas sete amostras, revelou que a TK-E é estável nos hemolisados, sejam armazenados em geladeira ou no freezer. O resultado estatístico demonstrou não haver diferenças significativas ao nível de confiança de 95 % ($p > 0,05$).

Temporalidade

A temporalidade das amostras foi definida juntamente com a precisão intermediária quando as amostras foram analisadas por cinco dias consecutivos, armazenadas em temperatura entre 4 e 8 °C. A diferença percentual da perda de atividade enzimática entre os valores obtidos no primeiro dia e no quinto dia foi em torno de 7,9 % para a TK-E sem TPP e de 6,2 % para a TK-E com TPP. O método foi testado em 21 amostras obtidas de voluntários saudáveis, sem uso de complementos vitamínicos. Os dados obtidos apresentaram distribuição gaussiana pelo teste de Anderson Darling ($p > 0,05$). A **Tabela 4** consigna os dados estatísticos desses voluntários.

Tabela 4. Resumo estatístico dos valores obtidos das amostras de 21 indivíduos normais

Parâmetro	TK sem TPP UI/gHb	TK com TPP UI/gHb	% estimulação
Média	0,732	0,827	12,98
Desvio Padrão	0,113	0,136	3,48
Valor mínimo	0,57	0,63	5,97
Valor máximo	0,973	1,16	21,84

DISCUSSÃO

Quando surgiram os primeiros surtos de beribéri em 2006, no estado do Maranhão, não havia nenhum laboratório público que pudesse avaliar a tiamina daquela comunidade, incluindo o IAL. Foi assim que surgiu este estudo para implantação do método da análise da atividade da transcetolase eritrocitária com e sem estímulo pelo TPP. Um método indireto, porém adequado para o propósito, uma vez que as hemácias são as primeiras células a serem afetadas pela depleção vitamínica²⁰.

O método escolhido foi o proposto por Bayomi e Rosalki em 1976¹. Para avaliá-lo foi necessário realizar estudo de validação. Ele comprova através de evidências objetivas alguns requisitos básicos que garantem a confiabilidade dos resultados.

O primeiro passo foi verificar a precisão do método. É importante salientar que toda medição analítica agrega um percentual de variação, o qual é conhecido como “erro”. Este “erro” pode ser de ocorrência casual ou acidental, chamado de erro aleatório. Neste estudo, o erro aleatório total ficou em torno de 11,5 % para a TK-E sem adição de TPP e de 10 % para a TK-E com adição de TPP, dentro do recomendado pela ANVISA¹⁸ o qual se permite até 15 % para as imprecisões.

A imprecisão intraensaio encontrada ficou entre 6 e 7 %, uma estimativa bastante razoável em se tratando de enzimas. Este achado está em consonância com dados do laboratório de Cambridge onde o CV deles fica entre 5,1 a 7,7 %²¹, utilizando metodologia semelhante.

A exatidão não pôde ser avaliada conforme exigido pelas normas da qualidade por não haver amostras de referência e nem ter como comparar com outro método. Porém, a média da atividade da TK-E do grupo de voluntários saudáveis foi de 0,732 UI/gHb, com desvio padrão de 0,113 UI/gHb, próximos ao valor médio de 0,77 UI/gHb encontrados por Smeets et al²² em doadores de sangue e, dentro do intervalo de 0,514 a 0,739 UI/gHb, encontrado por Waring et al²³ obtidos, também, em doadores de sangue de ambos os sexos. Ambos utilizaram metodologia similar ao deste trabalho. Valores mais baixos foram encontrados em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com neuropatia⁶.

Valor de referência para indivíduos normais podem diferir de um laboratório para outro, mesmo que ambos utilizem o mesmo método. As variações pré-analíticas, variações analíticas e as variações biológicas inter-indivíduos são os fatores que podem influenciar nessas diferenças. Por isso, é recomendado que cada laboratório determine o seu próprio valor de referência com as incertezas associadas. No presente estudo, a média obtida no grupo de voluntários não pode ser utilizada para esta finalidade devido ao número pequeno de voluntários.

A estabilidade da atividade da TK-E no hemolisado foi verificada. Observou-se que se manteve estável por até 24 horas, quando conservado em temperatura de geladeira ou congelado. Smeets et al²² descreve que não há perda de atividade da TK-E por quatro semanas nos hemolisados armazenados a -20 °C. Porém, se forem congelados e descongelados por duas vezes poderá haver perda significativa da atividade enzimática.

A maioria das enzimas presentes no glóbulo vermelho é mais estável quando estão no sangue total do que quando as células são lavadas ou congeladas²⁴. Esta estabilidade foi conferida por até cinco dias no sangue total, conteúdo anticoagulante EDTA e armazenada em temperatura entre 4 e 8 °C. Ao final de cinco dias, verificou-se uma diminuição da atividade enzimática próxima de 8 %. Beutler²⁴ define para várias enzimas eritrocitárias uma estabilidade

de 20 dias com perda de atividade <10 %, nas mesmas condições. Soukalon et al²¹ mantiveram os glóbulos vermelhos lavados e congelados a -30 °C por até 3 meses para avaliar a TK-E.

A avaliação da transcetolase eritrocitária não é comum na prática clínica e, portanto não há muitas informações sobre o desempenho do método analítico na literatura para comparação. Desta forma, todos os dados obtidos neste estudo poderão ser utilizados como indicadores nas especificações da qualidade, visto que eles ficaram dentro dos limites aceitáveis determinadas pelas normas regulamentadoras como a RDC nº 27/2012 da ANVISA¹⁸.

O beribéri tem sido um importante problema de saúde pública⁴. E, o agente causador nem sempre é a carência alimentar da tiamina. Existem outros mecanismos que podem levar à deficiência. Por exemplo, a suspeita da causa do surto ocorrido no estado do Maranhão foi a contaminação do arroz pelo fungo *Penicillium citreonigrum*²⁵, que produz a micotoxina citreoviridina, a qual degrada a tiamina. Existem, também, as tiaminases presentes em alguns alimentos como peixe, crustáceos e chá, ou produzidas por algumas bactérias como *Clostridium botulium*²⁶, que age da mesma forma sob a tiamina.

Publicações recentes têm relatado casos de beribéri em pacientes com uso prolongado de diuréticos²⁷ e muitos casos graves após cirurgia bariátrica^{3,10,15}.

A deficiência de tiamina não é uma condição rara¹³. Ela pode estar presente em 40 % dos casos de neuropatia após a cirurgia bariátrica⁹; nos pacientes cardíacos, Cunha et al¹⁶ encontraram deficiência em 33 %; nos pacientes com anorexia nervosa 38 %²⁸, nos hospitalizados ficam entre 10 a 20 %¹³.

Apesar do diagnóstico de beribéri ser basicamente clínico¹³ e o tratamento ser feito com reposição de tiamina⁴, a avaliação do estado nutricional através da atividade da TK-E poderá não só contribuir na etiologia da doença, como também evidenciar o nível da vitamina em várias situações clínicas suspeitas, bem como na realização de estudos epidemiológicos.

CONCLUSÃO

Fica disponibilizado mais um método para a Rede Pública de Saúde, que se mostrou analiticamente satisfatório. Entretanto, é necessário definir valores de referências para estabelecer os limites clínicos de deficiência.

REFERÊNCIAS

1. Bayoumi RA, Rosalki SB. Evaluation of methods of coenzyme activation of erythrocyte enzymes for detection of deficiency of vitamins B1, B2 and B6. *Clin Chem*. 1976; 22(3): 327-35.
2. Andrade JA, Gayer CR, Nogueira NP, Paes MC, Bastos VL, Neto Jda C, et al. The effect of thiamine deficiency on inflammation, oxidative stress and cellular migration in an experimental model of sepsis. *J Inflamm (Lond)*. 2014;11:11. [DOI: 10.1186/1476-9255-11-11].
3. Stroh C, Meyer F, Manger T. Beriberi, a severe complication after metabolic surgery - review of the literature. *Obes Facts*. 2014;7(4):246-52. [DOI: 10.1159/000366012].
4. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria Especial de Saúde Indígena. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Consulta para Vigilância Epidemiológica, Assistência e Atenção Nutricional dos casos de Beriberi. 1ª Edição. 2012. Brasília. 66p.
5. Talwar D, Davidson H, Cooney J, O'Reilly D. Vitamin B1 status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: comparison with erythrocyte transketolase activation assay. *Clin Chem*. 2000; 46:704-10.
6. Michalak S, Michatowska-Wender G, Adamcewicz G, Wender MB. Erythrocyte transketolase activity in patients with diabetic and alcoholic neuropathies. *Folia Neuropathol*. 2013; 51(3):222-6. [DOI: <https://doi.org/10.5114/fn.2013.37706>].
7. Lonsdale D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamine and its derivatives. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006;3(1):49-59. [DOI: 10.1093/ecam/nek009].
8. Cerroni MP, Barrado JC, Nobrega AA, Lins AB, Silva IP, Mangueira RR, et al. Outbreak of Beriberi in an indian population of the upper Amazon region, Roraima state, Brazil, 2008. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(5):1093-7. [DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10-0345].
9. Alves LF, Gonçalves RM, Cordeiro GV, Lauria MW, Ramos AV. Beriberi pós bypass gástrico: uma complicação não tão rara. Relato de dois casos. Revisão da literatura. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(3):564-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302006000300021>].
10. Manatakis DK, Georgopoulos N. A fatal case of Wernicke's Encephalopathy after sleeve gastrectomy for morbid obesity. *Case Rep Surg*. 2014;2014:281210. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/281210>].
11. Coelho LS, Hueb JC, Minicucci MF, Azevedo PS, Paiva SA, Zornoff LA. Thiamin deficiency as a cause of reversible cor pulmonale. *Arq Bras Cardiol*. 2007;91(1):e7-9. [DOI: 10.1590/S0066-782X2008001300013].
12. Gratton SM, Lam BL. Visual loss and optic nerve head swelling in thiamine deficiency without prolonged dietary deficiency. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:1021-4. [DOI: 10.2147/OPHT.S64228].
13. Crook MA, Sriram K. Thiamine deficiency: the importance of recognition and prompt management. *Nutrition*. 2014;30(7-8):953-4. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2014.03.003>].
14. Sechi G, Serra A. Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. *Lancet Neurol*. 2007;6(5):442-55. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70104-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70104-7)].
15. Raziel AR. Thiamine deficiency after bariatric surgery may lead to Wernicke encephalopathy. *Isr Med Assoc J*. 2012;14(11):692-4.
16. Da Cunha S, Albanesi Filho FM, da Cunha Bastos VL, Antelo DS, Souza MM. Thiamin, selenium, and copper levels in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy taking diuretics. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(5):454-65. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2002001400003>].

17. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. DOQ-CGCRE-008-Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev 04. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2011.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 22 maio 2012.
19. Oliveira CA, Mendes ME. Gestão de Fase Analítica do Laboratório- como assegurar a qualidade na prática. 1ª ed. Rio de Janeiro (RJ); 2010.
20. Bailey AL, Finglas PM, Wright AJ, Southon S. Thiamin intake, erythrocyte transketolase (EC 2.2.1.1) activity and total erythrocyte thiamin in adolescents. *Br J Nutr*. 1994; 72(1):111-25. [DOI: <https://doi.org/10.1079/BJN19940014>].
21. Soukaloun D, Lee SJ, Chamberlain K, Taylor AM, Mayxay M, Sisouk K et al. Erythrocyte transketolase activity, markers cardiac dysfunction and the diagnosis of infantile beriberi. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(2):e971. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000971>].
22. SmeetsEHJ, MullerH, deWaelJ. ANADH-dependent transketolase assay in erythrocyte hemolysates. *Clin Chim Acta*. 1971;33:379-86. [DOI:10.1016/0009-8981(71)90496-7].
23. Waring PP, Fisher D, McDonnell J, McGown EL, Sauberlich H. A continuous-flow (AutoAnalyzer II) procedure for measuring erythrocyte transketolase activity. *Clin Chem*. 1982; 28(11):2206-13.
24. Beutler E. Red cell metabolism- A manual of biochemical methods. 3ª ed. Orlando (FL): Grune & Stratton; 1984.
25. Rosa CA, Keller KM, Oliveira AA, Almeida TX, Keller LA, Marassi AC, et al. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhão State, Brazil. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010;27(2):241-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440040903289712>].
26. Ringe H, Schuelke M, Weber S, Dorner BG, Kirchner S, Dorner MB. Infant Botulism: is there an association with thiamine deficiency? *Pediatrics*. 2014;134(5):e1436-40. [DOI: 10.1542/peds.2013-3378].
27. Mitsumida N, Umeda H, Iwase M. Shoshi Beriberi induced by long-term administration of diuretics: a case report. *Case Rep Cardiol*. 2014; 2014:878915. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/878915>].
28. Winston AP, Jamieson CP, Madira W, Gatward NM, Palmer RL. Prevalence of thiamin deficiency in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord*. 2000;28:451-4. [DOI: 10.1002/1098-108X(200012)28:4<451::AID-EAT14>3.0.CO;2-I].