

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA TIANEPTINA E SEU
DERIVADO NANT 03 EM UMA LINHAGEM DE CÉLULAS SH-SY5Y
DIFERENCIADAS

GABRIELA DELEVATI COLPO

Porto Alegre
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA TIANEPTINA E SEU
DERIVADO NANT 03 EM UMA LINHAGEM DE CÉLULAS SH-SY5Y
DIFERENCIADAS

GABRIELA DELEVATI COLPO

Orientador: Prof. Dr. Flávio Kapczinski

Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Doutor

Porto Alegre
2012

CIP - Catalogação na Publicação

Colpo, Gabriela
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA
TIANEPTINA E SEU DERIVADO NANT 03 EM UMA LINHAGEM
DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS / Gabriela Colpo. --
2012.
98 f.

Orientador: Flávio Kapczinski.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Transtorno Bipolar. 2. BDNF. 3. Tianeptina. 4.
SH-SY5Y. I. Kapczinski, Flávio , orient. II. Título.

...Aos meu pais, Leda e Edison pelo amor incondicional e constante incentivo e as minhas irmãs Karine e Caroline pelo exemplo e companheirismo...

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos quatro anos de doutorado convivi com um grande número de pessoas, e algumas destas se tornaram muito especiais, tanto para o desenvolvimento desse trabalho, quanto por deixarem meus dias melhores. Entre elas, agradeço...

Ao meu orientador Prof. Flávio Kapczinski, pela oportunidade de crescimento, aprendizagem e exemplo de amor pela pesquisa.

Ao Prof. Fábio Klamt, pela dedicação, ensinamentos e pela constante disposição em ajudar, sempre enxergando o lado bom das coisas.

À Keila, com sua grande generosidade, sempre pronta a ajudar.

Aos colegas e acima de tudo amigos da bancada do Laboratório de Psiquiatria Molecular. À Laura e ao Gabriel, com suas cucas maravilhosas, me ensinaram e ainda me ensinam muito. À Bi Aguiar e à Bi Pfaffenseller, companheiras para tudo, sempre presentes e dispostas a auxiliar, trocando ideias e discutindo experimentos. À Carol e à Bruna pelas ajudas e momentos divertidos no laboratório. Aos nossos bolsistas maravilhosos Pâmela, Giovana, André e Emily que tornam nosso trabalho mais fácil. À todos vocês muito obrigada pelas ajudas e por tornarem meus dias melhores.

À Thaís, pela amizade, os quebra-galhos, as novidades tecnológicas, e pela parceria não só no trabalho.

À Fer Lopes, que com todo pique as 7h30min da manhã, me passou todas as “manhas” da cultura de células.

À Camila, o Rafa e a Kath, que passaram pelo Laboratório durante esses 4 anos, e fizeram muita diferença.

Às minhas irmãs, Karine, pelo amor e exemplo, abrindo as portas da vida acadêmica e a Carol, por todos os cuidados e dedicação, companheira de todas as horas, inclusive de tese.

À minha mãe Leda, que além de todo amor, me deu todo suporte e incentivo necessário, mesmo muitas vezes sem saber direito o que eu tinha que fazer com as “minhas células”.

Ao meu pai Edison, pelo apoio e incentivo, com sua frase “Eu só me arrependo de uma coisa na minha vida, de não ter estudado”.

Às instituições que me possibilitaram desenvolver esse trabalho, a UFRGS, o HCPA e o CNPq.

É melhor ser alegre que ser triste

Alegria é a melhor coisa que existe...

(Vinicius de Moraes)

RESUMO

Introdução: O Transtorno Bipolar (TB) é uma doença crônica e recorrente, e sua fisiopatologia ainda não está completamente elucidada. Recentes estudos têm encontrado significativas alterações em vias neurotróficas em pacientes com TB, principalmente na neurotrofina BDNF. O BDNF está envolvido em muitas funções cerebrais, como sobrevivência, diferenciação neuronal e plasticidade sináptica. Fármacos que atuem aumentando os níveis de BDNF podem se tornar promissores tratamentos para o TB. **Objetivos:** O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos neuroprotetores da tianeptina, um antidepressivo atípico, e de uma nova molécula sintetizada a partir da tianeptina em um modelo *in vitro*. **Métodos:** Para o estudo, foi utilizada uma linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, diferenciada em neurônios dopaminérgicos tratadas com tianeptina e NANT 03 nas concentrações de 30, 50 e 100µM por 48 horas. Após, foi quantificado os níveis de mRNA do BDNF, BDNF intracelular e secretado e níveis intracelulares de Bcl-2. **Resultado:** NANT 03 aumentou os níveis de mRNA do BDNF no tratamento com 50 e 100µM, aumentou BDNF intracelular e secretado e Bcl-2 na dose de 100µM. A tianeptina na dose de 100µM aumentou os níveis de BDNF intracelular e secretado. **Conclusão:** O novo composto apresentou um caráter neuroprotetor maior que a tianeptina o que demonstra que essa nova molécula pode contribuir para melhorar a plasticidade sináptica e cognição dos pacientes com TB.

PALAVRAS-CHAVE: Transtorno Bipolar, BDNF, Tianeptina, NANT 03.

ABSTRACT

Background: Bipolar disorder (BD) is a chronic and recurrent illness and its pathophysiology is not yet completely understood. Recent studies have found significant changes in neurotrophic pathways in patients with BD, especially in the neurotrophin BDNF. BDNF is involved in several brain functions, such as neuronal survival and differentiation and synaptic plasticity. Drugs that act by increasing levels of BDNF may become promising treatments for BD. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the neuroprotective effects of tianeptine, an atypical antidepressant, and of new molecule synthesized from tianeptine in an *in vitro* model. **Methods:** For study, a cell line of human neuroblastoma SH-SY5Y differentiated into dopaminergic neurons was treated with concentrations of 30, 50 and 100 μ M of tianeptine and NANT 03 for 48 hours. Afterwards, it was measured the levels of BDNF mRNA, intracellular and secreted BDNF and intracellular levels of Bcl-2. **Results:** NANT 03 increased BDNF mRNA levels in treatment with 50 and 100 μ M, and increased intracellular and secreted BDNF and Bcl-2 levels in a dose of 100 μ M. The tianeptine in the dose of 100 μ M increased levels of intracellular and secreted BDNF. **Conclusion:** The new compound showed a neuroprotective character greater than tianeptine. This suggests this new molecule can improve cognition and neuronal plasticity of bipolar patients.

KEYWORDS: Bipolar Disorder, BDNF, Tianeptine, NANT 03.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema mostrando os tipos de receptor tirosina quinase (Trk) e suas diferentes afinidades para as neurotrofinas.....23
- Figura 2:** Ativação das vias do BDNF ao se ligar no seu receptor TrkB.....24
- Figura 3:** Remodelamento cerebral após vários episódios de humor e estresse recorrente.....29

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH= Hormônio adrenocorticotrófico

Bcl-2= Linfoma de células B2 (do inglês B-cell lymphoma 2)

BDNF= Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)

CAT = Catalase

CID 10= Classificação Internacional das Doenças

CREB= Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc

CRH = Hormônio liberador de corticotrofina

DSM IV= Manual Diagnósticos e Estatístico de Transtornos Mentais IV

ERO= Espécies reativas de oxigênio

GDNF= Fator neurotrófico derivado da glia

GLT-1= Transportador de glutamato da glia

GPx = Glutaciona peroxidase

GST= Glutaciona- S-transferase

HPA= Eixo-hipotálamo-pituitária-adrenal

IGF= Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1= Interleucina-1

IL-10= Interleucina-10

IL-4= Interleucina-4

IL-6 = Interleucina-6

MAPK = Proteína quinase ativada por mitógeno

NeuN= Proteína nuclear específica de neurônio

NGF= Fator de crescimento do nervo

NMDA= N-metil D- aspartado

NSE= Enolase neurônio específica

NT3= Neurotrofina 3

NT4/5= Neurotrofina 4/5

p⁷⁵= Receptor pan-neurotrofina

pCREB= Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc fosforilado

PI3K= Fosfatidil inositol 3-quinase

PLCγ= Fosfolipase Cγ

SNC= Sistema Nervoso Central

SOD =Superóxido dismutase

TB= Transtorno Bipolar

TH= Tiroxina Hidroxilase

TNF-α= Fator de necrose tumoral

TrkA= Receptor tirosina quinase A

TrkB= Receptor tirosina quinase B

TrkC= Receptor tirosina quinase C

5-HT= Serotonina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Transtorno Bipolar.....	15
2.2 Fisiopatologia do Transtorno Bipolar.....	17
2.3 Neurotrofinas e BDNF	20
2.4 BDNF e Transtorno Bipolar	25
2.5 Bcl-2 e Transtorno Bipolar	26
2.6 Alostase, toxicidade sistêmica e neuroprogressão no Transtorno Bipolar ..	27
2.7 Tratamento do Transtorno Bipolar	30
2.8 Tianeptina	31
2.9 Síntese de uma nova molécula (NANT 03).....	33
3. MARCO TEÓRICO.....	35
4. JUSTIFICATIVA	37
5. OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo primário.....	38
5.2 Objetivos secundários.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
7. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS.....	60
7.1 Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies.....	60
7.2 Tianeptine and its derivative NANT 03 have neuroprotective effects in a differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cell line.....	96
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	121

1. INTRODUÇÃO

Transtorno bipolar (TB) é uma doença crônica e recorrente, com uma prevalência em torno de 2,4% da população mundial (1) e está associada com um alto índice de suicídio e desemprego (2-4). Muitos pacientes com TB apresentam diversas comorbidades clínicas, e um acentuado prejuízo cognitivo, acarretando muitas vezes uma perda de funcionalidade e autonomia (5, 6).

O TB, ainda é uma condição psiquiátrica de difícil tratamento e a depressão bipolar é, particularmente, um quadro de manejo complicado pelo fato que antidepressivos podem aumentar o risco do paciente entrar em um episódio de mania (7) e ainda hoje existe uma grande necessidade de novas opções terapêuticas que melhorem o prognóstico dessa condição.

Dessa forma, o estabelecimento dos mecanismos de ação das drogas antidepressivas, bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, torna-se muito importante no cenário atual, visto que o TB já é uma das maiores causas de incapacitação mundial e responsável por um grande gasto gerado ao sistema único de saúde (8), e um tratamento adequado pode evitar a progressão desta doença e com isso amenizar os danos causados aos pacientes.

Diversos estudos apontam o BDNF como um dos principais responsáveis pelas alterações na neuroplasticidade e memória apresentada pelos pacientes com TB (9) já que esta neurotrofina encontra-se diminuída nos episódios de mania e depressão (10-12). Adicionalmente, um número crescente de evidências clínicas e pré-clínicas tem demonstrado que drogas antidepressivas, aumentam

os níveis de BDNF (13-15), dando suporte a ideia de que deficiências nos níveis de BDNF, bem como alterações nas suas vias de sinalização, poderiam estar envolvidas na fisiopatologia do TB e que drogas antidepressivas poderiam atuar através do aumento dos níveis desse fator de proteção neuronal.

Os resultados do presente estudo buscam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de ação do antidepressivo tianeptina bem como para o desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica, baseada na regulação da secreção de fatores neuroprotetores em um modelo *in vitro* para futuramente ser utilizada na clínica para o tratamento da depressão bipolar.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transtorno Bipolar

O Transtorno Bipolar (TB) é uma doença psiquiátrica caracterizada por alternâncias de episódios de humor chamados de mania e depressão aliados a períodos de remissão dos sintomas denominado eutímia (16) e atualmente apresenta uma prevalência de 2,4% na população mundial (1). O TB inicia-se em geral no início da vida adulta, é uma doença grave que apresenta um curso crônico e recorrente. Apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade trazendo prejuízos e custos significativos para o portador e para a sociedade (3, 16, 17). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o TB é considerado a sexta maior causa de incapacitação do mundo na faixa etária entre 15 e 44 anos (8).

De acordo com a Classificação Internacional das Doenças (CID-10) e o Manual Diagnósticos e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM IV) o TB é classificado em dois subtipos. O TB tipo I caracterizado pela presença de episódios maníacos e o TB tipo II é diagnosticado pela presença de episódios hipomaníacos e depressivos.

Para estabelecer o diagnóstico de TB, é preciso haver a identificação da presença de um ou mais episódios maníaco ou hipomaníaco ao longo da vida, e muitas vezes essas informações precisam ser obtidas de familiares ou pessoas próximas ao paciente a fim de estabelecer um diagnóstico correto (18). De acordo com a Associação Psiquiátrica Americana (19), o episódio maníaco é caracterizado pela elevação persistente do humor, podendo ser expansivo ou irritável, e que perdure por pelo menos uma semana. A maioria dos pacientes em mania apresentam grandiosidade, fuga de ideias e aceleração do pensamento. Outros sintomas também costumam aparecer, como diminuição da concentração e da necessidade de sono, distraibilidade, confusão, taquialia e envolvimento excessivo em atividades prazerosas (por ex. compras desenfreadas, indiscrições sexuais). Esses pacientes também podem apresentar sintomas psicóticos como delírios e alucinações. Os episódios hipomaníaco são semelhantes ao quadro maníaco, porém não apresentam sintomas psicóticos e possuem uma gravidade menor, não acarretando um prejuízo acentuado na funcionalidade social e ocupacional do paciente. O episódio deve ser suficientemente grave para causar prejuízo significativo no âmbito familiar, social ou ocupacional, ou necessidade de hospitalização ou ter presença de sintomas psicóticos (19).

Os episódios depressivos também são caracterizados por alterações de humor. Este apresenta-se com presença de tristeza e melancolia. O paciente perde interesse ou prazer pelas atividades do dia, sente-se angustiado e ansioso com sentimento de inutilidade ou culpa excessiva. Perda ou ganho significativo de peso sem estar em dieta, além de apresentarem insônia ou hipersonia quase todos os dias. Podem apresentar uma agitação ou retardo psicomotor, dificuldade de realizar tarefas, podendo apresentar um estado catatônico. Também possuem pensamentos de morte recorrentes, ideação suicida e tentativa de suicídio. Os sintomas necessariamente devem causar prejuízo em todas as áreas da vida da pessoa, não podem ser causados por uso de substâncias, nem ser devido a alguma condição médica ou luto. (16, 19).

Mesmos com os avanços dos últimos anos, o TB permanece uma doença recorrente, com curso bastante heterogêneo, predominantemente depressivo, e a tentativa de elucidar a fisiopatologia dessa doença tem sido foco de muitos estudos, mas ainda não se sabe a exata causa do TB.

2.2 Fisiopatologia do Transtorno Bipolar

Apesar da fisiopatologia do TB ainda não estar elucidada, pode-se afirmar que nas últimas décadas houve um avanço significativo no conhecimento da etiologia dessa doença. Há estudos mostrando que mudanças de neuroimagem estrutural e funcional, alterações do eixo-hipotalamo-pituitária-adrenal (HPA), aumento da atividade pró-inflamatória, estresse oxidativo e vias neurotróficas

estão associados ao TB e estes fatores podem estar implicados na fisiopatologia dessa doença (20).

Estudos de neuroimagem estrutural e funcional vêm identificando anormalidades anatômicas, funcionais e neuroquímicas em algumas áreas do cérebro de pacientes com TB, como o córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e em estruturas subcorticais como tálamo e núcleos da base (21). Dentre essas anormalidades estão redução do volume da substância cinzenta, redução de N-acetil-aspartato (marcador de integridade neuronal), diminuição do volume e densidade de neurônios e células da glia e aumento nos níveis de neurotransmissores como glutamato (22). Estudos *post mortem* também mostram uma série de alterações no cérebro de pacientes com TB, como redução do tamanho e número de neurônios e células da glia no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala. Tais alterações celulares podem ser responsáveis pelos prejuízos cognitivos e funcionais que esses pacientes apresentam ao decorrer da doença (22, 23).

A inflamação é outro mecanismo que tem sido associado à fisiopatologia do TB (24, 25) e que também se relaciona com a progressão da doença (26). As citocinas, proteínas produzidas por células do sistema imune, são fatores centrais nos processos inflamatórios. Citocinas como as interleucinas IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF- α) possuem uma ação pró-inflamatória enquanto as interleucinas IL-4 e IL-10 apresentam uma atividade anti-inflamatória. Essas proteínas são moduladoras potentes do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) provocando liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e produção de cortisol, provocando uma hiperatividade do eixo-hipotálamo-pituitária-adrenal

(HPA), isso por sua vez é um estímulo para a inflamação (27). Além disso, as citocinas modulam funções no sistema nervoso central, como controle da neuroplasticidade, resiliência celular, e regulação da apoptose (28). Pacientes com TB, durante episódios agudos da doença, tem mostrando alterações nos níveis das citocinas. Estudos mostram um aumento nos níveis de TNF- α e IL-6 em pacientes com episódios de depressão e mania quando comparados com eutímicos ou controles saudáveis (29-31). Esses resultados se tornam mais evidentes, quando pacientes em um estágio avançado da doença são comparados com controles saudáveis (32, 33). Em outro estudo observou-se um aumento nos níveis de TNF- α e IL-6 em pacientes eutímicos, comparados com indivíduos saudáveis (34). Esses dados evidenciam uma correlação entre o TB e o sistema imunológico e sugerem que a inflamação esta relacionada com a fisiopatologia dessa doença.

O envolvimento do estresse oxidativo em doenças psiquiátricas também tem sido alvos de muitos estudos. O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativo que contém um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (35). Nos seres humanos são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, mas os que ganham maior destaque devido à reatividade e aos danos que podem causar são os radicais derivados do oxigênio. O termo espécies reativas do oxigênio (36) inclui não somente radicais livres, mas também, espécies não radicalares derivadas do oxigênio (37, 38). Essas espécies podem causar danos a alvos celulares como lipídeos, proteínas e DNA. No entanto, nosso organismo possui sistemas de defesas antioxidantes como as enzimas superóxido dismutase (Sod), glutathiona peroxidase (GPx),

catalase (Cat), glutathione-S-transferase (GST) (39). Além das defesas enzimáticas existem ainda antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione, vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), flavonoides, β -caroteno e N-acetilcisteína (40). Quando há um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as moléculas pró-oxidante estabelece-se um estado de estresse oxidativo. O Sistema Nervoso Central (SNC) é particularmente sensível ao estresse oxidativo, ele utiliza uma alta taxa de oxigênio e possui moderadas defesas antioxidantes, além disso, a constituição rica em lipídeos do cérebro favorece o dano (41). Estudos em pacientes com TB mostram um dano oxidativo acentuado, (33, 42-45) e os sistema antioxidantes enzimáticos também estão alterados com aumento na atividade da Sod, GPx e GST (43, 46). No TB, há fortes indícios que estes danos oxidativos sejam provenientes de uma disfunção mitocondrial (26), já que esta organela esta envolvida na regulação do estado redox intracelular e é a principal fonte de radicais livres através da cadeia transportadora de elétrons (47). Dessa forma, o estresse oxidativo esta associado com o curso da doença, e tratamentos que diminuem esse dano podem desacelerar a progressão do TB.

Os fatores neurotróficos também estão fortemente relacionados com a neurobiologia dos transtornos de humor. Como essa via será o foco desse trabalho, suas funções e correlações com o TB estão descritos detalhadamente abaixo.

2.3 Neurotrofinas e BDNF

As neurotrofinas formam uma família de pequenas proteínas secretadas pelo SNC que atuam em vários aspectos do funcionamento cerebral. A primeira

proteína desse grupo a ser descoberto foi o fator de crescimento do nervo (NGF) em 1950. Após essa descoberta a neurobiologia ampliou-se para a identificação e elucidação de muitas funções celulares (48). Em 1982 foi descoberto o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) seguida pela neurotrofina 3 (NT3) e a neurotrofina 4/5 (NT4/5) (49). Desde então, muitos outros fatores de crescimento neuronal já foram identificados como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (50).

Como outras proteínas, as neurotrofinas originam-se de seus precursores, as pró-neurotrofinas que são proteoliticamente clivadas para produzir as neurotrofinas maduras (51). As neurotrofinas maduras ligam-se a uma família de receptores tirosina quinase chamados de Trk, composto por três receptores que podem ser ativados por uma ou mais neurotrofinas. O receptor TrkA, TrkB, e TrkC confere responsividade ao NGF, BDNF ou NT4/5, e ao NT-3 respectivamente (Figura 1) (52). Já as pró- neurotrofinas possuem maior afinidade pelo receptor pan-neurotrofina p⁷⁵ e ao se ligarem nesse receptor podem desencadear um processo de morte celular (51). No entanto, ao se ligar aos seus receptores Trk as neurotrofinas ativam vias intracelulares que vão estimular a sobrevivência, crescimento e integridade neuronal (53, 54), além de atuar na plasticidade sináptica e em mecanismos de aprendizado e memória (55).

O BDNF é considerado a principal é mais abundante neurotrofina do SNC. Ao se ligar no seu receptor TrkB promove a dimerização e autofosforilação em resíduos de tirosina quinase intracelular, esses eventos de fosforilação desencadeiam cascatas intracelulares através da ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) ou fosfolipase Cy

(PLC γ) (56) (Figura 2). A via desencadeada a partir da MAPK influencia eventos de transcrição como o aumento do fator de transcrição CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc) e regula a síntese proteica dependente de plasticidade. A ativação PI3K induz a ativação da proteína Akt que está envolvida em muitas funções como sobrevivência celular, tradução e transporte de proteínas relacionadas com a manutenção da plasticidade sináptica (56). A via da fosfolipase C γ está envolvida com alterações nos níveis de cálcio intracelular, liberação de neurotransmissores e com a transcrição de CREB (56). Além disso, a ligação do BDNF no seu receptor TrkB modula a transmissão sináptica por meio de alterações pré-sinápticas na liberação de neurotransmissores (57). Portanto, BDNF está envolvido em uma série de vias de sinalização intracelulares, como sobrevivência, diferenciação e crescimento celular, regulando também a plasticidade das células neuronais.

Outro mecanismo importante do BDNF que se tem estudado é o seu poder de inibição da cascata de morte celular. Várias evidências mostram que essa proteína inibe a morte celular ao se ligar na via de sinalização MAPK, aumentando a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (58). O BDNF também desempenha papel fundamental na plasticidade neuronal e memória, e parece mediar os principais processos dependentes de estímulo externo, isto é, aprendizado, experiências, memórias, ou seja, as suas características o torna um potencial mediador neurobiológico das experiências de vida.

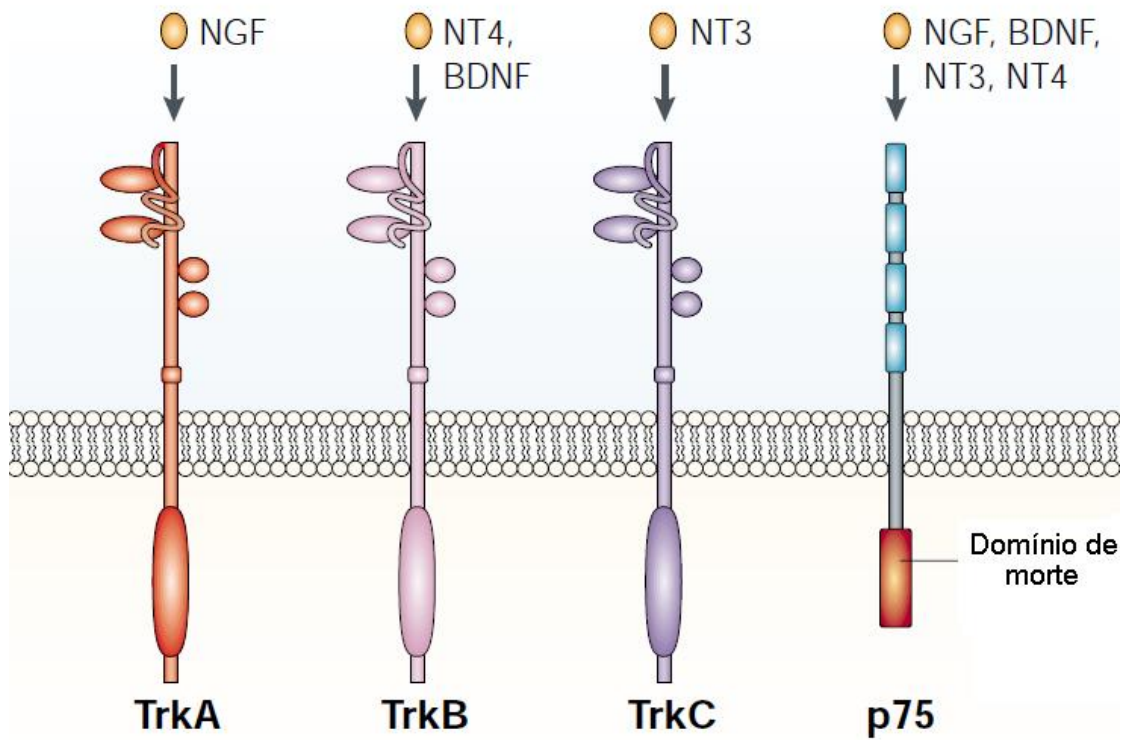


Figura 1. Esquema mostrando os tipos de receptor tirosina quinase (Trk) e suas diferentes afinidades para as neurotrofinas. (Modificado de: Chao MV. *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. Nature reviews: Neuroscience*, 4:299-309, 2003).

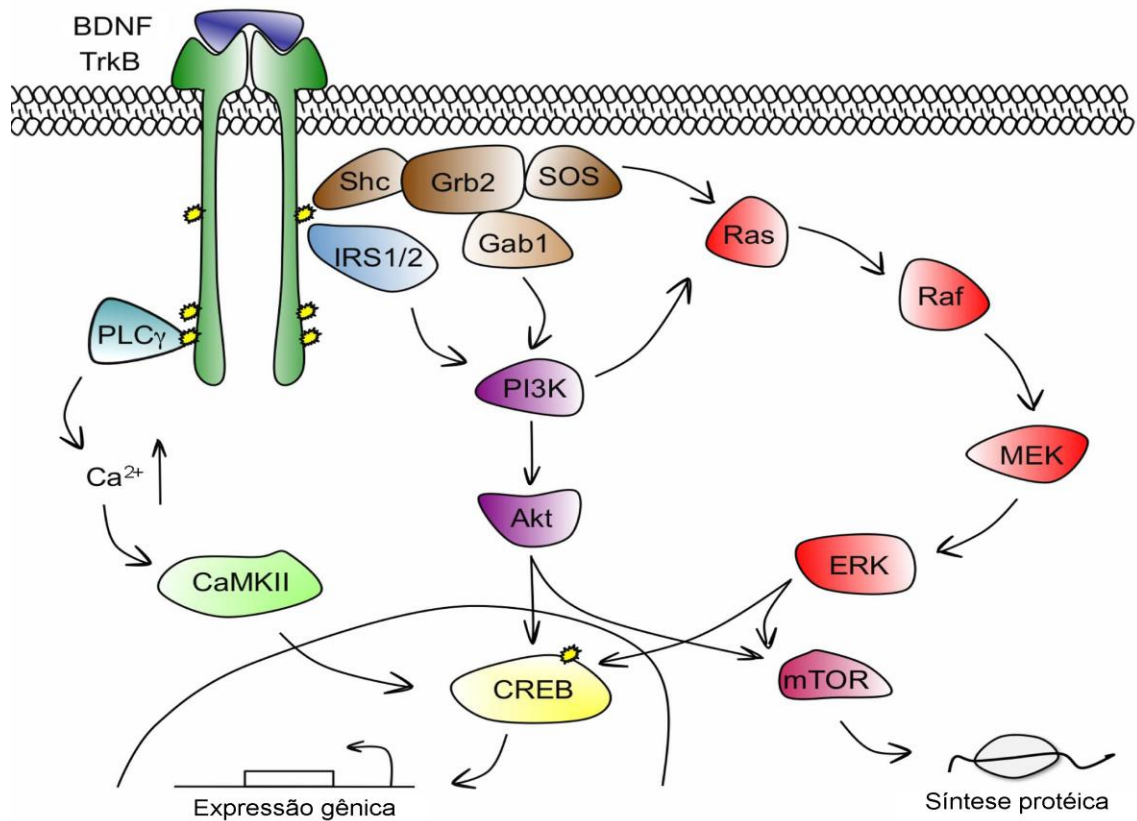


Figura 2. O BDNF liga-se com alta afinidade ao receptor TrkB induzindo a dimerização e autofosforilação de resíduos de tirosina do receptor, servindo como sítios de ligação a moléculas efetoras e ativando três principais vias intracelulares: PLC γ , PI3K e MAPK. Essas vias levam à fosforilação e ativação do fator de transcrição CREB, atuando na transcrição de genes essenciais para a sobrevivência e diferenciação de neurônios. O recrutamento da PLC γ aumenta os níveis intracelulares de Ca^{2+} e leva à ativação de CaMKII, fosforilando CREB. PI3K pode ser ativada pelo complexo Shc/Grb2/SOS através da Gab1 e IRS1/2. Os produtos lipídicos gerados pela ativação da PI3K se ligam e ativam a proteína cinase Akt. A cascata ERK pode ser ativada tanto pelo complexo Shc/Grb2/SOS quanto PI3K. A fosforilação de ERK leva diretamente à fosforilação de CREB. Tanto Akt quanto ERK ativam mTOR, responsável por aumentar a tradução de proteínas. (Modificado de: Cunha C et al. A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 3:1-14, 2010)

2.4 BDNF e Transtorno Bipolar

As neurotrofinas, em especial o BDNF, tem sido amplamente estudadas em muitas doenças neurológicas e psiquiátricas. No TB, há estudos mostrando que essa proteína está diminuída em pacientes durante os episódios agudos da doença quando comparados a controles saudáveis (10). Estudos posteriores também encontraram resultados semelhantes em pacientes não medicados (11, 12). Além disso, os níveis de BDNF são correlacionados negativamente com a gravidade dos sintomas maníacos e depressivos (10-12, 59). Tramontina e colaboradores também mostraram que os níveis de BDNF aumentam depois da melhora dos sintomas em pacientes com episódios de mania sugerindo que o BDNF pode ser um preditor de resposta ao tratamento (60). Adicionalmente, também observa-se que os níveis dessa neurotrofina mostram-se diminuídos em pacientes crônicos, ou seja, que estão em um estágio mais avançado da doença, em comparação com pacientes em estágios iniciais (34).

Estudos em modelos animais corroboram com os achados em seres humanos. Apesar das limitações que os estudos com animais possuem, eles são de grande importância para o entendimento da neurobiologia de muitas doenças, já que permitem extrapolar os conhecimentos para regiões inacessíveis em estudos clínicos. Para o TB, o modelo animal de mania induzido por d-anfetamina é considerado um dos modelos de mania mais bem validado na literatura (61). Estudos utilizando esse modelo mostram uma diminuição nos níveis de neurotrofinas no hipocampo e esta diminuição é revertida pela administração de lítio (62, 63). Esses resultados corroboram com os achados encontrados em

pacientes e validam a avaliação dos níveis de BDNF periférico, mostrando que há uma correlação entre SNC e periferia.

Com esses resultados pode-se sugerir que em uma fase inicial da doença o BDNF estaria diminuído durante os episódios agudos, e que em um estágio mais avançado da doença o BDNF torna-se cronicamente diminuído. Essa teoria esta de acordo com as evidências de neuroprogressão e prejuízos cognitivos apresentados pelos pacientes quando a doença torna-se crônica.

2.5 Bcl-2 e Transtorno Bipolar

A Bcl-2 é uma proteína da família da Bcl-2 que consiste em proteínas próapoptóticas (Bad/Bik, Bax, Bak, tBid e Bim) e antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x). Essas proteínas estão localizadas na membrana da mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de golgi (64). A Bcl-2 possui um caráter protetor pela sua ação em suprimir cascatas apoptóticas através do sequestro de caspases, prevenindo a liberação de fatores próapoptóticos, como citocromo c, da mitocôndria para dentro do citosol e por aumentar a recaptção de cálcio pela mitocôndria, impedindo a toxicidade causada pelo cálcio quando este se encontra em níveis elevados no citosol (65). Além disso, a Bcl-2 promove vias neurotróficas que assim como o BDNF, possuem um importante papel no crescimento, diferenciação, maturação e sobrevivência celular (66).

Há um grande interesse no envolvimento da Bcl-2 na fisiopatologia e tratamento do TB. Essa proteína pode ser alvo do tratamento com estabilizadores de humor como lítio e ácido valpróico (67). Estudos mostram um aumento na

expressão de Bcl-2 em cérebros de ratos que receberam estabilizadores de humor e em linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com essas medicações (68, 69). No entanto, a atividade de antidepressivos na expressão de Bcl-2 ainda é um pouco inconsistente e dependente da classe do antidepressivo e do tipo de células estudadas. Chiou e colaboradores observaram níveis elevados de mRNA da Bcl-2 em células de hipocampo tratados com fluoxetina (70). Entretanto Levkovitz demonstrou aumento de apoptose em células de neuroblastoma humano e glioma de ratos tratados com paroxetina, fluoxetina e clomipramina (71).

Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos com uma ação antiapoptótica bem estabelecida podem tornarem-se promissores tratamentos para do TB, impedindo a morte celular e as alterações neuroanatômicas que ocorrem com a progressão da doença.

2.6 Alostase, toxicidade sistêmica e neuroprogressão no Transtorno Bipolar

O termo alostase foi introduzindo por McEwen and Stellar em 1993, para referir-se a ferramentas fisiológicas que são requeridas para que o organismo adapte-se a uma situação de estresse, ou seja, permitem uma maior resiliência frente os desafios da vida (72). Esses mecanismos de alostase podem ser protetores para o individuo em curto prazo, no entanto, se esses processos se tornam extremos ou ineficientes é chamado de carga alostática, ou seja, um desgaste do corpo e do cérebro, resultado da crônica tentativa dos sistemas fisiológicos de manter a homeostase do organismo frente a mudanças ambientais

(73). Os efeitos da carga alostática são cumulativos e notavelmente visto durante o processo de envelhecimento e estresse crônico. Indivíduos com alta carga alostática possuem maior incidência de doenças cardiovasculares, doenças metabólicas, além de um declínio físico e cognitivo, e morte prematura (74-76). No TB, tem-se proposto um conceito de alostase para integrar a vulnerabilidade ao estresse, o prejuízo cognitivo e os altos índices de comorbidade e mortalidade associados a progressão desta doença (77) (Figura 3). O TB pode ser considerado uma doença com uma cumulativa carga alostática que aumenta progressivamente com o passar dos anos e com o aumento no número dos episódios de humor (6). Entre os mediadores da carga alostática estão os fatores neurotróficos (78), neurotransmissores (72), sistema inflamatório (79), hormônios (80), e estresse oxidativo (81). Embora esses mediadores estejam relacionados com um funcionamento normal e proteção do organismo, quando em excesso são associados com um quadro de toxicidade sistêmica, acarretando prejuízos celulares (82). Um estudo no qual se buscou detectar marcadores periféricos como mediadores de carga alostática em pacientes bipolares em episódios agudos da doença e na fase de eutímia comparados com controles saudáveis mostrou que os pacientes com TB, principalmente nas fases de mania e depressão, apresentaram um alto índice de toxicidade sistêmica, quando comparados aos controles (33, 83). Além disso, achados recentes indicam que a exposição a episódios de humor recorrentes causariam uma sobrecarga alostática aumentando os níveis de toxicidade sistêmica (84). Essa toxicidade sistêmica está associada com as características progressivas da doença, e com todos os prejuízos que a evolução dessa patologia acarreta aos seus portadores, como o

aumento das comorbidades, a mortalidade precoce e a notória disfunção cognitiva, presente não só nas fases agudas da doença, mas mantendo-se durante a fase de eutimia (85).

Dessa forma, para diminuir os danos causados pelo curso progressivo do TB, são necessários tratamentos que tenham como alvos terapêuticos vias celulares que aumentem a expressão de proteínas com caráter neuroprotetor como BDNF e a Bcl-2, melhorem as sinapses neuronais, aumentem a neurogênese e diminuam os efeitos deletérios do estresse.

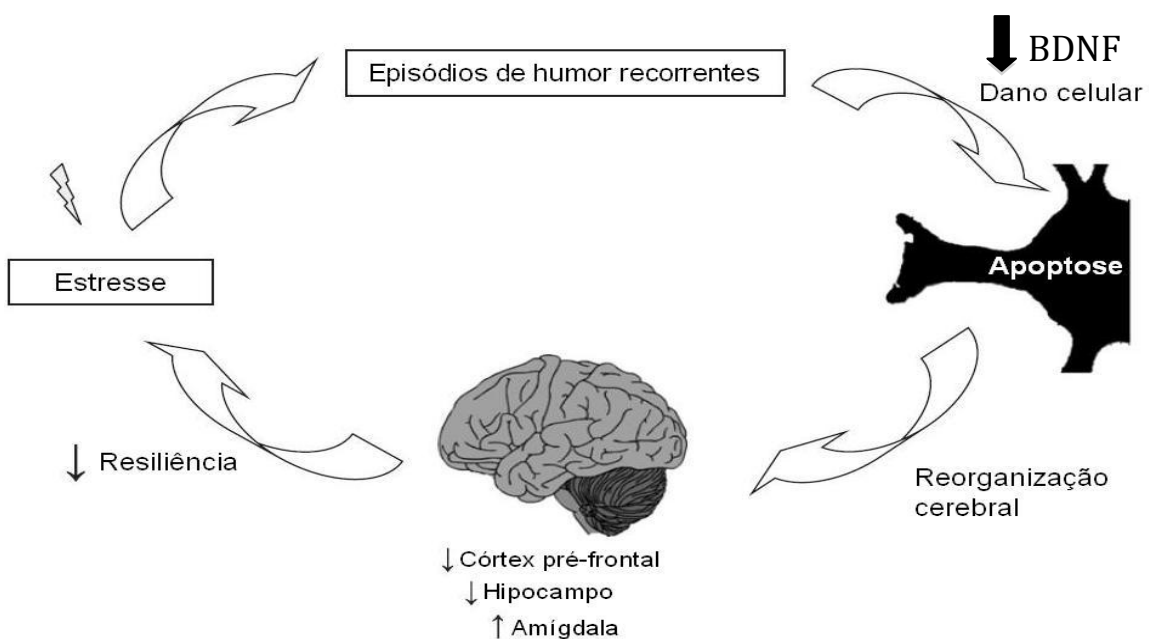


Figura 3. Ciclo proposto para o dano causado pelos múltiplos episódios. O estresse ambiental e os episódios de humor recorrentes estariam associados a diminuição dos níveis de BDNF. Esta alteração estaria associada a uma maior vulnerabilidade ao dano celular, levando a um remodelamento cerebral e consequente alteração nas regiões envolvidas na regulação do humor. Essas alterações diminuem a capacidade de adaptação ao estresse instalando-se o ciclo.

2.7 Tratamento do Transtorno Bipolar

Apesar de inúmeras opções terapêuticas, o TB ainda é uma condição psiquiátrica de difícil tratamento. O objetivo em curto prazo é o tratamento dos episódios de depressão e mania ou mistos. O objetivo em longo prazo é a profilaxia das recorrências, ou seja, impedir que o paciente apresente novos episódios de humor. As medicações mais usadas são o carbonato de lítio, os anticonvulsivantes como ácido valpróico, carbamazepina e lamotrigina e os antipsicóticos atípicos como risperidona, quetiapina, olanzapina, aripiprazol e ziprasidona (16). O uso dos estabilizadores de humor são essenciais durante todas as fases do tratamento farmacológico do TB e o ideal seria que eles tivessem uma eficácia antimaníaca e antidepressiva e prevenissem novos episódios de humor. No entanto, ainda não há um medicamento com tais características, sendo necessário, muitas vezes, a combinação de dois ou mais fármacos (86).

A depressão bipolar é, particularmente, um quadro de tratamento muito complicado. No passado, o foco do tratamento do TB era mais voltado para a fase maníaca da doença, entretanto recentes estudos ilustram a necessidade de buscar estratégias terapêuticas para a fase depressiva do TB, por varias razões (87). Primeiro, durante o curso natural da doença os pacientes passam muito mais tempo na fase depressiva do que na fase maníaca (88). Segundo, quando o paciente encontra-se na fase depressiva do TB ele se torna mais suscetível a cometer um suicídio (89). Além disso, a incompleta remissão do episódio, com a persistência de sintomas sub-sindrômicos depressivos tem sido a causa de prejuízos funcionais (90) aumentando a chance de recaída (91). Dessa forma,

buscar estratégias terapêuticas adequadas para o tratamento da depressão bipolar é um desafio para a psiquiatria e ainda há uma grande necessidade da identificação de novos fármacos que melhorem o prognóstico dessa condição.

2.8 Tianeptina

A molécula da tianeptina foi sintetizada pelo Instituto Servier, França no começo dos anos 1980, durante pesquisas para o desenvolvimento de novos antidepressivos mais efetivos e seguros que os antidepressivos tricíclicos (92). A atividade antidepressiva desse fármaco foi comprovada em modelos animais (93, 94) e em ensaios clínicos (39, 95) e ela tem sido administrada nas dosagens de 25 a 50mg/dia em pacientes com depressão maior e depressão bipolar e uma boa eficácia e tolerabilidade é observada (96).

O mecanismo de ação da tianeptina é diferente dos demais antidepressivos, enquanto os antidepressivos clássicos inibem a recaptação de serotonina (5-HT) e outros neurotransmissores, a tianeptina aumenta seletivamente a recaptação de 5-HT (97). No entanto, estudos mostram que não há alterações da eficácia da 5-HT na transmissão sináptica (98, 99).

Esse fármaco possui propriedades únicas que contrapõem a maior parte das alterações vistas no TB. Estudos recentes têm focado suas investigações nas ações neuroprotetora da tianeptina, como na melhora da plasticidade neural, principalmente em regiões como hipocampo e córtex e na capacidade de reverter prejuízos causados pelo estresse em modelos animais. Margarinus e colaboradores observaram que a tianeptina reverteu o encurtamento dendrítico

causado pelo estresse na região CA3 do hipocampo (100). Outro trabalho mostrou uma significativa ação da tianeptina em aumentar a neurogênese em animais submetidos a estresse (101), além de apresentar uma ação anti-apoptótica ao diminuir a morte celular causada pelo estresse em córtex e hipocampo de ratos (102).

Algumas classes de antidepressivos estão relacionadas com um aumento da fosforilação de CREB induzindo um aumento na expressão de fatores neurotróficos como o BDNF. Reagan e colaboradores analisaram o conteúdo total e fosforilado de CREB e os níveis de mRNA do BDNF assim como os níveis proteicos dessa neurotrofina no hipocampo e amígdala de ratos sujeitos a crônico estresse na presença e ausência de tianeptina. Ele demonstrou que a tianeptina diminuiu pCREB e aumentou a expressão de BDNF na região da amígdala, sugerindo que o aumento de fatores neurotróficos podem ser relevantes para a eficácia clínica desse fármaco (103).

A tianeptina também possui uma ação na modulação do sistema glutamatérgico. A liberação de glutamato (neurotransmissor excitatório) é regulada por hormônios glicocorticoides secretados em resposta ao estresse ativando o eixo HPA (104). Estados depressivos e ansiosos e a exposição ao estresse aumentam a liberação de glutamato e conseqüentemente a atividade glutamatérgica (105, 106). Níveis elevados desse neurotransmissor podem causar efeitos prejudiciais no SNC, como suprimir neurogênese no giro denteado do hipocampo e ter um papel chave na retração dendrítica causada pelo estresse. A tianeptina possui uma propriedade de normalizar a transmissão glutamatérgica, diminuindo os danos causados pelo aumento do glutamato durante episódios

depressivos. Estudos de eletrofisiologia em ratos mostram que o estresse aumenta correntes excitatórias nos receptores de glutamato NMDA e que a concomitante administração de tianeptina normaliza as mudanças nas correntes desses receptores (107). A crônica administração de tianeptina também pode ter como alvo o estado de fosforilação dos receptores de glutamato alterando suas funções (108). A regulação e distribuição do transportador de glutamato da glia (GLT-1) e suas formas também dão uma ideia da atividade desse neurotransmissor e suas ações no SNC. Ratos submetidos ao estresse tiveram um aumento na expressão de GLT-1 na região do giro denteado e CA3 do hipocampo, quando os animais receberam tianeptina esse aumento na expressão de GLT-1 foi suprimida, normalizando as concentrações de glutamato e impedindo seus efeitos tóxicos (109, 110). Além disso, a tianeptina mostrou efeitos benéficos na função cognitiva e memória em modelos animais (111-113). Dentre outras propriedades farmacológicas da tianeptina encontra-se uma atividade analgésica, propriedades ansiolíticas sem efeitos colaterais, tratamento de desordens do pânico e efeito anticonvulsivante (39, 96, 114-117).

2.9 Síntese de uma nova molécula (NANT 03)

O NANT 03 é uma nova molécula sintetizada a partir da tianeptina, com o intuito de desenvolver uma nova opção terapêutica para o tratamento de estados depressivos, com uma potente ação neuroprotetora. Sabendo-se das características neuroprotetoras da tianeptina, o objetivo da síntese desse novo composto é potencializar as ações da tianeptina através da inserção de

grupamentos funcionais na molécula original com a finalidade de desenvolver uma droga mais facilmente absorvível pelas células e assim mais eficaz em desencadear ações antidepressivas e neuroprotetoras.

O NANT 03 foi obtido a partir de uma reação de n-alquilação de tianeptina e bromopropeno resultando no produto Ácido 7-[(3-cloro-6-metil-5,5-dioxo-6,11-diidrobenzo[c,f]-[1,2]tiazepin-11-il)N-alilamino]heptanóico.

As estruturas e reações químicas realizadas para a síntese desse novo composto não podem ser divulgadas por motivos de restrições contratuais e para não prejudicar a patente.

3. MARCO TEÓRICO

Baseados na revisão da literatura pode-se verificar que nos últimos anos houve um aumento expressivo no número de estudos que buscam entender os mecanismos neurobiológicos envolvidos nas patologias psiquiátricas. Com isso, muitas questões sobre essas doenças já foram elucidadas, no entanto, apesar de tantos esforços, há muitos resultados inconclusivos e conflitantes e muitas dúvidas para serem esclarecidas, sendo assim tornam-se imprescindíveis mais estudos nesse campo.

Recentemente estudos científicos têm apontado alguns fatores importantes na fisiopatologia do TB. Como mostrado na revisão de dados da literatura, há alterações de marcadores inflamatórios, estresse oxidativo e vias neurotróficas envolvidas nessa patologia. Sabe-se também, que com a progressão da doença há um declínio cognitivo e funcional importante nos pacientes. Baseado nesses dados, já se conseguiu compreender melhor como essa doença se desenvolve. Contudo, apesar dos avanços nos últimos anos, ainda não se desenvolveu abordagens terapêuticas inovadoras, que tenham como alvo de ação vias celulares sabidamente envolvidas com a progressão da doença. Além disso, muitas terapias farmacológicas por mais efetivas que possam ser, continuam sem um mecanismo de ação completamente elucidado, tornando ainda mais complexa o entendimento dessa doença.

Dentro desse contexto, este trabalho busca uma nova estratégia terapêutica baseado da síntese de um novo composto a partir de uma molécula que se sabe possuir características neuroprotetoras, com a finalidade de desenvolver um fármaco mais eficaz por atuar em vias celulares envolvidas com a

progressão da doença e assim obter novas opções terapêuticas para um tratamento mais adequado dos pacientes.

4. JUSTIFICATIVA

Apesar de nos últimos anos ter havido um grande avanço no entendimento da fisiopatologia do TB, pouco se inovou no aspecto farmacológico, ou seja, as principais opções terapêuticas disponíveis continuam as mesmas, tornando o TB ainda uma condição psiquiátrica de difícil tratamento. Diversos estudos de seguimento mostram que as maiorias dos pacientes não conseguem uma recuperação sintomática duradoura, e mesmo quando livres de sintomas depressivos e maníacos apresentam um prejuízo na funcionalidade social e ocupacional (16). Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de terapias mais eficazes em reverter os sintomas do TB e amenizar os danos que a progressão da doença acarreta na funcionalidade dos pacientes.

Nesse estudo buscou-se entender melhor o mecanismo de ação da tianeptina e do NANT 03, uma molécula desenvolvida com a finalidade de se obter uma nova estratégia terapêutica para o TB, e avaliar como essas drogas atuam em vias sabidamente envolvidas na etiologia do TB, como a via do BDNF. Para isso, estabeleceu-se um modelo *in vitro* mais adequado para esse estudo, utilizando um protocolo de diferenciação de uma linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y em neurônios dopaminérgicos.

O resultado desse trabalho pode contribuir na elucidação do mecanismo de ação da tianeptina, além de ajudar no desenvolvimento de uma nova proposta terapêutica baseada na regulação de fatores neuroprotetores, para que estes possam ajudar na manutenção da integridade neuronal dos pacientes com TB diminuindo os danos causados pela progressão da doença.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Avaliar os efeitos neuroprotetores da tianeptina e de um novo composto (NANT03) em um modelo *in vitro* através da cultura de células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos.

5.2 Objetivos secundários

- 1- Estabelecer o modelo de diferenciação celular da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y em neurônios dopaminérgicos.
- 2- Avaliar a expressão de mRNA do gene do BDNF em células SH-SY5Y diferenciadas, tratadas com tianeptina e NANT 03.
- 3- Analisar os níveis de BDNF intracelular em células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com tianeptina e NANT03.
- 4- Quantificar os níveis de BDNF secretado pelas células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com tianeptina e NANT03.
- 5- Avaliar os níveis de Bcl-2 em células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com tianeptina e NANT 03.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, et al. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Mar;68(3):241-51.
2. Grant BF, Stinson FS, Hasin DS, Dawson DA, Chou SP, Ruan WJ, et al. Prevalence, correlates, and comorbidity of bipolar I disorder and axis I and II disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Clin Psychiatry*. 2005 Oct;66(10):1205-15.
3. Muller-Oerlinghausen B, Berghofer A, Bauer M. Bipolar disorder. *Lancet*. 2002 Jan 19;359(9302):241-7.
4. Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Greenwald S, Lee CK, Newman SC, et al. The cross-national epidemiology of social phobia: a preliminary report. *Int Clin Psychopharmacol*. 1996 Jun;11 Suppl 3:9-14.
5. Rosa AR, Reinares M, Michalak EE, Bonnín CM, Sole B, Franco C, et al. Functional impairment and disability across mood states in bipolar disorder. *Value Health*. 2012 Dec;13(8):984-8.

6. Vieta E, Popovic D, Rosa AR, Sole B, Grande I, Frey BN, et al. The clinical implications of cognitive impairment and allostatic load in bipolar disorder. *Eur Psychiatry*. 2012 Apr 23.
7. Valenti M, Pacchiarotti I, Bonnin CM, Rosa AR, Popovic D, Nivoli AM, et al. Risk factors for antidepressant-related switch to mania. *J Clin Psychiatry*. 2012 Feb;73(2):e271-6.
8. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1241-3.
9. Post RM. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res*. 2007 Dec;41(12):979-90.
10. Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 2006 May 8;398(3):215-9.
11. de Oliveira GS, Cereser KM, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Fries GR, Stertz L, et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *J Psychiatr Res*. 2009 Sep;43(14):1171-4.

12. Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, et al. Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. *Biol Psychiatry*. 2007 Jan 15;61(2):142-4.
13. Fortunato JJ, Reus GZ, Kirsch TR, Stringari RB, Stertz L, Kapczinski F, et al. Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Nov 13;33(8):1425-30.
14. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 1995 Nov;15(11):7539-47.
15. Yoshimura R, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Umene-Nakano W, Katsuki A, Hayashi K, et al. Adding a low dose atypical antipsychotic drug to an antidepressant induced a rapid increase of plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with treatment-resistant depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 Mar 17;34(2):308-12.
16. Goodwin FK, Jamison KR. *Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorder and Recurrent Depression*. 2th ed. New York: Oxford University Press; 2007.

17. Merikangas KR, Kalaydjian A. Magnitude and impact of comorbidity of mental disorders from epidemiologic surveys. *Curr Opin Psychiatry*. 2007 Jul;20(4):353-8.
18. Belmaker RH. Bipolar disorder. *N Engl J Med*. 2004 Jul 29;351(5):476-86.
19. American Psychiatry Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, fourth edition. Washington, 2000.
20. Langan C, McDonald C. Neurobiological trait abnormalities in bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2009 Sep;14(9):833-46.
21. Strakowski SM, Delbello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry*. 2005 Jan;10(1):105-16.
22. Gigante AD, Young LT, Yatham LN, Andreazza AC, Nery FG, Grinberg LT, et al. Morphometric post-mortem studies in bipolar disorder: possible association with oxidative stress and apoptosis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011 Sep;14(8):1075-89.
23. Rajkowska G. Cell pathology in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2002 Apr;4(2):105-16.

24. Brietzke E, Kapczinski F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Aug 1;32(6):1355-61.
25. Drexhage RC, Knijff EM, Padmos RC, Heul-Nieuwenhuijzen L, Beumer W, Versnel MA, et al. The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*. 2010 Jan;10(1):59-76.
26. Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jan;35(3):804-17.
27. Watson S, Gallagher P, Ritchie JC, Ferrier IN, Young AH. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2004 Jun;184:496-502.
28. Munoz-Fernandez MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998 Oct;56(3):307-40.

29. Hung YJ, Hsieh CH, Chen YJ, Pei D, Kuo SW, Shen DC, et al. Insulin sensitivity, proinflammatory markers and adiponectin in young males with different subtypes of depressive disorder. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Nov;67(5):784-9.
30. O'Brien SM, Scully P, Scott LV, Dinan TG. Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *J Affect Disord*. 2006 Feb;90(2-3):263-7.
31. Ortiz-Dominguez A, Hernandez ME, Berlanga C, Gutierrez-Mora D, Moreno J, Heinze G, et al. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord*. 2007 Sep;9(6):596-602.
32. Brietzke E, Kauer-Sant'Anna M, Teixeira AL, Kapczinski F. Abnormalities in serum chemokine levels in euthymic patients with bipolar disorder. *Brain Behav Immun*. 2009 Nov;23(8):1079-82.
33. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res*. 2011 Feb;45(2):156-61.
34. Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 May;12(4):447-58.

35. Halliwell B, Gutteridge, J.M.C. . Free radicals in biology and medicine. 3ed ed. Clarendon: Oxford.; 1999.
36. Kilic FS, Ozatik Y, Kaygisiz B, Baydemir C, Erol K. Acute antidepressant and anxiolytic effects of simvastatin and its mechanisms in rats. *Neurosciences (Riyadh)*. 2012 Jan;17(1):39-43.
37. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001;18(9):685-716.
38. Shao LE, Tanaka T, Gribi R, Yu J. Thioredoxin-related regulation of NO/NOS activities. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 May;962:140-50.
39. Wagstaff AJ, Ormrod D, Spencer CM. Tianeptine: a review of its use in depressive disorders. *CNS Drugs*. 2001;15(3):231-59.
40. Borela L, Shao, L.E. ,Varela, Q. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1° ed., Porto Alegre, 2004.
41. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2001 Apr;25(3):463-93.

42. Abelaira HM, Reus GZ, Ribeiro KF, Zappellini G, Cipriano AL, Scaini G, et al. Lamotrigine treatment reverses depressive-like behavior and alters BDNF levels in the brains of maternally deprived adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012 May;101(3):348-53.
43. Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2007 Sep;41(6):523-9.
44. Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, et al. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2007 Sep 30;153(1):27-32.
45. Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Cereser KM, Gomes FA, et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008 Oct 1;32(7):1677-81.
46. Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Goncalves CA, et al. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2009 Jul;34(4):263-71.

47. Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Dec;27(12):639-45.
48. Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 1951 Mar;116(2):321-61.
49. Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol.* 2003 Apr;69(5):341-74.
50. Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Mar;10(3):209-19.
51. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Aug;6(8):603-14.
52. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42.
53. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in

depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*. 2003 Jul 1;54(1):70-5.

54. Twiss JL, Chang JH, Schanen NC. Pathophysiological mechanisms for actions of the neurotrophins. *Brain Pathol*. 2006 Oct;16(4):320-32.

55. Chessick CA, Allen MH, Thase M, Batista Miralha da Cunha AB, Kapczinski FF, de Lima MS, et al. Azapirones for generalized anxiety disorder. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(3):CD006115.

56. Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Dec;10(12):850-60.

57. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*. 2010 Apr;70(5):304-22.

58. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*. 1999 Nov 12;286(5443):1358-62.

59. Fernandes BS, Gama CS, Kauer-Sant'Anna M, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor in bipolar and

unipolar depression: a potential adjunctive tool for differential diagnosis. *J Psychiatr Res.* 2009 Oct;43(15):1200-4.

60. Tramontina JF, Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Stertz L, Goi J, Chiarani F, et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. *Neurosci Lett.* 2009 Mar 13;452(2):111-3.

61. Fries GR, & Magalhães, PVS. A pesquisa básica na Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul.* 2010;32(2):33-4.

62. Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.* 2006 Jun 13;79(3):281-6.

63. Frey BN, Andreazza AC, Rosa AR, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, et al. Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania. *Behav Pharmacol.* 2006 Jun;17(4):311-8.

64. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:157-83.

65. Shaltiel G, Chen G, Manji HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Feb;7(1):22-6.
66. Jarskog LF, Gilmore JH. Developmental expression of Bcl-2 protein in human cortex. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000 Feb 7;119(2):225-30.
67. Shaltiel G, Dalton EC, Belmaker RH, Harwood AJ, Agam G. Specificity of mood stabilizer action on neuronal growth cones. *Bipolar Disord*. 2007 May;9(3):281-9.
68. Bachmann RF, Schloesser RJ, Gould TD, Manji HK. Mood stabilizers target cellular plasticity and resilience cascades: implications for the development of novel therapeutics. *Mol Neurobiol*. 2005 Oct;32(2):173-202.
69. Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, et al. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord*. 2002 Apr;4(2):129-36.
70. Chiou SH, Chen SJ, Peng CH, Chang YL, Ku HH, Hsu WM, et al. Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 May 5;343(2):391-400.

71. Levkovitz Y, Gil-Ad I, Zeldich E, Dayag M, Weizman A. Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement. *J Mol Neurosci*. 2005;27(1):29-42.
72. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*. 1993 Sep 27;153(18):2093-101.
73. McEwen BS. Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry*. 2003 Aug 1;54(3):200-7.
74. Karlamangla AS, Singer BH, Chodos J, McEwen BS, Seeman TE. Urinary cortisol excretion as a predictor of incident cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2005 Dec;26 Suppl 1:80-4.
75. Karlamangla AS, Singer BH, McEwen BS, Rowe JW, Seeman TE. Allostatic load as a predictor of functional decline. *MacArthur studies of successful aging. J Clin Epidemiol*. 2002 Jul;55(7):696-710.
76. Seeman TE, Crimmins E, Huang MH, Singer B, Bucur A, Gruenewald T, et al. Cumulative biological risk and socio-economic differences in mortality: *MacArthur studies of successful aging. Soc Sci Med*. 2004 May;58(10):1985-97.

77. Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, et al. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(4):675-92.
78. Schloesser RJ, Huang J, Klein PS, Manji HK. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Jan;33(1):110-33.
79. Tsai SY, Chen KP, Yang YY, Chen CC, Lee JC, Singh VK, et al. Activation of indices of cell-mediated immunity in bipolar mania. *Biol Psychiatry.* 1999 Apr 15;45(8):989-94.
80. Vieta E, Colom F, Corbella B, Martinez-Aran A, Reinares M, Benabarre A, et al. Clinical correlates of psychiatric comorbidity in bipolar I patients. *Bipolar Disord.* 2001 Oct;3(5):253-8.
81. Berk M, Conus P, Lucas N, Hallam K, Malhi GS, Dodd S, et al. Setting the stage: from prodrome to treatment resistance in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2007 Nov;9(7):671-8.
82. Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2005 May;4(2):141-94.

83. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Mol Psychiatry*. 2010 Aug;15(8):784-6.
84. Grande I, Magalhaes PV, Kunz M, Vieta E, Kapczinski F. Mediators of allostasis and systemic toxicity in bipolar disorder. *Physiol Behav*. 2012 Apr 12;106(1):46-50.
85. Martinez-Aran A, Vieta E, Colom F, Torrent C, Reinares M, Goikolea JM, et al. Do cognitive complaints in euthymic bipolar patients reflect objective cognitive impairment? *Psychother Psychosom*. 2005;74(5):295-302.
86. Bauer MS, Mitchner L. What is a "mood stabilizer"? An evidence-based response. *Am J Psychiatry*. 2004 Jan;161(1):3-18.
87. Amit BH, Weizman A. Antidepressant treatment for acute bipolar depression: an update. *Depress Res Treat*. 2011;2012:684725.
88. Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Maser J, Solomon DA, et al. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2002 Jun;59(6):530-7.

89. Valtonen HM, Suominen K, Haukka J, Mantere O, Leppamaki S, Arvilommi P, et al. Differences in incidence of suicide attempts during phases of bipolar I and II disorders. *Bipolar Disord*. 2008 Jul;10(5):588-96.
90. Altshuler LL, Post RM, Black DO, Keck PE, Jr., Nolen WA, Frye MA, et al. Subsyndromal depressive symptoms are associated with functional impairment in patients with bipolar disorder: results of a large, multisite study. *J Clin Psychiatry*. 2006 Oct;67(10):1551-60.
91. Perlis RH, Ostacher MJ, Patel JK, Marangell LB, Zhang H, Wisniewski SR, et al. Predictors of recurrence in bipolar disorder: primary outcomes from the Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder (STEP-BD). *Am J Psychiatry*. 2006 Feb;163(2):217-24.
92. Uzbay TI. Tianeptine: potential influences on neuroplasticity and novel pharmacological effects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 May 15;32(4):915-24.
93. Datla KP, Curzon G. Behavioural and neurochemical evidence for the decrease of brain extracellular 5-HT by the antidepressant drug tianeptine. *Neuropharmacology*. 1993 Sep;32(9):839-45.

94. Mocaer E, Rettori MC, Kamoun A. Pharmacological antidepressive effects and tianeptine-induced 5-HT uptake increase. *Clin Neuropharmacol.* 1988;11 Suppl 2:S32-42.
95. Guelfi JD, Dulcire C, Le Moine P, Tafani A. Clinical safety and efficacy of tianeptine in 1,858 depressed patients treated in general practice. *Neuropsychobiology.* 1992;25(3):140-8.
96. Kasper S, McEwen BS. Neurobiological and clinical effects of the antidepressant tianeptine. *CNS Drugs.* 2008;22(1):15-26.
97. Mennini T, Mocaer E, Garattini S. Tianeptine, a selective enhancer of serotonin uptake in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987 Nov;336(5):478-82.
98. Malagie I, Deslandes A, Gardier AM. Effects of acute and chronic tianeptine administration on serotonin outflow in rats: comparison with paroxetine by using in vivo microdialysis. *Eur J Pharmacol.* 2000 Sep 1;403(1-2):55-65.
99. Pineyro G, Deveault L, Blier P, Dennis T, de Montigny C. Effect of acute and prolonged tianeptine administration on the 5-HT transporter: electrophysiological, biochemical and radioligand binding studies in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995 Feb;351(2):111-8.

100. Magarinos AM, Deslandes A, McEwen BS. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol.* 1999 Apr 29;371(2-3):113-22.
101. Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23;98(22):12796-801.
102. Lucassen PJ, Fuchs E, Czeh B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry.* 2004 Apr 15;55(8):789-96.
103. Reagan LP, Hendry RM, Reznikov LR, Piroli GG, Wood GE, McEwen BS, et al. Tianeptine increases brain-derived neurotrophic factor expression in the rat amygdala. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jun 22;565(1-3):68-75.
104. Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 1990;35(4):245-96.
105. Manji HK, Quiroz JA, Sporn J, Payne JL, Denicoff K, N AG, et al. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry.* 2003 Apr 15;53(8):707-42.

106. Sanacora G, Rothman DL, Mason G, Krystal JH. Clinical studies implementing glutamate neurotransmission in mood disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Nov;1003:292-308.
107. Kole MH, Swan L, Fuchs E. The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational synapse in chronically stressed rats. *Eur J Neurosci.* 2002 Sep;16(5):807-16.
108. Svenningsson P, Tzavara ET, Carruthers R, Rachleff I, Wattler S, Nehls M, et al. Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science.* 2003 Nov 21;302(5649):1412-5.
109. Lowy MT, Gault L, Yamamoto BK. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem.* 1993 Nov;61(5):1957-60.
110. Lowy MT, Wittenberg L, Yamamoto BK. Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. *J Neurochem.* 1995 Jul;65(1):268-74.
111. Campbell AM, Park CR, Zoladz PR, Munoz C, Fleshner M, Diamond DM. Pre-training administration of tianeptine, but not propranolol, protects

hippocampus-dependent memory from being impaired by predator stress. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2008 Feb;18(2):87-98.

112. Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci.* 1996 Dec;110(6):1321-34.

113. Jaffard R, Mocaer E, Lebrun C, Beracochea D. [Effects of tianeptine on learning and memory in mice. Improvement of impairments induced by chronic alcoholism and brain aging]. *Presse Med.* 1991 Nov 14;20(37):1812-6.

114. Brink CB, Harvey BH, Brand L. Tianeptine: a novel atypical antidepressant that may provide new insights into the biomolecular basis of depression. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2006 Jan;1(1):29-41.

115. Ceyhan M, Kayir H, Uzbay IT. Investigation of the effects of tianeptine and fluoxetine on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *J Psychiatr Res.* 2005 Mar;39(2):191-6.

116. Uzbay TI, Kayir H, Ceyhan M. Effects of tianeptine on onset time of pentylenetetrazole-induced seizures in mice: possible role of adenosine A1 receptors. *Neuropsychopharmacology.* 2007 Feb;32(2):412-6.

117. Zoladz PR, Park CR, Munoz C, Fleshner M, Diamond DM. Tianeptine: an antidepressant with memory-protective properties. *Curr Neuropharmacol*. 2008 Dec;6(4):311-21.

118. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*. 1978 Nov;38(11 Pt 1):3751-7.

7. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS

7.1 Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies.

Artigo publicado na Revista Brain Research

Esse artigo é referente ao primeiro objetivo secundário desse trabalho. Neste estudo buscou-se estabelecer um modelo de diferenciação celular de uma linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y em células com características bioquímicas e morfológicas de neurônios dopaminérgicos. Dessa forma, desenvolveu-se um modelo experimental *in vitro* mais adequado para o estudo de doenças psiquiátricas e neurológicas.

Title page

Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson Disease studies

Fernanda Martins Lopes^{1,2}, Rafael Schröder¹, Mário Luiz Conte da Frota Júnior¹, Alfeu Zanotto-Filho¹, Carolina Beatriz Müller^{1,2}, André Simões Pires¹, Rosalva Thereza Meurer³, Gabriela Delevati Colpo^{2,4}, Daniel Pens Gelain¹, Flávio Kapczinski^{2,4}, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Marilda da Cruz Fernandes³, Fabio Klamt^{1,2*}.

1Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil; 2National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre/RS, Brazil; 3Laboratory of Pathology Research, UFCSPA, Porto Alegre/RS, Brazil, 4Molecular Psychiatry Laboratory, HCPA/UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil.

Text: 31 pages; Tables: 0 ; Illustrations: 5

*Correspondence to: Prof. Fábio Klamt, Ph.D. Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Ramiro Barcelos, 2600. Porto Alegre (RS), Brazil. 90035-003, +55 51 3308-5577. E-mail: 00025267@ufrgs.br

ABSTRACT

The molecular mechanisms underlying the cellular loss found in the nigrostriatal pathway during the progression of Parkinson's disease (PD) are not completely understood. Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y challenged with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) has been widely used as an in vitro model for PD. Although this cell line differentiates to dopaminergic neuron-like cells in response to low serum and retinoic acid (RA) treatment, there are few studies investigating the differences between proliferative and RA-differentiated SH-SY5Y. Here we evaluate morphological and biochemical changes which occurs during the differentiation of SH-SY5Y cells, and their responsiveness to 6-OHDA toxicity. Exponentially growing SH-SY5Y cells were maintained with DMEM/F12 medium plus 10% of fetal bovine serum (FBS). Differentiation was triggered by the combination of 10 μ M RA plus 1% of FBS during 4, 7 and 10 days in culture. We found that SH-SY5Y cells differentiated for 7 days show an increase immunocontent of several relevant neuronal markers with the concomitant decrease in non-differentiated cell marker. Moreover, cells became two-fold more sensitive to 6-OHDA toxicity during the differentiation process. Time course experiments showed loss of mitochondrial membrane potential triggered by 6-OHDA (mitochondrial dysfunction parameter), which firstly occurs in proliferative than neuron-like differentiated cells. This finding could be related to the increase in the immunocontent of the neuroprotective protein DJ-1 during differentiation. Our data suggest that SH-SY5Y cells differentiated by 7 days with the protocol described here represent a more suitable experimental model for studying the molecular and cellular mechanisms underlying the pathophysiology of PD.

Key words: Parkinson Disease, 6-hydroxydopamine, DJ-1

1. Introduction

Parkinson disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders, affecting about 2% of the population over the age of 60 (Lo Bianco et al., 2004). This chronic disturb causes severe motor dysfunction, such as bradykinesia, resting tremor, rigidity, postural instability, and also affects autonomic function and cognition (Poewe, 2008; Lesage and Brice, 2009). Pathologically, it is associated with the profound loss of dopamine-producing neurons in the substantia nigra pars compacta and the presence of Lewy bodies in affected regions of the central nervous system (Schapira, 2008). Although several factors, including mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis have been suggested to contribute to cell death in PD, its etiology remains unknown (Prabhakara et al., 2008).

6-hydroxydopamine (6-OHDA) is the most used toxin in experimental models of PD (Gomes-Lazaro et al., 2008; Ikeda et al., 2008; Mu et al., 2009). Because this neurotoxin has similar structure to dopamine, it shows high affinity for the dopamine transporter and for this reason selectively destroys dopaminergic/catecholaminergic neurons (Lehmensiek et al., 2006). Once inside the neuron, 6-OHDA accumulates and undergoes no enzymatic auto-oxidation, promoting free radical formation (Bladini et al., 2008). The inhibitory effect over complex I activity in mitochondria also accounts for the described mechanism of reactive oxygen species (ROS) generation by this neurotoxin (Lehmensiek et al., 2006; Inden et al., 2006; Chin et al., 2008). Moreover, 6-OHDA induces cell death

of human neuroblastoma SH-SY5Y (Jordan et al., 2004) and mouse pheochromocytoma PC12 cell lines (Nie et al., 2002) and selectively kills tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactive neurons in substantia nigra and striatum in animal models of intranigral-administration (Inden et al., 2006).

Exponentially growing SH-SY5Y cells treated with 6-OHDA are often used as an in vitro model for PD (Hwang et al., 2008; Lev et al., 2008). This cell line is a human catecholaminergic neuroblastoma derived from SK-N-SH, which resembles immature sympathetic neuroblasts in culture (Biedler et al., 1978). These cells are typically locked in an early neuronal differentiation stage, characterized biochemically by the low presence of neuronal markers (Biedler et al., 1978; Gilany et al., 2008). In this regard, the proliferative SH-SY5Y cells do not represent a suitable experimental model for studying the molecular and cellular mechanisms underlying the pathophysiology of PD, a disease that affects primarily differentiated dopaminergic neurons (Schapira, 2008).

In spite of that, many lines of evidence have indicated that human neuroblastoma SH-SY5Y cells are able to acquire neuron-like phenotypes with neurite outgrowth and branches by all-trans-retinoic acid (RA) treatment (Pahlman et al., 1984; Miloso et al., 2004). RA is essential in embryonic development and maintenance of growth and differentiation of epithelial, fibroblastic and myelomonocytic cells (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Hence, RA controls cellular differentiation processes by modulating the expression of several RA-responsive genes by the activation of retinoic acid/retinoid nuclear receptors (Mark et al., 2006). In vitro, RA also plays a role in regulating transition from the proliferating precursor cell to post-mitotic differentiated cell (López-Carballo et al.,

2002). Although some previous reports have addressed the RA-differentiation process in SH-SY5Y cells (López-Carballo et al., 2002; Savickiene et al., 2009), there are few studies that compare the changes in neuronal markers in SH-SY5Y cells undergoing the differentiation process, and their cellular response to 6-OHDA (Cheung et al., 2009).

Here we evaluate morphological, biochemical and cytotoxic parameters related to human neuroblastoma SH-SY5Y cells differentiated by RA treatment and challenged with 6-OHDA. Our results suggest that SH-SY5Y cells differentiated by 7 days with 1% FBS and RA represent a more suitable experimental model for studying the molecular and cellular mechanisms underlying the pathophysiology of PD.

2. Results

2.1 Cell morphology analysis

To demonstrate that SH-SY5Y cells can be differentiated to a neuronal-like phenotype with the combination of lowering fetal bovine serum (FBS) and RA treatment, we first analyzed changes in cell morphology. We observed a complete decrease in cellular proliferation rate (data not shown) and the induction of extensive neurites outgrowth by the differentiation protocol of SH-SY5Y cells (Fig. 1). This change in morphology was observed as early as 24 h of treatment. No further differences were observed during the differentiation process (4, 7 and 10 days). Exponentially growing cells maintained a typical epithelial morphology (Fig. 1A). Figure 1B shows a representative image of SH-SY5Y cells over 7 days of differentiation.

2.2 Western blot and immunocytochemistry

Changes in specific neuronal and non-differentiated cell markers during the differentiation process were evaluated by western Blot immunoassay. A significant increase in the immunocontent of the neuronal markers TH, neuron specific enolase (NSE) and neuronal nuclei protein (NeuN) in differentiated cells (4, 7 and 10 days of differentiation) as compared to proliferative cells (representative western blots in Fig. 2A, and respective densitometry analysis in Fig. 2B) were found. On the other hand, a significant decrease in the non-differentiated marker nestin was observed only in 7 and 10 days of differentiation (Fig. 2). Based on these data, we re-evaluate the differentiation cells markers through immunocytochemistry and western blot analysis in proliferative and 7- day- RA-differentiated SH-SY5Y cells (Fig. 3). These data confirmed that only 7-day-RA-differentiated cells expressed TH, NSE and NeuN, with the concomitant decrease in nestin immunocontent (Fig. 3). Insert boxes show the intense cytosolic immunoreactivities of NSE and TH in differentiated cells and nestin in proliferative cells, and nuclear immunoreactivity of NeuN in differentiated cells (Fig. 3A).

2.3 6-OHDA cytotoxicity

After exploring the differences between proliferative and RA-differentiated SH-SY5Y cells, we examined their susceptibility to 6-OHDA. Proliferative and differentiated SH-SY5Y cells were exposed to different 6-OHDA concentrations for 24 h and drug neurotoxicity was assessed. To establish the optimal experimental dosage, we first plotted a dose-response curve (Fig. 4A). The RA-differentiated

cells are more susceptible to this neurotoxin. However, in 4 days of differentiation, the drug GI50 value is not distinct from proliferative cells. Only in 7 and 10 days of RA-differentiation, the drug GI50 value had a significant decrease (i.e.: increased sensitivity) compared to proliferative cells. Based on these data, we next decided to run the ensuing experiments using 35 or 15 μ M 6-OHDA in proliferative and in cells with 7 days of differentiation, respectively, which were the drug concentration that reduced cell viability about 50% (drug GI50 value).

2.4 Mitochondrial membrane potential and DJ-1 immuncontent

6-OHDA treatments induce loss of mitochondrial membrane potential in both proliferative and differentiated SH-SY5Y cells. Interestingly, even though the proliferative cells are more resistant to this neurotoxin (higher GI50 value), time course experiments showed that mitochondrial depolarization firstly occur in proliferative than neuron-like differentiated cells challenged with 6-OHDA (3 and 6 hours of treatment, respectively) (Fig. 5A). In order to further investigate the molecular mechanism involved in the delay in mitochondria depolarization found in differentiated cells, we examined the levels of the neuroprotective protein DJ-1 in both experimental groups. We found an increase in DJ-1 levels during the differentiation process. To confirm these data, we performed another western blot in proliferative and 7-days-RA-differentiated SH-SY5Y cells. Differentiated cells expressed significantly higher amount of this neuroprotective protein (Fig. 5B).

3. Discussion

The etiology of Parkinson disease is still not fully understood, but genetic analyses, epidemiologic studies and development of new in vitro experimental models of PD will potentially provide important new insights into the pathogenesis of PD (Dawson and Dawson, 2003). While primary rat midbrain cell cultures have been widely used to study the biochemical cascades involved in PD, they are not derived from human source and they present only 6 - 15% TH-positive neuronal cells (Liu et al., 2008), which limits the translation of potential findings into the pathophysiology of PD. Due to the difficulty to find a suitable and accessible model for PD, exponentially growing human neuroblastoma or rat pheochromocytoma cell lines (e.g.: SH-SY5Y and PC12) are often used to study the idiopathic PD with respect to neurochemical parameters (Lee et al., 2002; Gomez-Lazaro et al., 2008). However, these cell lines are tumor cells, so that they have oncogenic and mitogenic properties (Biedler et al., 1978).

The novel findings presented here are that the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line differentiates into a dopaminergic neuron-like by the combination of lowering the FBS to 1% and 10 μ M RA treatment for 7 days, leading to the acquisition of all desired morphological and biochemical characteristics of an in vitro cellular model to study PD. Moreover, during the differentiation process this cell line presents an increase in DJ-1 protein immunoccontent, a neuroprotective protein that has been extensively related to an early onset of PD.

Even though the differentiation properties of retinoic acid over human neuroblastoma cell line SH-SY5Y have been widely investigated (Miloso et al., 2004; Guarnieri et al., 2009), few works focused these features to be used as an in

vitro model for PD research (Tieu et al., 1999; Cheung et al.; 2009). To address whether RA-differentiated SH-SY5Y cells are functionally mature, our study showed the detailed characteristics of proliferative and RA-differentiated SH-SY5Y through the immunoreactivity of several neuronal markers, cellular morphology and response to 6-OHDA treatment.

We observed an increase of the neuronal markers TH, NSE and NeuN, starting at 4 days of RA-dependent differentiation process. TH, a classical dopaminergic cell marker, has low immunoccontent and is not active in proliferative SH-SY5Y cells. TH is the rate-limiting enzyme in catecholamine synthesis, hence, these cells do not secrete dopamine (Biedler et al., 1978; Seitz et al., 2000). RA treatment induces TH expression and activates phosphatase 2A, which dephosphorylates and activates TH, turning them into dopamine-producing cells (Pahlman et al., 1984; Dunkley et al., 2004; Prabhakara et al., 2009). Therefore, our findings are in agreement to these data. However, this subject is still controversial since there are few studies showing the expression of dopaminergic cells markers in proliferative cells (Cheung et al., 2009; Guarnieri et al., 2009). Therefore, another neuronal marker studied here was NSE. The differentiation protocol causes an increase of NSE immunoccontent and its activity, reinforcing that RA-differentiated SH-SY5Y cells acquired a more neuronal phenotype (Pahlmann et al., 1984; Cheung et al., 2009). Moreover, we also observed an increase in NeuN, which is only expressed in neurons upon maturation, and therefore served as a neuronal marker (Weyer and Shilling, 2003 Cheung et al., 2009). Although we found an increase in the immunoccontent of all these neuronal markers as early as 4 days of differentiation, there is an equal amount of nestin

protein in proliferative and in 4 days differentiated SH-SY5Y cells. After 7 days of RA differentiation, the expression of nestin decreases significantly, keeping this behavior through 10 days of treatment. Nestin, an intermediate filament, is expressed in a cell-cycle-dependent manner. Nestin is down-regulated as neuroepithelial stem cells cease division and differentiate along their respective neuronal lineages (Hockfield and McKay, 1985; Fuchs and Weber, 1994; Thomas et al., 2004).

Immunocytochemistry assay confirmed the changes in the immunocontent of the cells markers. We detected immunoreactivity of NSE and TH in cytoplasm of RA-differentiated cells and the NeuN immunoreactivity was verified in the nuclear compartment. On the other hand, nestin immunoreactivity was found in the cytoplasm of proliferative cells. Our data are not in agreement with a previous study that showed immunoreactivity of NSE and TH in both cytoplasm and nucleus (Cheung et al., 2009). In spite of that, there are few studies showing that these are cytosolic proteins (Odelstad et al., 1981; Dunkley et al., 2004).

As previously shown, SH-SY5Y cells must be differentiated in vitro at least 7 days to show mature excitability, action potential propagation and formation of synaptic vesicles (Sarkanen et al., 2007, Cheung et al., 2009). These data are in agreement with our findings. Therefore, our study confronts previous data that suggested there are limited changes in dopaminergic markers immunocontent after RA differentiation (Cheung et al., 2009).

After characterizing the differences between these experimental models, we analyzed their responsiveness to 6-OHDA. Proliferative and 4-day-RA-differentiated SH-SY5Y cells responded equally to this neurotoxin. In 7 and 10

days of differentiation, we found an increased sensitivity to this neurotoxin. The only dramatic difference between 4-, 7- and 10-day-RA-differentiated cells found here was in nestin immunoccontent. Previous studies showed that the reduction of nestin expression by siRNA resulted in clearly vulnerability to oxidant-induced (H₂O₂) cell death in neuronal progenitors (Sahlgren et al., 2006). Furthermore, this protein has been associated with tumor aggressiveness (Weggen et al., 1997), and downregulation of nestin in neurons activates Cdk5/p35-dependent apoptosis, suggesting that nestin serves as a survival factor, protecting neuronal progenitors from stress-induced cell death (Thomas et al., 2004; Reimer et al., 2009). So that, the role of nestin in the resistance to 6-OHDA remains to be described.

In contrast to our data, there are studies showing that RA-differentiated SH-SY5Y cells are more resistant to neurotoxins like 6-OHDA (Tieu et al., 1999; Cheung et al., 2009). Tieu et al. showed that RA-differentiated SH-SY5Y cells decreased p53 protein (proapoptotic), thus resulting in vulnerability to 6-OHDA. They discuss this data based on both proliferative and RA-differentiated SH-SY5Y cells have an inactive p53, which is sequestered in the cytoplasm (Moll et al., 1995). Nevertheless, another study verified that transcriptional active p53 is found in the nucleus of RA-differentiated cells (Chen et al., 2007). Hence, the association between p53 and neurotoxin resistance suggested by this study is not known. Moreover, Cheung et al. also showed that RA-differentiated SH-SY5Y cells are less susceptible to the 6-OHDA cytotoxicity, probably because of the up-regulation of the survival signaling pathways, including the increase of Akt and Erk1/2 expression. Based on these, they suggest that the best experimental model for

study PD is proliferative cell. The data present here support the opposite conclusion.

Even though proliferative cells present a two-fold higher GI50 value for 6-OHDA, time course experiments showed that mitochondrial depolarization, a marker of organelle dysfunction, firstly occurs in proliferative (3 hours) than in neuron-like differentiated cells (6 hours) once challenged with 6-OHDA. These data are in agreement with another study that showed a collapse of the mitochondrial membrane potential in proliferative SH-SY5Y cells rapidly after 6-OHDA treatment (Ikeda et al., 2008). This study also showed that 6-OHDA induces the formation of intracellular reactive oxygen species (ROS). The resultant oxidative stress triggers the activation of the p38 MAPK cascade, leading to the lost of $\Delta\Psi_m$ and cytochrome c release, which results in caspase 9 and 3-dependent apoptosis. On the other hand, there is no data showing the effect of 6-OHDA in mitochondrial dysfunction in RA-differentiated cells.

Differences in mitochondria depolarization kinetics triggered by 6-OHDA suggest that differentiated cells present an extra mitoprotective feature against this neurotoxin. This finding could be related to the significant increase in the levels of the protein DJ-1 during differentiation treatment found here. DJ-1 protein belongs to the DJ-1/ThiJ/PfpI superfamily of proteins, which are conserved in many different organisms (Mizote et al. 1999). Mutations in this protein have been strongly related to an early onset of PD (Bonifati et al., 2003). It was demonstrated that the expression of DJ-1 can be induced by ROS (Sekito et al., 2006), and their mutant forms make the neuron more susceptible to the cell death induced by oxidative stress (Xu et al., 2005; Miyazaki et al., 2008). DJ-1 is exclusive cytosolic,

however, upon oxidative damage this protein translocates to the mitochondria (Zhang et al., 2005). So, DJ-1 plays a role in mitochondrial maintenance (Zhong and Xu, 2008). Hence, the expression of this protein protects the mitochondria of differentiated cells from the 6-OHDA toxicity and delays mitochondria depolarization (REF), but the neuroprotective mechanism of DJ-1 over the mitochondria remains to be described. Furthermore, previous studies showed the increase of Akt in RA-differentiated cells (Lopez-Carballo et al., 2002; Cheung et al., 2009). Cheung et al. associated the increase of Akt immunoccontent with the resistance to 6-OHDA in differentiated cells. Since it is known that DJ-1 can activate Akt (Clements et al., 2006), this mechanism could be related to the delay in mitochondria depolarization found here in differentiated cells challenged with 6-OHDA. More studies are necessary to explore the role of DJ-1/Akt in 6-OHDA-induced neuronal dysfunction.

Hence, our data suggest that 7-day-RA-differentiated form of SH-SY5Y cells represents a more suitable experimental model for studying the molecular and cellular mechanisms underlying the pathophysiology of PD.

4. Experimental Procedure

4.1 Reagents

Materials used in cell culture were acquired from Gibco®/Invitrogen (São Paulo, SP Brazil). Chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

4.2 Cell culture and differentiation

Exponential growing human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, obtained from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained in a mixture 1:1 of Ham's F12 and Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM of glutamine, 0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of gentamicin and 250 μg of amphotericin B, in a humidified atmosphere of 5% of CO_2 in air at 37 $^\circ\text{C}$. Cell medium were replaced each three days and the cells were sub-cultured once they reached 90% confluence. All treatments were performed when cells were ~75% confluence. For the immunocytochemistry, MTT assay and JC-1 fluorescence, the cells were plated in a 24-well plated at density of 6×10^4 cells per well. For western blot analysis, the cells were seeded into bottles of 75 cm^3 at density of 5×10^6 cells. After 24 hours of cell plating, differentiation was induced by lowering the FBS in culture medium to 1% plus RA at 10 μM during 4, 7 and 10 days. This treatment was replaced each 3 days to replenish RA in culture media. Hence we choose these specific days of differentiation because these are the days of retinoic acid replacement in the culture medium. To evaluate the differences in cell morphology in proliferative and cells differentiated for 4, 7 and 10 days, we analyzed them under phase contrast light microscopy. Images were captured with NIS-elements software.

4.3 Western blot

After 24 hours plating (proliferative cell) or after the differentiation treatment, cells were washed with PBS and resuspended in a Tris-buffer (pH 7.0) with protease inhibitor (Roche®), sonicated, and its total protein extracts (20 μg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE) and then transferred onto a PVDF membrane. Thereafter, nonspecific binding was blocked with 5% of BSA in TTBS for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-TH (1:5000) from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), rabbit anti-NSE (1:20000), rabbit anti-nestin (1:5000), mouse anti- NeuN (1:1000) or mouse anti-DJ-1 (1:10000) from Chemicon/Millipore® (Billerica, MO, USA). After washing, the membrane was incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000 or 1:10000) from Dako® (Glostrup, DK) for 2 hours at room temperature. Bands were visualized with Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate from PIERCE® (Rockford, IL, USA). Membranes were then stripped and reprobbed with rabbit anti- β -actin antibody (1:5000) from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) followed by goat anti-rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000) from Dako® (Glostrup, DK).

4.4 Immunocytochemistry

Cells were washed twice with PBS to remove the excess of culture medium followed by the fixation in acetone:methanol (1:1 v/v) for 20 minutes. The endogenous peroxidase was inhibited by methanol:hydrogen peroxide (95:5% v/v). Non-specific binding were blocked with 1% BSA in PBS-Triton-X100 for 1 hour. Cells were incubated with the rabbit anti-TH (1:500), rabbit anti-NSE (1:2000), rabbit anti-nestin (1:500) and mouse anti-NeuN antibodies overnight at 4 °C. After washing the cells with PBS/ 0.02% Triton-X100, they were incubated with biotinylated secondary antibody for 1 hour at room temperature followed by the incubation of tertiary antibody linked with horseradish peroxidase-streptavidin

complex. The color reaction is constituted by 0.06% of diaminobenzidine (DAB) and 1% of hydrogen peroxide in PBS. The cells were covered in this solution for 5 minutes at room temperature. Images were visualized under light microscopy and captured NIS-elements software.

4.5 6-OHDA cytotoxicity

6-OHDA was freshly prepared in 0.1% ascorbic acid to avoid oxidation. Cytotoxicity of 6-OHDA were evaluated by exposing cells to different concentrations of this neurotoxin for 24 hours at 37 °C, and cell viability was estimated by the quantification of the 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction to a blue formazan product by cellular dehydrogenases (Fang et al., 2005). At the end of the treatments, the medium was discarded and a new medium containing 0.5 mg/mL MTT was added. These cells were incubated for 1 hour at 37 °C. This medium was discarded after the incubation and the cells were washed three times with PBS. DMSO was added to solubilize the formazan crystals for 30 minutes. Absorbance was determined at 560 nm and 630 nm in a SoftMax Pro Microplate Reader (Molecular Devices®, USA).

4.6 Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

Proliferative and 7-day-RA-differentiated SH-SY5Y cells were treated by different time with their correspondent GI50 value of 6-OHDA (35 and 15 μ M, respectively) to evaluate the mitochondrial depolarization, as previously described (Klamt and Shacter, 2005). Cells (0.5×10^6 cells/mL) were incubated for 20

minutes at 37 °C with 10 µg/µL of a lipophilic cationic probe 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1), centrifuged, washed once with PBS, transferred to a 96-well plate (105 cells/well), and assayed using SoftMax Pro fluorescence plate reader (Molecular Devices®, USA) with the following settings: excitation at 485 nm, emission at 540 and 590 nm, and cut-off at 530 nm. $\Delta\Psi_m$ was estimated using the ratio of 590 nm (J-aggregates)/540 nm (monomeric form).

4.7 Protein quantification

The proteins contents were measured by the Bradford assay (Bradford, 1976).

4.8 Statistical analysis

Band intensities of western blots were quantified by a densitometer and expressed as relative values to the controls. Data are expressed as means \pm SD from at least three independent experiments. For statistical analysis, quantitative data were analyzed by student t test and the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Neuman-Keuls test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Brazilians funds MCT/CNPq Universal (476114/2008-0), FINEP/IBN-Net (01060842-00) and MCT/CNPq INCT-TM (573671/2008-7).

Figura 1

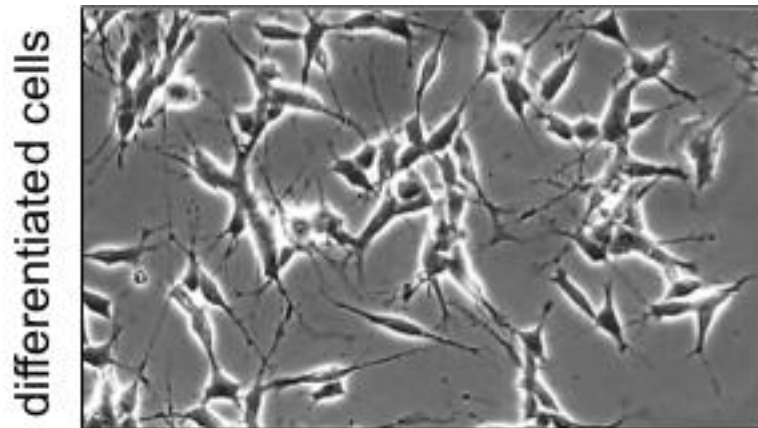
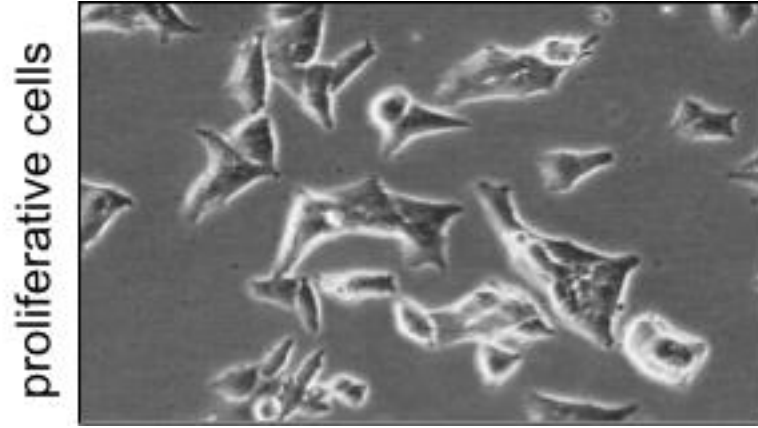


Figura 2

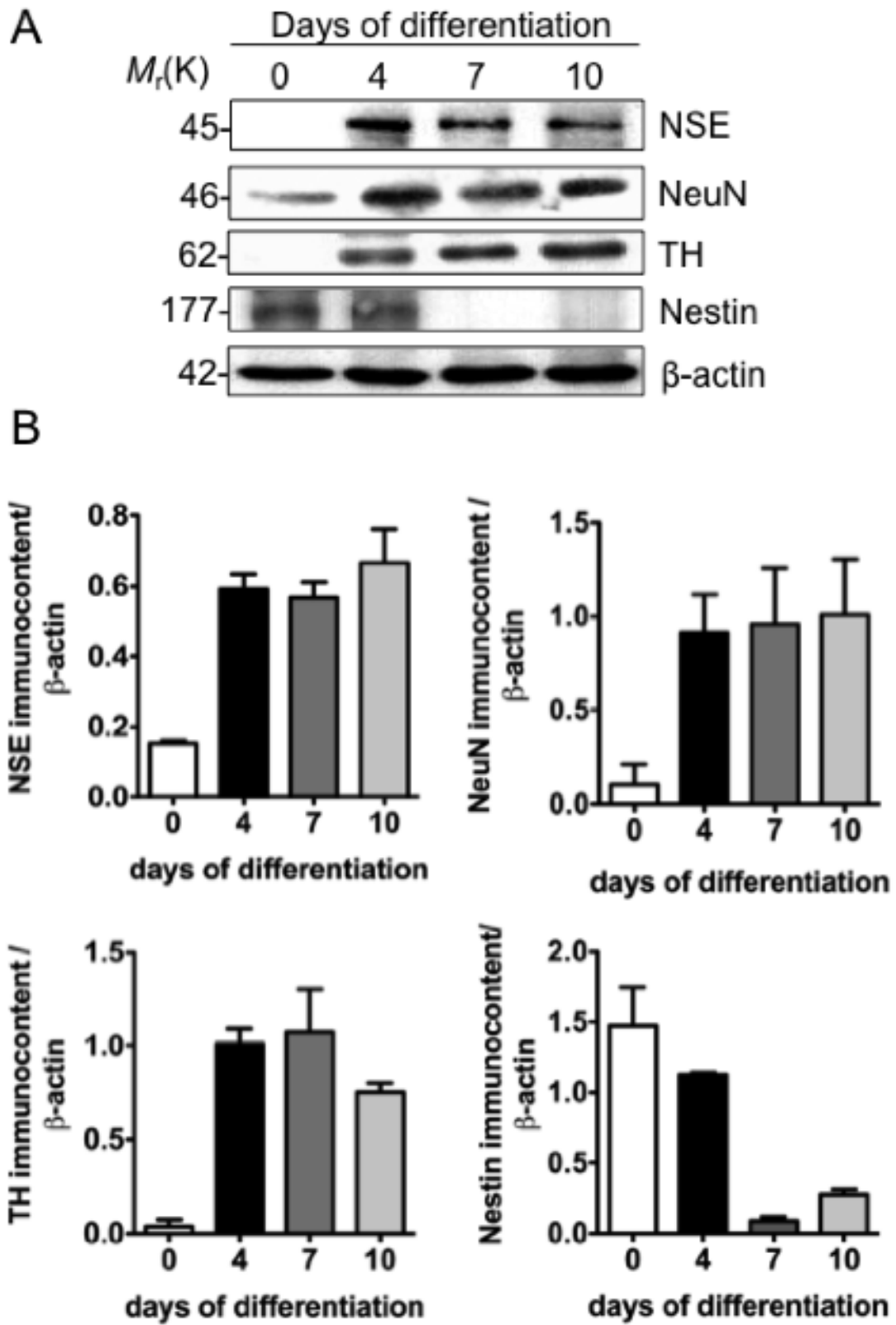


Figura 3

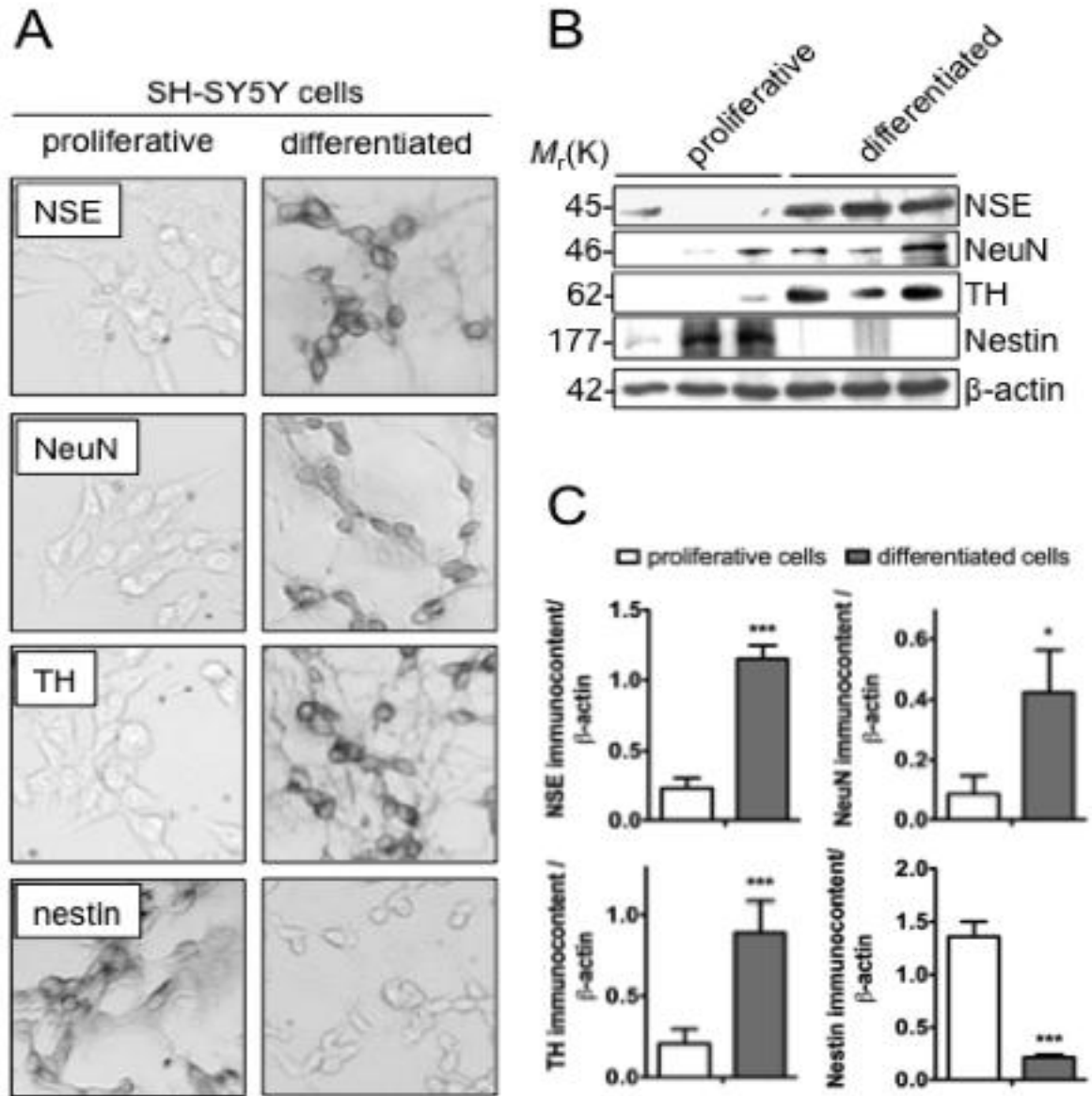
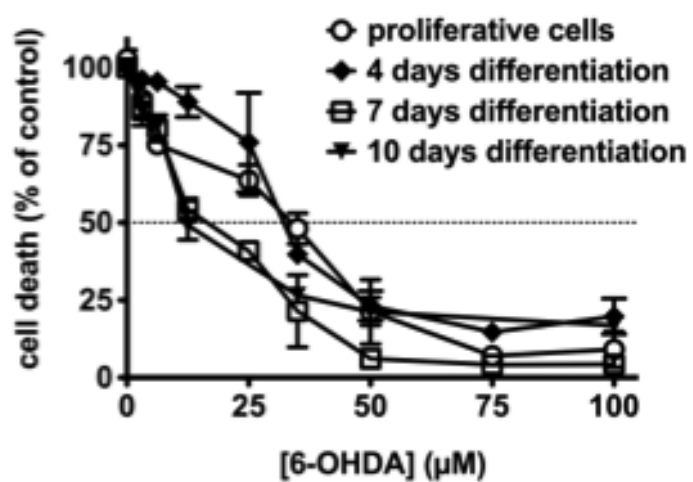


Figura 4

A



B

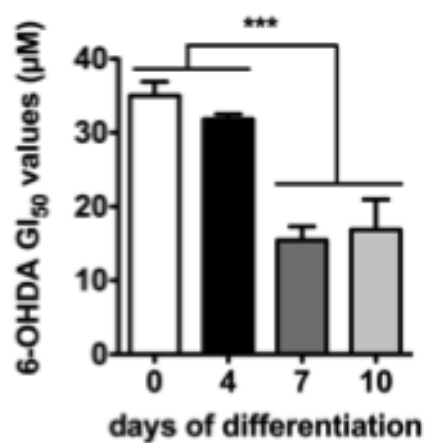
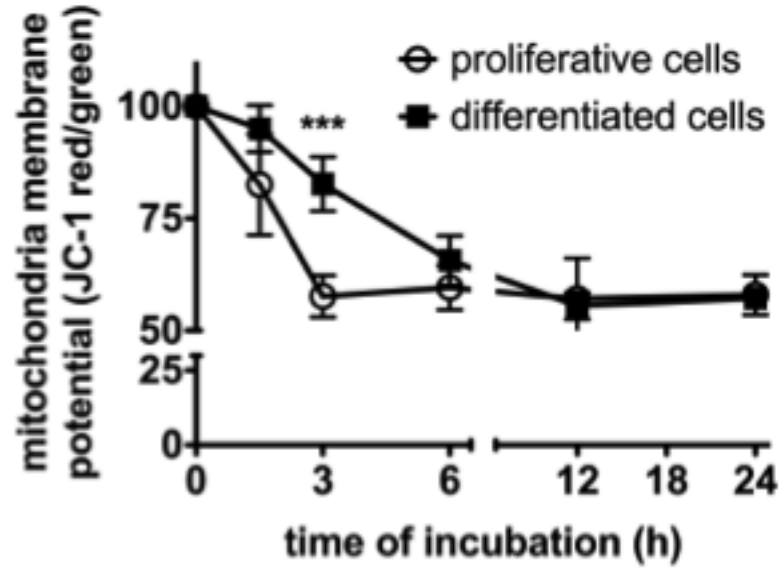
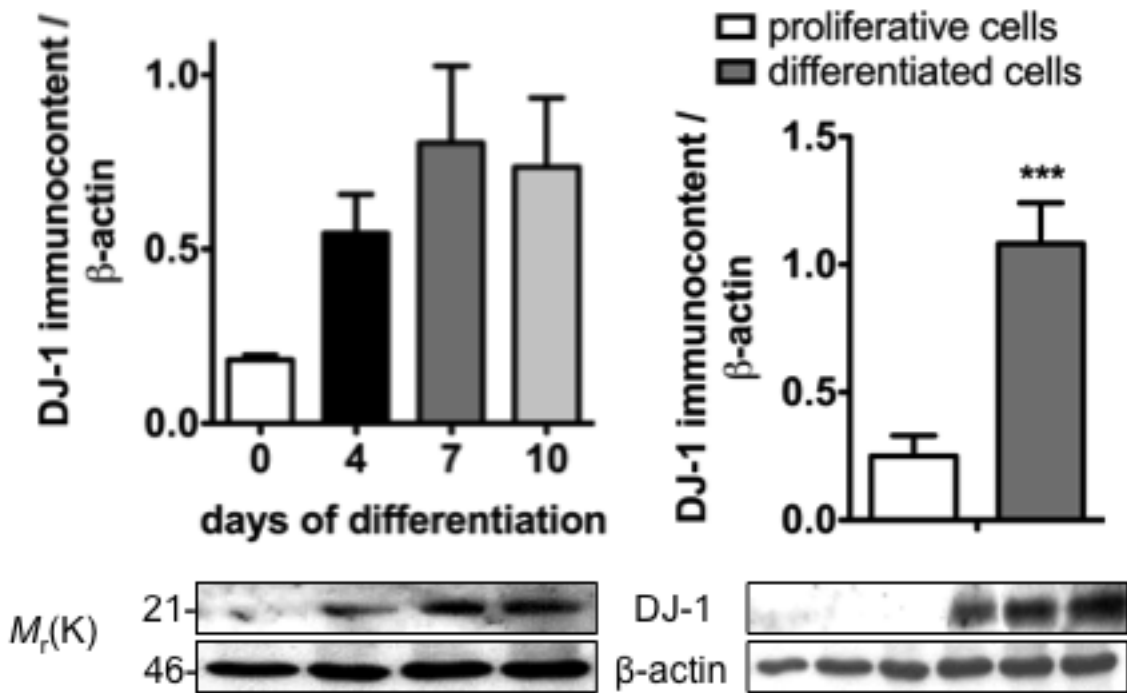


Figura 5

A



B



FIGURES LEGEND

Fig. 1. Morphological parameter of human neuroblastoma SH-SY5Y cells differentiated with retinoic acid. Representative phase contrast images of proliferative SH-SY5Y cells in culture medium with 10% of FBS (A). Representative phase contrast images of RA-differentiated human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cultured for 7 days with 10 μ M RA in culture medium with 1% of FBS (B). Note the stellate morphology and the abundance of neurites in differentiated cells (400X magnification).

Fig. 2. Changes in the immunocontent of selected neuronal and non-differentiated cell markers in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y during 4, 7 and 10 days of differentiation. A) Representative immunoblots of the neuronal markers neuron-specific enolase (NSE), neuronal nuclei protein (NeuN) and tyrosine hydroxylase (TH) and the non-differentiated marker nestin. B) Densitometric analysis of bands representing means \pm SD of three independent experiments. β -actin was used as loading control, as described in experimental procedure section. ***Statistically different from the corresponding control values, $p < .001$ (one-way analysis of variance)

Fig. 3. Immunocytochemistry and Western blot analysis of selected neuronal and non-differentiated cell markers in proliferative and 7-days-differentiated human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. (A) Representative immunocytochemistry images and B) western blots showing the immunocontent in triplicates of neuronal and non-differentiated markers. C) Densitometric analysis of bands representing

means \pm SD of three independent experiments. β -actin was used as loading control, as described in experimental procedure section. *Statistically different from the corresponding control values, $p < .05$; *** $p < .001$ (student t test).

Fig. 4. Differences in sensitivity of proliferative and differentiated human neuroblastoma cell line SH-SY5Y to the 6-OHDA neurotoxin. Cells were treated with different concentrations of 6-OHDA for 24 h, and the drug cytotoxicity was evaluated using the MTT assay, as described in experimental procedure section. A) Cytotoxicity curves for 6-OHDA. (B) GI50 value for 6-OHDA obtained during the different days of differentiation. The data represent means \pm SD for three experiments carried out in quadruplicates. ***Statistically different from the corresponding control values, $p < .001$ (one-way analysis of variance).

Fig. 5. Loss of membrane potential in proliferative and differentiated cells of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y challenged with 6-OHDA and the DJ-1 protein immunocontent. A) Cell were treated with respective 6-OHDA GI50 value, harvested and incubated with JC1 (10 μ g/mL) at 37 $^{\circ}$ C for 15 min. The data represent means \pm SD for three experiments carried out in quadruplicate. ***Statistically different from the corresponding control values, $p < .001$ (one-way analysis of variance). B) DJ-1 immunocontent of proliferative and 7-days differentiated SH-SY5Y cells. The figure represents immunoblots showing representative high DJ-1 expression in differentiation cells. The graph shows the quantification of DJ-1 immunocontent. ***Statistically different from the corresponding control values, $p < .001$ (one-way analysis of variance) B)

Densitometric analysis of DJ-1 immunocontent bands representing means \pm SD of three independent experiments. β -actin was used as loading control, as described in experimental procedure section. ***Statistically different from the corresponding control values, $p < .001$ (one-way analysis of variance / student t test).

REFERENCES

Bastien, J., Rochette-Egly, C., 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*. 328, 1–16.

Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L.S., 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*. 38, 3751–3757.

Bladini, F., Armentero, M.T., Martignoni, E., 2008. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord*. 14, 124-129.

Bonifati, V., Rizzu, P., Squitieri, F., Krieger, E., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., van Duijn, C.M., Oostra, B., Meco, G., Heutink, P., 2003. Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science*, 299, 256 – 259.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-54.

Chen, L., Malcolm, A.J., Wood, K.M., Cole, M., Variendm S., Cullinane, C., Pearson, A.D.J., Lunec, J., Tweddle, D.A., 2007. p53 is nuclear and functional in both undifferentiated and differentiated neuroblastoma. *Cell cycle*. 6, 2685-2696.

Cheung, Y.T., Lau, W.K., Yu, M.S., Lai, C.S., Yeung, S.C., So, K.F., Chang, R.C., 2009. Effect of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. 30, 127-135.

Chin, M.H., Qian, W.J., Wang, H., Petryuk, V.A., Bloom, J.S., Sforza, D.M., Lacán, G., Liu, D., Khan, A.H., Cantor, R.M., Bigelow, D.J., Melega, W.P., Camp, D.G. 2nd, Smith, R.D., Smith, D.J., 2008. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis revealed by proteomic and transcriptomic analyses of the striata in two mouse models of Parkinson's disease. *J Proteome Res*. 7, 666-677.

Clements, C.M., McNally, R.S., Conti, B.J., Mak, T.W., Ting, J.P., 2006. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, 15091–15096.

Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2003. Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Science*. 302, 819 – 821.

Dunkley, P.R., Bobrovskaya, L., Graham, M.E., von Nagy-Felsobuki, E.I., Dickson, P.W., 2004. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem*. 91, 1025-43.

Fang, F., Wang, A.P., Yang, S.F., 2005. Antitumor activity of a novel recombinant mutant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Acta pharmacol Sin*. 26, 1373-1381.

Fuchs, E., Weber, K.. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 63, 345–382.

Gilany, K., Elzen, R.V., Mous, K., Coen, E., Dongen, W.V., Vandamme, S., Gevaert, K., Timmerman, E., Vandekerckhove, J., Dewilde, S., Ostade, X.V., Moens, L. 2008. The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: An enlarged proteome. *Biochim Biophys Acta.* 1784, 983-985.

Gomez-Lazaro, M., Bonekamp, N.A., Galindo, M.F., Jordan, J., Schrader, M., 2008. 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med.* 11, 1690-1699.

Guarnieri, S., Pilla, R., Morabito, C., Sacchetti, S., Mancinelli, R., Fano, G., Mariggìò, M.A., 2009. Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Dev Neurosci.* 27, 135-147.

Hockfield, S., McKay, R.D., 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 5, 3310–3328.

Hwang, Y.P., Jeong, H.G., 2008. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic

neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. *FEBS Lett.* 17, 2655-2662.

Inden, M., Taira, T., Kitamura, Y., Yanagida, T., Tsuchiya, D., Takata, K., Yanagisawa, D., Nishimura, K., Taniguchi, T., Kiso, Y., Yoshimoto, K., Agatsuma, T., Koide-Yoshida, S., Iguchi-Ariga, S.M., Shimohama, S., Ariga, H., 2006. PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiol Dis.* 24, 144-158.

Ikeda, Y., Tsuji, S., Satoh, A., Ishikura, M., Shirasawa, T., Shimizu, T., 2008. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 107, 1730-1740.

Klamt, F., Schacter, E., 2005. Taurine Chloramine, an Oxidant Derived from Neutrophils, Induces Apoptosis in Human B Lymphoma Cells through Mitochondrial Damage. *J Biol Chem.* 280, 21346-21352.

Jordan, J., Galindo, M.F., Tornero, D., Gonzalez-Garcia, C., Cena, V., 2004. Bcl-x L blocks mitochondrial multiple conductance channel activation and inhibits 6-OHDA-induced death in SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 89, 124-133.

Lee, C.S., Han, J.H., Jang, Y.Y., Song, J.H., Han, E.S., 2002. Differential Effect of Catecholamines and MPP on Membrane Permeability in Brain Mitochondria and Cell Viability in PC12 Cells. *Neurochem Int.* 40, 361 – 369.

Lehmensiek, V., Tan, E.M., Liebau, S., Lenk, T., Zettlmeisl, H., Schwarz, J., Storch, A., 2006. Dopamine Transporter-Mediated Cytotoxicity of 6-Hydroxydopamine In Vitro Depends on Expression of Mutant α -Synucleins Related to Parkinson's Disease. *Neurochem Int.* 48, 329 – 340.

Lesage, S., Brice, A., 2009. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet.* 18, 48-50.

Lev, N., Ickowicz, D., Melamed, E., Offen, D., 2008. Oxidative insults induce DJ-1 upregulation and redistribution: Implications for neuroprotection. *Neurotoxicology.* 29, 397-405.

Liu, F., Nguyen, J.L., Hulleman, J.D., Li, L., Rochet, J.C., 2008. Mechanisms of DJ-1 neuroprotection in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* (In press).

Lo Bianco, C., Schneider, B.L., Bauer, M., Sajadi, A., Brice, A., Iwatsubo, T., Aebischer, P., 2004. Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an α -synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad of Sci USA.* 101, 17 510–17 515.

López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P., Baretino, D., 2002. Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic

Acid Is Required for Neural Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *J Biol Chem.* 28, 25297-25304.

Mark, M., Ghyselinck, N.B., Chambon, P., 2006. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev of Pharmacol Toxicol.* 46, 451–480.

Miloso, M., Villa, D., Crimi, M., Galbiati, S., Donzelli, E., Nicolini, G., Tredici, G., 2004. Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *J Neurosci Res.* 75, 241–252.

Miyazaki, S., Yanagida, T., Nunome, K., Ishikawa, S., Inden, M., Kitamura, Y., Nakagawa, S., Taira, T., Hirota, K., Niwa, M., Iguchi-Ariga, S.M., Ariga, H., 2008. DJ-1-Binding Compounds Prevent Oxidative Stress-Induced Cell Death and Movement Defect in Parkinson's Disease Model Rats. *J Neurochem.* (In press).

Mizote, T., Tsuda, M., Smith, D.D.S., Nakayama, H., Nakazawa, T., 1999. Cloning and characterization of the thiD/J gene of *Escherichia coli* encoding a thiamin-synthesizing bifunctional enzyme, hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethylpyrimidine kinase. *Microbiology.* 145, 495–501.

Moll, U.M., LaQuaglia, M., Benard, J., Riou, G., 1995. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 4407–4411.

Mu, X., He, G., Cheng, Y., Li, X., Xu, B., Du, G. 2009. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. *Pharmacol Biochem Behav*. 92, 642-648.

Nie, G., Cao, Y., Zhao, B., 2002. Protective effects of green tea polyphenols and their major component, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Redox Rep*. 7, 171-177.

Odelstad, L., Pahlman, S., Nilsson, K., Larsson, E., Lackgren, G., Johansson, K.E., Hjerten, S., Grotte, G., 1981. Neuron Specific enolase in relation to differentiation in human neuroblastoma. *Brain Res*. 224, 69-82.

Pahlman, S., Ruusala, A.I., Abrahamsson, L., Mattsson, M.E., Esscher, T., 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*. 14, 135–144.

Prabhakara, J.P.R., Feist, G., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., Ghribi, O., 2008. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on tyrosine hydroxylase and α -synuclein in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 107, 1722-1729.

Poewe, W., 2008. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 15, 14–20.

Reimer, R., Helmbold, H., Szalay, B., Hagel, C., Hohenberg, H., Deppert, W., Bohn, W., 2009. Nestin Modulates Glucocorticoid Receptor Function by Cytoplasmic Anchoring. *Plos One.* 29, e6084.

Sahlgren, C.M., Pallari, H.M., He, T., Chou, Y.H., Goldman, R.D., Eriksson, J.E., 2006. A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *The Embo Journal.* 25, 4808–4819.

Sarkanen, J.R., Nykky, J., Siikanen, J., Selinummi, J., Ylokomi, T., Janolen, T.O., 2007. Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 102, 1941-1952.

Savickiene, J., Treigyte, G., Magnusson, K.E., Navakauskiene, R., 2009. Response of Retinoic Acid-Resistant KG1 Cells to Combination of Retinoic Acid with Diverse Histone Deacetylase Inhibitors. *Ann N Y Acad Sci.* 1171, 321-333.

Schapira, A.H., 2008. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease. *Neurochem Res.* 12, 2502-2509.

Seitz, G., Stegmann, H.B., Jager, H.H., Schlude, H.M., Wolburg, H., Roginsky, V.A., Niethammer, D., Bruchelt, G., 2000. Neuroblastoma cells expressing the noradrenaline transporter are destroyed more selectively by 6-fluorodopamine than by 6- hydroxydopamine, *J Neurochem.* 75, 511–520.

Sekito, A., Koide-Yoshida, S., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M., Ariga, H., 2006 DJ-1 Interacts With HIPK1 and Affects H₂O₂-Induced Cell Death. *Free Radic Res.* 40, 155 – 165.

Thomas, S.K., Messam, C.A., Spengler, B.A., Biedler, J.L., 2004. Nestin is a Potential Mediator of Malignancy in Human Neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 279, 27994- 27999.

Tieu, K., Zuo, D.M., Yu, P.H., 1999. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of Bcl-2 and p53 proteins. *J Neurosc Res.* 58, 426-435.

Weggen, S., Bayer, T.A., Koch, A., Salewski, H., Scheidtmann, K.H., Pietsch, T., Wiestler, O.D., 1997. Characterization of neural cell lines derived from SV40 large T-induced primitive neuroectodermal tumors. *Brain Pathol.* 7, 731–739

Weyer, A., Schilling, K., 2003. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res.* 73, 400–9.

Xu, J., Zhong, N., Wang, H., Elias, J.E., Kim, C.Y., Woldman, I., Pifl, C., Gygi, S.P., Geula, C., Yankner, B.A., 2005. The Parkinson's Disease-Associated DJ-1 Protein is a Transcriptional Co-Activator That Protects against Neuronal Apoptosis. *Hum Mol Genet.* 14, 231 – 1241.

Zhang, L., Shimoji, M., Thomas, B., Moore, D.J., Yu, S.H., Marupudi, N.I., Torp, R., Torgner, I.A., Ottersen, O.P., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2005. Mitochondrial Localization Of the Parkinson's Disease Related Protein DJ-1: Implications For Pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 14, 203 – 2073.

Zhong, N., Xu, J., 2008. Synergistic activation of the human MnSOD promoter by DJ-1 and PGC-1alpha: regulation by SUMOylation and oxidation. *Hum Mol Genet,* 17, 3357-3367.

7.2 Tianeptine and its derivative NANT 03 have neuroprotective effects in a differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cell line.

Artigo à ser submetido na revista Journal of Molecular Neuroscience.

Este artigo é referente aos objetivos secundários de 2 a 5. Neste trabalho utilizou-se o modelo experimental estabelecido no estudo anterior, uma linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciada em neurônios dopaminérgicos, no qual se avaliou o efeito neuroprotetor do NANT 03 e da tianeptina.

Tianeptine and its derivative NANT 03 have neuroprotective effects in a differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cell line.

Gabriela Delevati Colpo^{1,2,4}, Gabriel Rodrigo Fries^{1,3,4}, Martina Blank^{4,5,6,7},
Maria Noêmia Martins de Lima^{5,4}, Leandra F. Campos⁹, Arethuzia Dornelles^{4,5,6,7},
Pâmela Ferrari^{1,4}, Fábio Klamt,^{4,8} Rafael Roesler^{4,5,6,7}, Flávio Kapczinski^{1,2,4}

1-Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

2-Programa de Pós Graduação em Ciência Médicas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

3-Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

4-INCT Translacional em Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

5- NeuroAssay Ltd., Porto Alegre, RS, Brasil.

6-Laboratório de Neurofarmacologia e Biologia de Tumor Neural, Departamento de Farmacologia /ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

7-Laboratório de Pesquisa em Câncer, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

8-Laboratório 24, Departamento de Bioquímica, ICBS / UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil.

9-Instituto de Química, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

***Corresponding Author:**

Prof. Flávio Kapczinski

Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio Anexo

CEP: 90035-903

Email: flavio.kapczinski@gmail.com

Word count of the abstract: 193

Word count of the article body: 2503

Abstract

Background: Recent studies have found strong evidence that neurotrophic factors, especially BDNF, play a crucial role in the response to antidepressant treatment. BDNF is a neurotrophin widely expressed in the adult brain, playing an important role in a variety of neural processes, such as neurogenesis, neuronal connectivity, and neuroplasticity. Therefore, BDNF might be an important target for antidepressant therapeutic drugs. The aim of this study was to develop a novel drug from tianeptine, the NANT 03, and evaluate its neuroprotective features.

Methods: Differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was treated with 30, 50 and 100 μ M of tianeptine and its derivative NANT 03. Afterwards, the levels of BDNF mRNA, intracellular and secreted BDNF, as well as intracellular levels of Bcl-2 were measured. **Results:** NANT 03 increased BDNF mRNA levels in the treatments of 50 and 100 μ M, and increased intracellular and secreted BDNF and Bcl-2 in the dose of 100 μ M. Moreover, tianeptine in the dose of 100 μ M increased levels of intracellular and secreted BDNF. **Conclusion:** The new compound NANT 03 showed a greater neuroprotective feature when compared to tianeptine. This suggests that this new molecule can improve cognition and neuronal plasticity of patients.

Keywords: Antidepressants, Tianeptine, NANT 03, BDNF, Bcl-2

Introduction

Antidepressant drugs have been in use for more than 50 years, but their precise mechanisms of action are still not fully understood. The most accepted hypothesis assumes that antidepressants restore the neurotransmission in noradrenergic and serotonergic system (Drzyzga et al 2009). However, recent studies have found strong evidence that growth factors, especially Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), play a crucial role in response to antidepressant treatment. BDNF is a neurotrophin widely expressed in the adult brain, playing an important role in a variety of neural processes, such as neurogenesis, neuronal connectivity, and neuroplasticity (McAllister et al 1999). Furthermore, BDNF is important in memory and learning processes, and is involved in cognition as well as mood-related behaviors (Post 2007). Therefore, BDNF might be an important target for therapeutic drugs, also providing protection against stress-induced neuronal damage (Coyle and Duman 2003; Hashimoto et al 2004; Martinowich et al 2007; Nestler et al 2002). For this reason, recent findings suggest that depression is related to the alterations in neurotrophic pathways (Castren and Rantamaki 2010b; Neto et al 2011; Yu and Chen 2011). Some authors even suggested that increased neuronal cell loss might contribute to the pathogenesis of depression (Duman 2004). Hence, appreciable interest has been focused on the trophic and antiapoptotic effects of antidepressants.

Another target in the mechanism of action of antidepressant drugs has been the antiapoptotic protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). This protein is part of the Bcl-2 family of proteins and inhibits the release of apoptotic proteins from mitochondria.

Thus, Bcl-2 promotes cell survival and neurotrophic effects, as well as axonal growth and release of neuronal differentiation stimuli (Drzyzga et al 2009). The antidepressant activity on the expression of Bcl-2 is still inconsistent, depending on the antidepressant class and the cell type studied (Drzyzga et al 2009)

Thus, drugs that act by activating survival pathways by increasing proteins such as Bcl-2 and BDNF may help to ameliorate neuronal functioning by facilitating synaptic connectivity and improving depressive symptoms (Castren and Rantamaki 2010a). Among these drugs, tianeptine an atypical antidepressant presents neuroprotective features and has been used for the treatment of depressive episodes. In contrast with most antidepressant agents, it has a different mechanism of action, enhancing serotonin uptake in the brain without affecting norepinephrine and dopamine uptake (De Simoni et al 1992; Fattaccini et al 1990; Kato and Weitsch 1988).

Tianeptine in doses of 25 to 50 mg/day has been used in patients with MDD (major depression) and depressive BD (bipolar disorder), and its efficacy and tolerability is clearly demonstrated (Kasper and McEwen 2008). Furthermore, tianeptine improves not only the depressive symptoms, but also the cognitive and structural changes that characterize depressive states (Uzbay et al 2007). It acts in several neuronal systems that may contribute to ameliorate the cognitive dysfunctions and impaired functionality presented by the patients. Among these properties, tianeptine may improve the neuroplasticity and increase hippocampal dendritic length (Magarinos et al 1999). Studies have shown that this drug prevents and reverses modifications and structural changes in metabolism and neural functions caused by stress, such as decreased size of hippocampus and

increased concentration of the metabolite N-acetyl-aspartate (Czeh et al 2001). Furthermore, data suggest that tianeptine can promote neuroplasticity by increasing the expression of neurotrophic factors such as BDNF and NGF in the hippocampus and amygdala in animal exposed to stress. (Alfonso et al 2006; Reagan et al 2007).

Although tianeptine presents a good antidepressant action along with neuroprotective features, the development of similar yet novel therapeutic drugs with improved permeability across biological barriers would be of relevance for the achievement of more potent neuroprotective characteristics. Thus, the rationale of this study was to develop a new compound synthesized from tianeptine with the aim of creating a novel drug with enhanced permeability across biological barriers and superior neuroprotective features than tianeptine. Thereafter, the neuroprotective properties of the newly synthesized molecule NANT 03 was evaluated through the quantification of BDNF and Bcl-2 levels in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line treated with different concentrations of tianeptine and its derivative NANT 03.

Experimental procedures

Materials

Materials used in cell culture were acquired from Gibco[®]/Invitrogen (São Paulo, SP Brazil). Tianeptine (Stablon) was kindly donated by Servier (France).

Synthesis of 7-(allyl(3-chloro-6-methyl-6,11-dihydrodibenzo[c,f][1,2]thiazepin-11-yl)amino]heptanoic acid 5,5 dioxide (NANT 03).

A solution of 422 mg of Tianeptine (7-[(3-chloro-6-methyl-6,11-dihydrodibenzo[c,f][1,2]thiazepin-11-yl)amino]heptanoic acid 5,5 dioxide) in methanol was added to 80 μ L of bromopropene and to 80 mg of sodium bicarbonate (NaHCO_3). The solution was heated at reflux for 25 h. The crude material was purified by chromatography on silica gel using a mixture of dichloromethane-ethyl acetate-ethanol as eluent. The title compound was isolated as a light yellow wax.

Cell culture and differentiation

Exponential growing human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, obtained from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained in a 1:1 mixture of Ham's F12 and Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 100 μ g/mL gentamicin and 0,25 μ g/mL of amphotericin B, in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 $^\circ\text{C}$. Cell medium was replaced every three days and cell were sub-cultured once they reached 80% confluence. All treatments were performed when cells were ~75% confluence.

After 24 hours of cell plating, differentiation was induced by lowering the FBS in culture medium to 1% plus 10 μ M retinoic acid (RA) during 7 days. This treatment was replaced each 3 days to replenish RA in culture media. After this

protocol, the cells exhibit morphological and biochemical characteristics of dopaminergic neurons (Lopes et al 2010).

Pharmacological Treatment

Differentiated cells were treated with 30, 50 and 100 μ M tianeptine and NANT 03 for 48 hours. Cellular toxicity was assessed in all doses. Certain toxicity was seen with the higher dose of NANT 03. However, drugs commonly used in clinical show a higher toxicity even at lower doses in the experimental model used in this work (data not show).

Measurement of intracellular and released (extracellular) BDNF levels

SH-SY5Y cells were cultivated and differentiated in 25cm²-flasks at a density of 1,5x 10⁶ to measure intracellular BDNF levels. In the 7th day of differentiation cells were treated with 30, 50, and 100 μ M tianeptine and NANT 03 for 48h. After cells lysis in 10 mM PBS, sonication and centrifugation at 5.000 rpm for 5 minutes, supernatants were collected and used to measure intracellular BDNF levels. Samples of culture medium were also collected from treated cells for the measurement of released BDNF. BDNF was measured in cell extracts and culture media with a sandwich-ELISA kit, according to the manufacturer's instructions (Millipore, USA).

Quantitative RT-PCR

For gene expression assays, cells were plated and differentiated in a 6- well plate at a density of 3×10^6 cells / well. In the 7th day of differentiation, cells were treated with 30, 50, and 100 μ M tianeptine and NANT 03 for 48h. Total RNA was extracted from the cells using TRI Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured with NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA). All reactions were performed in triplicates in the 7500 Real Time PCR System (Life Technologies). One microgram of total RNA was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, CA, USA) following the manufacturer's protocol. cDNA was stored at -80°C until real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. All cDNAs were diluted 1:10 before being used as PCR template. The dilution was chosen after standard curve was performed. Specific primer pairs and TaqMan MGB probe labeled with FAM for human BDNF transcript (Life Technologies) were custom made (NCBI Reference Sequence: NM_001143807.1). The sequences are the following: F – 5' TGGCTGACACTTTCGAACAC 3', R – 5' CCTTTGGAGCCTCCTCTTCT 3', Probe – 5' GACGCAGACTTGTACACGTC 3'. Primers and probes (Life Technologies) specific for human beta actin (4352935E) and beta-2-microglobulin (4326319E) labeled with FAM and VIC, respectively, were used as endogenous control. Relative expression levels were determined by the ddCt method, according to Livak and Schmittgen (2001).

Measurement of Bcl-2 levels

For the measurement of Bcl-2 levels, the cells were cultivated and differentiated in 75cm²-flasks at a density of 2 x 10⁷ cells / flask. In the 7th day of differentiation the cells were treated with 30, 50, and 100µM tianeptine and NANT 03 for 48h. Cells were lysed in 10 mM PBS by freezing and thawing three times. The supernatants were used to measure Bcl-2 levels using an ELISA commercial kit, according to the manufacturer's instructions (Enzo Life Sciences).

Statistical analyses

Data are expressed as mean ± SD from at least three independent experiments. For statistical analyses, quantitative data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test when ANOVA was significant, and Kruskal-Wallis test was used for non-parametric variables. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effects of Tianeptine and NANT 03 in the expression of BDNF mRNA.

The levels of BDNF mRNA were measured by RT-PCR in differentiated SH-SY5Y cells treated with tianeptine and NANT 03 in the concentrations of 30, 50

and 100 μM for 48 hours. The concentrations of 50 and 100 μM of NANT 03 significantly increased the levels of BDNF mRNA when compared to FSB and to vehicle (ethanol) ($F(4-26)=5,923$, $p= 0,0022$) (Figure 1a). Tianeptine did not show significant differences ($p>0,05$) (Figure 1 b).

Effects of Tianeptine and NANT 03 in the levels of intracellular and released BDNF

The levels of intracellular and released BDNF were measured by sandwich-ELISA in SH-SY5Y cells after 48 hours of treatment with NANT 03 and tianeptine in the concentrations of 30, 50 e 100 μM . NANT 03 in the concentration of 100 μM increased the levels of intracellular BDNF when compared to the FSB control and to vehicle (ethanol) ($F(4-19)= 13,86$ $p<0,0001$) (Figure 2a), and increased the levels of released BDNF in the cells treated with 100 μM when compared to all the groups ($F(4-19)= 9,926$ $p=0,0004$) (Figure 3a). Tianeptine 100 μM increased the levels of intracellular BDNF when compared with 30 and 50 μM ($F(4-19)=4,834$ $p=0,0105$) (Figure 2b), and 100 μM also increased the levels of released BDNF when compared to all the groups ($F(4-19) = 26,24$ $p<0,0001$) (Figura 3b).

Effects of Tianeptine and NANT 03 in the levels of Bcl-2

The levels of Bcl-2 were measured by ELISA in differentiated SH-SY5Y cells after 48 hours of treatment with NANT 03 and tianeptine in the concentrations of 30, 50 e 100 μM . NANT 03 in the concentration of 100 μM increased the levels

of Bcl-2 when compared to FBS control and vehicle (ethanol) ($F(4-12) = 15,08$ $p=0,0009$) (Figure 4a). Tianeptine did not alter Bcl-2 levels $p>0,05$ (Figure 4b).

Discussion

In this study, we evaluated the effects of tianeptine, an atypical antidepressant, and its derivative NANT 03, in BDNF mRNA expression, intracellular levels of BDNF and Bcl-2, and in the levels of released BDNF in a human neuroblastoma SH-SY5Y cell line differentiated into dopaminergic neurons. Our results show that NANT 03 was more effective than tianeptine in enhancing BDNF and Bcl-2 levels, which suggests that the mechanisms of action of this molecule can be related to the activation of neurotrophic and antiapoptotic pathways and thus develop a neuroprotective action.

Several studies associate mood disorder and mechanisms of action of antidepressants with neurotrophic factors. Among them, BDNF has been of great interest, given that it is the main neurotrophin of the central nervous system and activates pathways of neuronal protection (Duman 2009). Recent meta-data analyses report a positive correlation between BDNF levels and the antidepressant response in depressed patients (Brunoni et al 2008; Sen et al 2008).

BDNF is an important factor in the etiology of MDD and BD (Hashimoto 2010). Serum levels of this protein is reduced in depressive patients (Karege et al 2002; Shimizu et al 2003) and in acute BD episodes (Cunha et al 2006; Machado-Vieira et al 2007), and normalization of BDNF levels may be related to a clinical

improvement (Tramontina et al 2009). Several studies suggest that antidepressants act by increasing the expression of neurotrophic factors, such as BDNF, thus improving neuroplasticity, neuronal connectivity and cell resilience (Coyle and Duman 2003; Nestler et al 2002). Moreover, another important mechanism induced by BDNF is its ability to inhibit cell death cascades. Evidence suggests that this protein can inhibit cell death by increasing the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 (Bonni et al 1999).

Beyond its antidepressant activity, tianeptine presents several neuroprotective actions, increasing neurotrophic factors, such as BDNF (Alfonso et al 2006; Reagan et al 2007) and reverting deleterious effects caused by stress (Czeh et al 2001; Magarinos et al 1999) and by the increase in glutamate in animal models of stress (Kole et al 2002). In this study, tianeptine proved its neuroprotective action by enhancing the levels of intracellular and released BDNF. However, it was not able to enhance Bcl-2 levels. In a study by Lucassen et al, showed tianeptine reduced cell death in the prefrontal cortex and in the hippocampus of rats that were submitted to psychosocial stress, suggesting that tianeptine presents an antiapoptotic action possibly independent of Bcl-2 (Lucassen et al 2004). NANT 03 presented superior results than that of tianeptine, given that it induced significantly more BDNF in all analyzed parameters, including Bcl-2 levels, in which tianeptine induced no alteration.

The BDNF is synthesized as pro-BDNF and that is cleaved by protease to form the mature BDNF, its binding to the receptor TrkB promotes neuronal survival and growth. Although there is no literature on the consensus pro-BDNF is secreted, or if it is found only intracellular, it has been proposed that only mature

BDNF is secreted and is biologically active to exerts protective effects, and pro-BDNF is a transient intermediate that is unlikely to be secreted or to have a physiological role as an extracellular ligant (Matsumoto et al 2008). Thus pro-BDNF is intracellularly located and serves as a BDNF stock (Nishino et al 2011). In our study, the ELISA employed is not able to distinguish between mature and pro-BDNF, but both drugs increased the levels of secreted BDNF. In other words, they increased the biologically active BDNF that acts by binding to the tyrosine kinase receptor type B (TrkB) and activating neuroprotective pathways, leading to growth, differentiation and cell survival. NANT 03 also increased mRNA levels, which suggests that more BDNF is being synthesized.

In the clinical use, drugs that act on neurotrophic and antiapoptotic pathways present a key role in hindering the progression of the disorder, and, thus avoiding cumulative damage that mood disorders present throughout the years (Drzyzga et al 2009). These disorders are associated with reductions in the volume of hippocampus and prefrontal cortex (Karege et al 2002), and the increase in the levels of BDNF and Bcl-2 may prevent and/or ameliorate these alterations.

Our results show that NANT 03, the new molecule derived from tianeptine, presents a higher efficacy in increasing the levels of BDNF and Bcl-2, which shows that it presents protective actions *in vitro*. However, these results cannot be extrapolated to humans yet. More preclinical studies are required in order to clinically test this drug, after which efficacy and tolerability results will be available.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilians funds MCT/CNPq INCT-TM (573671/2008-7),

Financial disclosures

Prof. Kapczinski has received grant/research support from Astra-Zeneca, Eli Lilly, the Janssen-Cilag, Servier, CNPq, CAPES, NARSAD and the Stanley Medical Research Institute; has been a member of the speakers' boards for Astra-Zeneca, Eli Lilly, Janssen and Servier; and has served as a consultant for Servier.

Figure 1 a

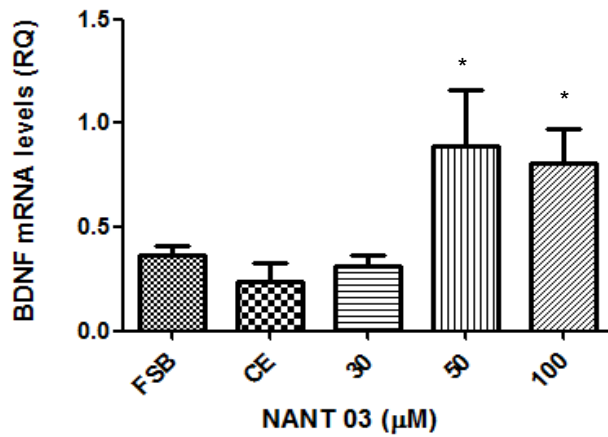


Figure 1b

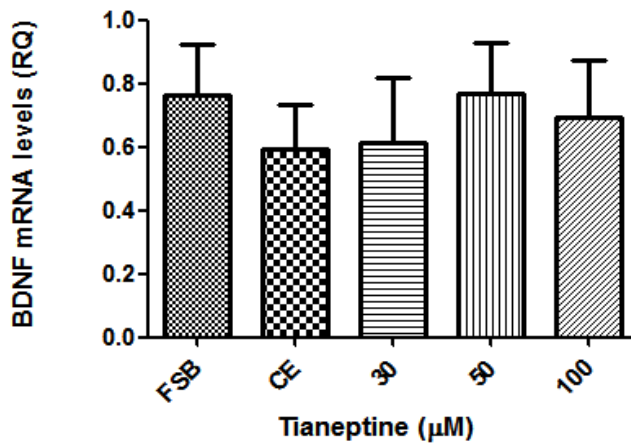


Figure 1a, b

Effects of NANT 03 and tianeptine in the expression of mRNA BDNF in the cells line SH-SY5Y differentiated in dopaminergic neurons. The cells were treated with 30, 50 and 100μM of NANT 03 for 48h and compared with the controls SFB (fetal serum bovine) and vehicle CE (control ethanol) ($p < 0,05$ ANOVA one way). Each column represent the mean \pm S.D. of three experiments, * $p < 0.05$ or 0.01; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

Figure 2a

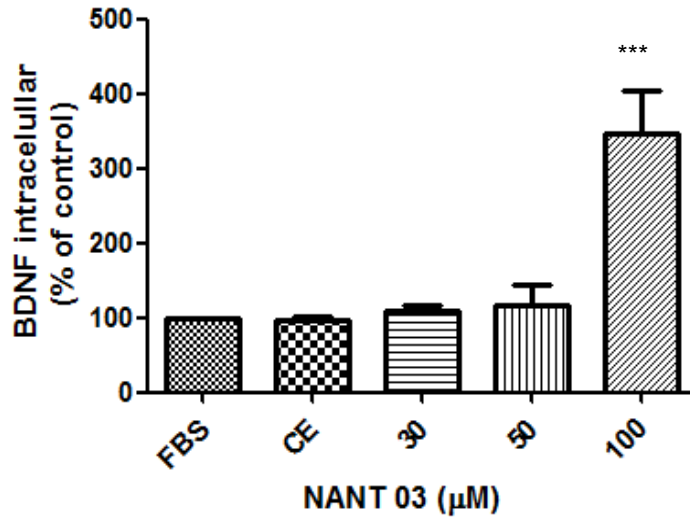


Figure 2b

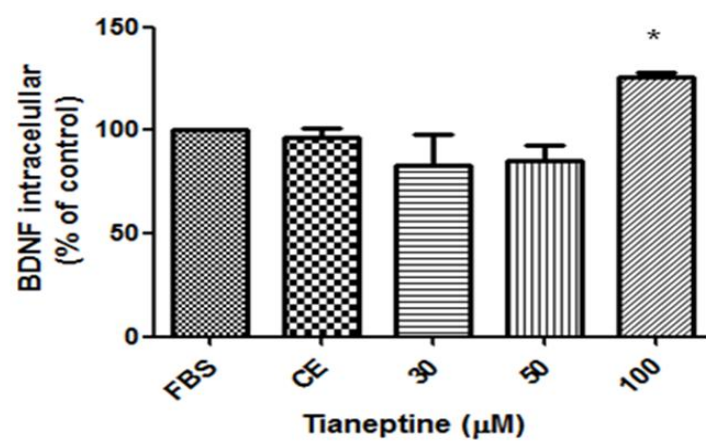


Figura 2a, b

Effects of NANT 03 and tianeptine in the levels of BDNF intracellular in the cells line SH-SY5Y differentiated in dopaminergic neurons. The cells were treated with 30, 50 and 100 μM of NANT 03 for 48h and compared with the controls SFB (fetal serum bovine) and vehicle CE (control ethanol) ($p < 0,05$, ANOVA one way). Each column represents the mean \pm S.D. of four experiments, * $p < 0.05$ or 0.01; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

Figure 3a

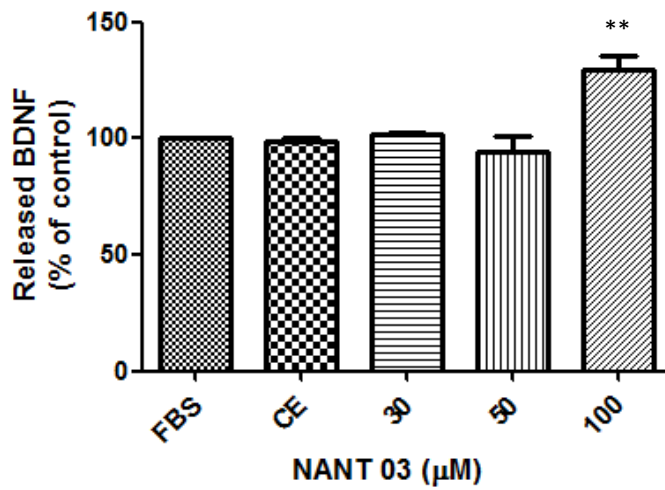


Figure 3b

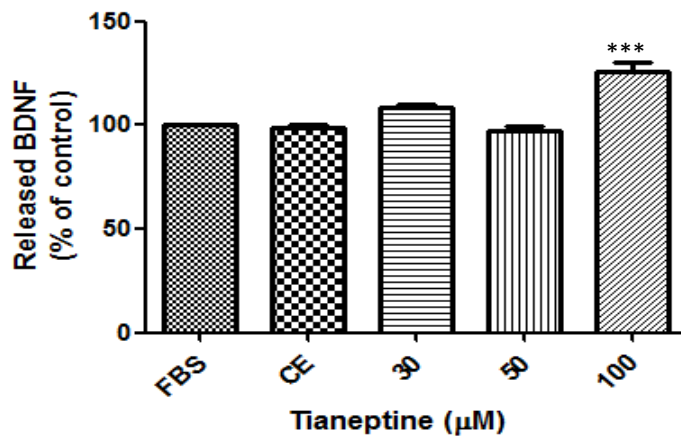


Figura 3a, b

Effects of NANT 03 and tianeptine in the levels of BDNF released in the cell line SH-SY5Y differentiated in dopaminergic neurons. The cells were treated with 30, 50 and 100 μM of NANT 03 for 48h and compared with the controls SFB (fetal serum bovine) and vehicle CE (control ethanol) ($p < 0,05$, ANOVA one way). Each column represents the mean \pm S.D. of four experiments, * $p < 0.05$ or 0.01; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

Figure 4a

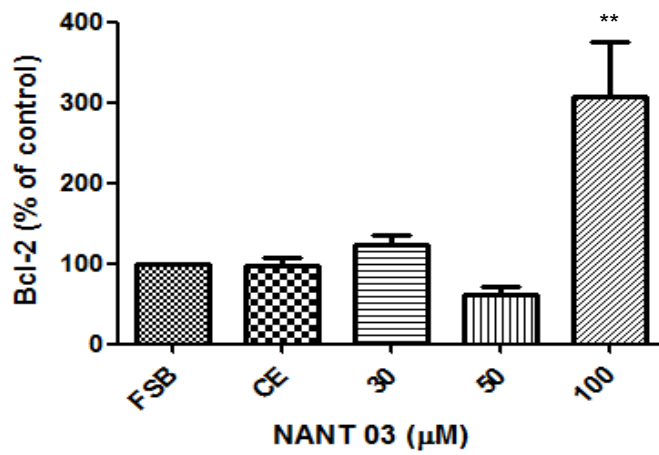


Figure 4b

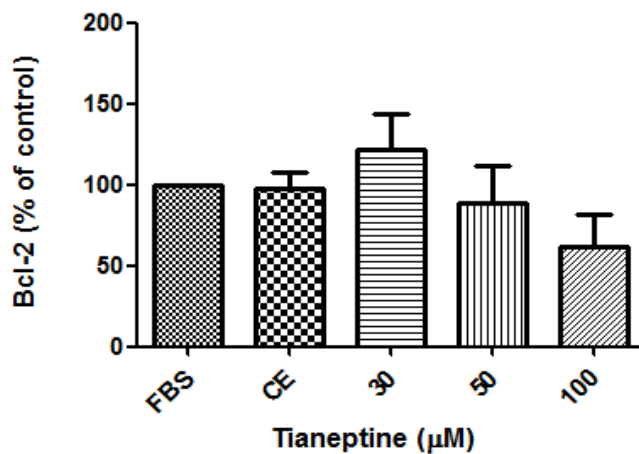


Figure 4a, b

Effects of NANT 03 and tianeptine in the levels of Bcl-2 in the cells line SH-SY5Y differentiated in dopaminergic neurons. The cells were treated with 30, 50 and 100μM of NANT 03 for 48h and compared with the controls SFB (fetal serum bovine) and vehicle CE (control ethanol) ($p < 0,05$ ANOVA one way). Each column represents the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$ or 0.01; ** $p < 0.001$;

*** $p < 0.0001$

References

- Alfonso J, Frick LR, Silberman DM, Palumbo ML, Genaro AM, Frasch AC (2006): Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol Psychiatry* 59:244-251.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999): Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
- Brunoni AR, Lopes M, Fregni F (2008): A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:1169-1180.
- Castren E, Rantamaki T (2010a): The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol* 70:289-297.
- Castren E, Rantamaki T (2010b): Role of brain-derived neurotrophic factor in the aetiology of depression: implications for pharmacological treatment. *CNS Drugs* 24:1-7.

Coyle JT, Duman RS (2003): Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron* 38:157-160.

Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, et al (2006): Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett* 398:215-219.

Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, et al (2001): Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12796-12801.

De Simoni MG, De Luigi A, Clavenna A, Manfredi A (1992): In vivo studies on the enhancement of serotonin reuptake by tianeptine. *Brain Res* 574:93-97.

Drzyzga LR, Marcinowska A, Obuchowicz E (2009): Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull* 79:248-257.

Duman RS (2004): Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 56:140-145.

- Duman RS (2009): Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 11:239-255.
- Fattaccini CM, Bolanos-Jimenez F, Gozlan H, Hamon M (1990): Tianeptine stimulates uptake of 5-hydroxytryptamine in vivo in the rat brain. *Neuropharmacology* 29:1-8.
- Hashimoto K (2010): Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions. *Psychiatry Clin Neurosci* 64:341-357.
- Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M (2004): Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 45:104-114.
- Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM (2002): Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109:143-148.
- Kasper S, McEwen BS (2008): Neurobiological and clinical effects of the antidepressant tianeptine. *CNS Drugs* 22:15-26.
- Kato G, Weitsch AF (1988): Neurochemical profile of tianeptine, a new antidepressant drug. *Clin Neuropharmacol* 11 Suppl 2:S43-50.

- Kole MH, Swan L, Fuchs E (2002): The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational synapse in chronically stressed rats. *Eur J Neurosci* 16:807-816.
- Lopes FM, Schroder R, da Frota ML, Jr., Zanotto-Filho A, Muller CB, Pires AS, et al (2010): Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res* 1337:85-94.
- Lucassen PJ, Fuchs E, Czeh B (2004): Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry* 55:789-796.
- Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, et al (2007): Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. *Biol Psychiatry* 61:142-144.
- Magarinos AM, Deslandes A, McEwen BS (1999): Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol* 371:113-122.
- Martinowich K, Manji H, Lu B (2007): New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 10:1089-1093.

- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, et al (2008): Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci* 11:131-133.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999): Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:295-318.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002): Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Neto FL, Borges G, Torres-Sanchez S, Mico JA, Berrocoso E (2011): Neurotrophins role in depression neurobiology: a review of basic and clinical evidence. *Curr Neuropharmacol* 9:530-552.
- Nishino S, Ohtomo K, Numata Y, Sato T, Nakahata N, Kurita M (2011): Divergent effects of lithium and sodium valproate on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) production in human astrocytoma cells at therapeutic concentrations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Post RM (2007): Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res* 41:979-990.

Reagan LP, Hendry RM, Reznikov LR, Piroli GG, Wood GE, McEwen BS, et al (2007): Tianeptine increases brain-derived neurotrophic factor expression in the rat amygdala. *Eur J Pharmacol* 565:68-75.

Sen S, Duman R, Sanacora G (2008): Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 64:527-532.

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, et al (2003): Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 54:70-75.

Tramontina JF, Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Stertz L, Goi J, Chiarani F, et al (2009): Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. *Neurosci Lett* 452:111-113.

Uzbay TI, Kayir H, Ceyhan M (2007): Effects of tianeptine on onset time of pentylenetetrazole-induced seizures in mice: possible role of adenosine A1 receptors. *Neuropsychopharmacology* 32:412-416.

Yu H, Chen ZY (2011): The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin* 32:3-11.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho buscou-se estabelecer um modelo experimental *in vitro* mais adequado para estudos de doenças neurológicas e psiquiátricas e através desse modelo, estudar os efeitos neuroprotetores do antidepressivo tianeptina e de uma nova molécula sintetizada a partir da tianeptina, com a finalidade de desenvolver uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de episódios depressivos, que além de atuar sobre os sintomas depressivos, ative vias de proteção e crescimento neuronal.

Devido a dificuldade de se obter modelos animais adequados para o estudo de doenças psiquiátricas e por ser inacessível a utilização de amostras de tecido cerebral de pacientes, a linhagem de células de neuroblastoma humana SH-SY5Y é bastante usada em trabalhos de psiquiatria, no entanto, essa linhagem é composta por células tumorais que possuem propriedades mitogênicas e oncogênicas (118). Assim, trabalhos que utilizam esse modelo para o estudo de doenças psiquiátricas possuem uma limitação em seus resultados já que são células tumorais e não neurônios.

Dessa forma, este trabalho buscou estabelecer um modelo experimental mais adequado para o estudo de doenças psiquiátricas e neurológicas. Os achados apresentados, demonstram que a realização de um protocolo de diferenciação celular com ácido retinóico na concentração de $10\mu\text{M}$ e meio de cultivo com soro fetal bovino 1% durante 7 dias é eficaz em diferenciar as células de neuroblastoma humano SH-SY5Y em células com características morfológicas e bioquímicas de neurônios dopaminérgicos. Dentre as características

morfológicas estão a aquisição de dendritos e a diminuição do corpo celular adquirindo um formato estrelado. Os parâmetros bioquímicos analisados são marcadores específicos de neurônios, como a enzima Tirosina Hidroxilase (TH), a proteína Enolase Neurônio Específica (NSE) e a Proteína nuclear específica de neurônio (NeuN), que tornam-se expressos nas células após os sete dias do protocolo de diferenciação. Também foi analisado um marcador de células indiferenciadas, a proteína de filamento Nestina, que depois dos sete dias de diferenciação não é mais observado nas células diferenciadas em neurônios. Desta forma, pode-se observar que as células SH-SY5Y passam de células tumorais para células neuronais. Assim, nesse trabalho estabeleceu-se um modelo experimental mais adequado para o estudo de doenças psiquiátricas e para ensaios com drogas que atuem no SNC.

Baseado no modelo experimental de células neuronais estabelecido neste trabalho, realizou-se um estudo para caracterizar e avaliar o efeito neuroprotetor da tianeptina e de um novo composto desenvolvido a partir da molécula tianeptina, o NANT 03.

Os resultados encontrados nesse trabalho mostram que o novo composto sintetizado apresenta uma importante ação neuroprotetora. O NANT 03 aumentou significativamente os níveis de BDNF intracelular e secretado, ou seja, o BDNF maduro que se ligara no seu receptor TrkB e exercerá efeitos de crescimento e proteção neuronal. Também observou-se um aumento nos níveis de mRNA do BDNF sugerindo que mais BDNF será produzido. Adicionalmente o NANT 03 aumentou os níveis de Bcl-2, uma proteína antiapoptótica, que atuando sinergicamente com o BDNF podem contribuir para diminuir a perda e atrofia

neuronal e conseqüentemente os déficits cognitivos encontrado nos pacientes com transtorno bipolar.

A tianeptina também mostrou-se eficaz em aumentar os níveis de BDNF intracelular e secretado, no entanto não aumentou os níveis de mRNA e de Bcl-2. Dessa forma, esses resultados comprovam os efeitos neuroprotetores da tianeptina demonstrado por outros trabalhos citados anteriormente. No entanto, o seu derivado NANT 03 apresentou um caráter neuroprotetor superior o da tianeptina. Assim, pode-se dizer que o objetivo de sintetizar um composto com características neuroprotetoras superior a da tianeptina foi alcançado. Além disso, como esse trabalho foi desenvolvido em um modelo experimental de neurônios dopaminérgicos humanos, aumenta a relevância dos resultados encontrados, uma vez que essas células estão envolvidas com a fisiopatologia do TB.

Sabendo-se que pacientes com TB apresentam ao longo da doença graves prejuízos cognitivos e perda de funcionalidade, e isso muito se deve a atrofia e diminuição de importantes estruturas cerebrais. Ressalta-se, que fármacos que possuem um efeito neuroprotetor por atuarem em vias neurotróficas e antiapoptóticas podem ter papel fundamental em impedir a dano neuronal observado nesses pacientes.

Baseados nos resultados encontrados nesse trabalho pode-se sugerir que esse novo composto pode se tornar uma importante estratégia terapêutica para o tratamento da depressão bipolar, diminuindo os danos causados pela progressão doença. O modelo proposto por Kapczinski e colaboradores citado anteriormente mostra que os pacientes com TB apresentam um dano cumulativo com a progressão da doença, causando o desgaste de vários sistemas do organismo. A

diminuição de fatores neurotróficos, principalmente o BDNF, estão envolvidos nesse dano.

Dessa forma, reforçamos a ideia, que um tratamento precoce com fármacos que tenham como alvos terapêuticos vias de proteção neuronal como neurotrofinas e proteínas antiapoptóticas tornam-se estratégias importantes para prevenir a progressão da doença e assim diminuir os prejuízos cognitivos e a perda de funcionalidade encontrado nos pacientes.

Apesar dos dados encontrados nesse trabalho com o novo composto serem satisfatórios, cabe ressaltar que este é apenas um estudo *in vitro*, ou seja, não pode-se extrapolar os resultados encontrados neste estudo para a clínica. Para a utilização deste composto em pacientes ainda são necessários estudos pré-clínicos em modelos animais que visam definir o perfil farmacológico e toxicológico desse novo medicamento, para demonstrar que em uma fase seguinte poderá ser realizado ensaios em seres humanos, com segurança.

Como perspectivas desse trabalho, estão à realização de ensaios em modelos animais com o NANT 03 para analisar testes de toxicidade, ou seja, analisar se o tratamento agudo e crônico com essa droga é segura e não apresenta efeitos adversos graves. Também são necessários a realização de testes comportamentais nos animais para demonstrar se esse composto apresenta boa atividade antidepressiva e comparar com antidepressivos utilizados na clínica atualmente. Além disso, avaliar marcadores bioquímicos nos animais como o BDNF, além de outros parâmetros de neuroproteção. Com isso, futuramente esse fármaco poderá ser testado em humanos e posteriormente ser utilizado na clínica para o tratamento de doenças psiquiátricas.