

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**

**FÁBIO ALMEIDA MORAIS**

**AVALIAÇÃO DE SINTOMAS DEPRESSIVOS EM RATOS  
SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE  
AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA TRATADOS  
COM TIANEPTINA**

**CRICIÚMA  
2017**

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**

**FÁBIO ALMEIDA MORAIS**

**AVALIAÇÃO DE SINTOMAS DEPRESSIVOS EM RATOS  
SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE  
AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA TRATADOS  
COM TIANEPTINA**

Tese de Doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde para  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

**CRICIÚMA  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M827a Morais, Fábio Almeida

Avaliação de sintomas depressivos em ratos submetidos à administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada tratados com Tianeptina / Fábio Almeida Morais. – 2017.

101 p.; il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

Orientação: Emílio Luiz Streck.

1. Doença da urina do xarope do bordo. 2. Erros inatos do metabolismo. 3. Aminoácidos da cadeia ramificada. 4. Neurotrofinas. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.042

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC





UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

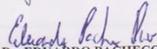
## PARECER

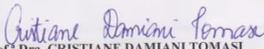
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Fábio Almeida Morais** sob o título “**AValiação de Sintomas Depressivos em Ratos Submetidos à Administração Crônica de Aminoácidos de Cadeia Ramificada Tratados com Tianeptina**”, para obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

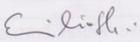
Criciúma, SC, 24 de agosto de 2017.

  
Prof.ª Dra. **JOSTIANE BUDNI**  
Membro Relator – UNESC

  
Prof. Dr. **EDUARDO PACHECO RICO**  
Membro Interno – UNESC

  
Prof.ª Dra. **CRISTIANE DAMIANI TOMASI**  
Membro Externo – UNESC

  
Prof. Dr. **DANIEL BERNANDES MARTINS**  
Membro Externo – UNISUL

  
Prof. Dr. **Emilio Luiz Streck**  
Orientador

  
Prof.ª Dra. **Maria Inês da Rosa**  
Coordenadora do PPGCS



## **FOLHA INFORMATIVA**

Esta Tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense



*Dedico minha tese ao meu pai e minha mãe, porque me mostraram a importância do estudo e educação no crescimento moral e pessoal. À minha esposa e ao meu filho, que tanto me trazem felicidades.*



## AGRADECIMENTOS

*A tese foi desenvolvida por um grupo que nesse momento gostaria de retribuir a dedicação nos processos que contribuíram a sua conclusão. Pessoas que convivi, cultivei amizade e que certamente já ultrapassaram a esfera do laboratório, tornando-se importantes na minha vida pessoal.*

*Começo agradecendo à colega de pós-graduação Giselli Scaini, pela amizade, paciência, discussões e todo o trabalho já dedicado a doença em questão, certamente contribuindo para a ciência e pacientes.*

*As incansáveis Lara Gomes e Milena Silva as quais conheci ainda quando na iniciação científica e tive o prazer de ser colega durante o doutorado, acompanhando o crescimento profissional, não medindo esforços para o bom andamento das pesquisas desenvolvidas ali. Assim como à toda bolsista de iniciação científica que disponibilizaram algum minuto de seus estudos e trabalho durante a pesquisa.*

*A minha esposa Meline Moraes, que além de me acompanhar nos obstáculos da vida, também fez parte da equipe do laboratório, contribuindo para o bom funcionamento e principalmente elevando a harmonia durante o tempo de dedicação ao trabalho.*

*Ao meu filho Augusto que transforma minha vida a cada dia, vencendo barreiras e mostrando que a alegria está nos pequenos gestos e brincadeiras.*

*Agradeço à Universidade do Extremo Sul Catarinense, em especial ao curso de Medicina, do qual faço parte, por proporcionar incentivo à qualificação dos profissionais que trabalham dia após dia para o crescimento desde curso que tanto nos orgulha.*

*Ao laboratório de neurociências meu mais sincero obrigado, pela competência e maestria com que conduziu à análise comportamental dos animais prezando pela ética e qualidade dos dados.*



*Finalmente ao meu orientador Dr. Emilio Luiz Streck, minha gratidão eterna, por fazer parte do círculo de pessoas que fizeram com que minha chegada e estabelecimento nesta cidade se tornasse mais fácil, por proporcionar oportunidade à minha esposa antes mesmo de nos conhecermos e por apresentar-me um caminho de estudo moral e ético. Hoje acima de tudo um amigo e irmão que conquistei nesta vida.*



*“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; porque é melhor a sua mercadoria do que os artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro mais fino”*

*Provérbios 3:13-14. Bíblia Sagrada*



## RESUMO

A doença da urina do xarope do bordo (DXB) é caracterizada como um distúrbio de herança autossômica recessiva causado pela deficiência na atividade do complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR). Dentre os principais sinais clínicos apresentados cita-se: disfunção neurológica, convulsões, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. A fisiopatologia dos sintomas neurológicos e os danos cerebrais dos pacientes com DXB são pouco esclarecidos, dentre as hipóteses os fatores neurotróficos parecem estar envolvidos na fisiopatologia da DXB. Quanto ao tratamento a tianeptina tem sido extensamente investigado por seu efeito protetor e consistente contra o estresse indutor da remodelação neuronal. O objetivo será avaliar os sintomas tipo depressivos e os níveis de neurotrofinas em ratos submetidos à administração crônica de AACR durante o desenvolvimento e o efeito da administração da tianeptina neste modelo animal. Foram utilizados ratos Wistar. Os ratos submetidos ao modelo animal de DXB apresentaram uma redução significativa da atividade locomotora evidenciada através dos cruzamentos em relação ao controle, sendo também percebido mesmo resultado naqueles em que houve administração concomitante de AACR+Tianeptina. Houve redução do consumo de sacarose quando comparada ao grupo controle, sendo este efeito revertido no grupo DXB tratado. No grupo DXB houve um maior tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle, já naqueles em que a Tianeptina foi administrada concomitantemente com os AACR foi observado reversão deste efeito. Quanto ao tempo de natação percebe-se uma diminuição significativa no grupo DXB quando comparado ao grupo controle, sendo que no grupo DXB+Tianeptina, reverteu este efeito. Houve aumento do peso da glândula adrenal nos ratos submetidos ao modelo animal de DXB quando comparado ao grupo



controle, e Tianeptina reverteu este efeito. Os níveis de NGF do grupo DXB diminuíram no hipocampo, já no grupo DXB+ Tianeptina percebe-se níveis de NGF no hipocampo similares aos do grupo controle. No hipocampo o grupo DXB obteve-se níveis de BDNF maiores do que no grupo controle, enquanto no grupo que recebeu administração de AACR+Tianeptina apresentou níveis mais baixos comparados ao DXB. No córtex cerebral tanto o grupo que recebeu a Tianeptina quanto o grupo DXB foram observados maiores níveis de BDNF, quando comparados ao grupo controle. Já no grupo DXB tratado houve uma redução do nível de BDNF. Os resultados indicam que a Tianeptina pode ser uma boa alternativa para o uso crônico em pacientes com DXB, visto que é capaz de modular o eixo HPA, restabelecendo melhorando também os níveis das neurotrofinas e os sintomas tipo depressivos.

Palavras-chave: DXB, AACR, neurotrofinas, Tianeptina



## ABSTRACT

MSUD is characterized an autosomal recessive inheritance disorder caused by deficiency in CDCCR activity. Among the main clinical signs cited are: neurological dysfunction, convulsions, delay in neuropsychomotor development. The pathophysiology of neurological symptoms and brain damage of patients with DXB are poorly understood, among the hypotheses neurotrophic factors appear to be involved in the pathophysiology of DXB. Regarding treatment, tianeptine has been extensively investigated for its protective and consistent effect against stress inducing neuronal remodeling. The objective will be to assess the type-depressive symptoms and levels of neurotrophins in rats submitted to chronic administration of AACR during the development and effect of administration of tianeptine in this animal model. Wistar rats were used. The rats submitted to the DXB animal model showed a significant reduction of the locomotor activity evidenced by the crosses in relation to the control, and also the same result was observed in those in which there was concomitant administration of AACR + Tianeptina. There was a reduction in sucrose consumption when compared to the control group, and this effect reverted in the treated DXB group. In the DXB group there was a longer immobility time when compared to the control group, even in those in which Tianeptina was administered concomitantly with the AACR, a reversal of this effect was observed. Regarding the swimming time, a significant decrease was observed in the DXB group when compared to the control group, and in the DXB + Tianeptina group, reversed this effect. There was an increase in adrenal gland weight in rats submitted to the DXB animal model when compared to the control group, and Tianeptin reversed this effect. NGF levels of the DXB group decreased in the hippocampus, whereas in the DXB + Tianeptina group, levels of NGF in the hippocampus were similar to those in the control group. In the hippocampus the



DXB group obtained higher BDNF levels than in the control group, while in the group receiving administration of AACR + Tianeptina presented lower levels compared to DXB. In the cerebral cortex both the group receiving Tianeptina and the DXB group, higher levels of BDNF were observed when compared to the control group. In the treated DXB group, there was a reduction in the level of BDNF. The results indicate that Tianeptin may be a good alternative for chronic use in patients with DXB, since it is able to modulate the HPA axis, restoring also improving levels of neurotrophins and depressive symptoms.

Keywords: MSUD, BCAA, neurotrophins, Tianeptina



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR).....	39
<b>Figura 2:</b> O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) modulando as sinapses glutamatérgicas através de alvos pré e pós-sinápticos.....	48
<b>Figura 3:</b> Sinalização intracelular das neurotrofinas.....	50
<b>Figura 4:</b> Desenho experimental da pesquisa.....	56
<b>Figura 5:</b> Avaliação da atividade locomotora em ratos submetidos à administração crônica de AACR e com uso concomitante de Tianeptina.....	61
<b>Figura 6:</b> Avaliação da anedonia em ratos submetidos à administração crônica de AACR e com uso concomitante de Tianeptina.....	62
<b>Figura 7:</b> Avaliação do teste de nado forçado em ratos submetidos à administração crônica de AACR e com uso concomitante de Tianeptina.....	64
<b>Figura 8:</b> Avaliação do peso da Glândula Adrenal em ratos submetidos à administração crônica de AACR e tratados Tianeptina.....	65



<b>Figura 9:</b> Avaliação dos níveis de NGF [pg/ $\mu$ g de proteína] em ratos submetidos à administração crônica de AACR e tratados Tianeptina.....	66
<b>Figura 10:</b> Avaliação dos níveis de BDNF [pg/ $\mu$ g de proteína] em ratos submetidos à administração crônica de AACR e tratados com Tianeptina.....	67
<b>Figura 11:</b> Avaliação dos níveis de proBDNF (arbitrary units/ $\beta$ -actin) em ratos submetidos à administração crônica de AACR e tratados com Tianeptina.....	69
<b>Figura 12:</b> Transaminação bidirecional da leucina e glutamato.....	71



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos fenótipos da DXB baseada nas manifestações clínicas e na atividade da enzima CDCCR.....	42
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AACR – Aminoácidos de cadeia ramificada  
AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico  
Akt - proteína quinase B (do inglês *protein kinase B*).  
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)  
cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (do inglês *3,5-cyclic adenosinemonophosphate*)  
CDCCR – Complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada  
CEUA – Comissão de ética no uso de animais  
CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
CREB – Proteína de ligação dos elementos responsivos ao cAMP (do inglês *cAMP responsive element binding protein*)  
DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (do inglês *5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*)  
DXB – Doença da urina do xarope do bordo  
EIM – Erros inatos do metabolismo  
ELISA – Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)  
GABA – Ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma-aminobutyricacid*)  
GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*)  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high-performance liquid chromatography*)  
JNK – c-Jun N-terminal quinase (do inglês *Jun N-terminal kinase*)  
LTM – Memória de longa duração (do inglês *long-term memory*)  
LTP – Potenciação a longo prazo (do inglês *long-term potentiation*)  
MAPK – Quinase ativada por mitógeno (do inglês *mitogen-*



*activated protein kinase*)

mBDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro maduro (do inglês *mature brain-derived neurotrophic factor*)

mRNA – RNA mensageiro (do inglês *messenger RNA*)

NGF – Fator de crescimento neural (do inglês *nerve growth factor*)

NMDA – N-metil D-aspartato

NT3 – Neurotrofina 3 (do inglês *neurotrophin-3*)

NT4 – Neurotrofina 4 (do inglês *neurotrophin-4*)

p75NTR – Receptor de neurotrofina p75 (do inglês *p75 neurotrophin receptor*)

PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*)

PBS – Tampão fosfato-salina (do inglês *phosphate buffered saline*)

PI-3-Kinase – Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês *phosphoinositide 3-kinase*)

PKA – Proteína quinase dependente de cAMP (do inglês *cAMP Dependent Protein Kinase*)

PKC – Proteína quinase C (do inglês *protein kinase C*)

PLC- $\gamma$  – Fosfolipase C- $\gamma$  (do inglês *phospholipase C -  $\gamma$* )

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SPSS – do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*

siRNA – RNA de interferência (do inglês *small interfering RNA*)

STM – Memória de curta duração (do inglês *short-term memory*)

tPA – Ativador do plasminogênio tecidual (do inglês *tissue plasminogen activator*)

Trk – Receptor tirosina quinase (do inglês *tyrosine kinase receptor*)

TTBS – Tampão tween-tris-salina



## Sumário

1.	Introdução .....	37
1.1	Erros Inatos do Metabolismo	37
1.2	Doença da Urina do Xarope do Bordo	38
1.2.1	Histórico .....	38
1.2.2	Etiologia.....	38
1.2.3	Manifestações clínicas .....	41
1.2.4	Fisiopatologia .....	43
1.2.5	Diagnóstico e Tratamento .....	45
1.3	Modelo animal induzido da DXB	45
1.4	EIM e Neuropsiquiatria	46
1.5	Fatores Neurotróficos	47
1.6	Tianeptina	52
1.7	Justificativa	54
2.	Objetivos.....	55
2.1	Objetivos específicos	55
3.	Métodos .....	
3.1	Procedimento experimental	56
3.2	Pool de AACR (Modelo de DXB quimicamente induzido)	56
3.3	Testes comportamentais	57
3.3.1	Teste de anedonia.....	57
3.3.2	Teste do Nado forçado.....	58
3.4	Avaliação imunológica das neurotrofinas	59
3.5	Peso corporal e da glândula adrenal	60
3.6	Análise estatística	61

4. Resultados .....	62
4.1 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina, sobre a atividade locomotora de ratos. 62	
4.2 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina, sobre anedonia. 63	
4.3 Avaliação dos efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre o teste de nado forçado 64	
4.4 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre o peso da Glândula Adrenal 65	
4.5 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre os níveis de NGF 66	
4.6 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre os níveis de BDNF 68	
4.7 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre os níveis de proBDNF 69	
5. Discussão .....	71
6. Conclusões .....	81
Referências.....	82
ANEXO I.....	100

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) foram descritos em 1908 por Sir Archibald E. Garrod para descrever doenças como a alcaptonúria, no qual os indivíduos afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Através de suas observações, Garrod verificou o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos fluidos biológicos dos pacientes. Então ele postulou que estas doenças resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver et al., 2001). Os EIM quando analisados de forma individual são considerados raros, entretanto, quando analisados em conjunto são frequentes, e podem atingir um em cada mil nascidos vivos (Gimenez-Sanchez et al., 2001). De todas as doenças genéticas os EIMs correspondem a aproximadamente 10% e, atualmente, já foram descritos cerca de 500 distúrbios envolvendo defeitos na síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Gimenez-Sanchez et al., 2001). Esses defeitos hereditários do metabolismo ocorrem devido a anormalidades na síntese de uma proteína, geralmente uma enzima, e isto altera suas funções. A ausência ou a deficiência de atividade enzimática gera um bloqueio metabólico que conseqüentemente leva ao acúmulo de substratos e seus derivados. Este bloqueio pode gerar manifestações clínicas variáveis, de acordo com a rota afetada, e geralmente provoca sintomatologia grave, que na maioria das vezes afeta o sistema nervoso central (SNC) (Scriver et al., 2001).

## 1.2 Doença da Urina do Xarope do Bordo

### 1.2.1 Histórico

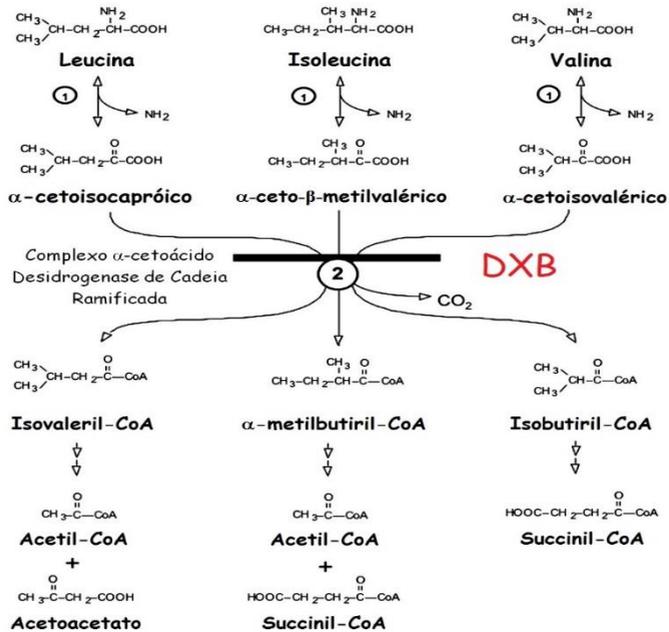
Em 1954, Menkes et al. observaram quatro pacientes com uma doença neurológica degenerativa, caracterizada por edema cerebral, convulsões, espasticidade e sofrimento respiratório, com início dos sintomas na primeira semana de vida e morte até o terceiro mês. Eles observaram também que a urina destes pacientes possuía forte odor de açúcar queimado e por isso a doença recebeu o nome de Doença do Xarope do Bordo (DXB). Em outro estudo, Westall et al. (1957) observaram outro paciente e encontraram concentrações elevadas dos aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina. Alguns anos depois, Menkes (1959) conseguiu isolar os  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, derivados destes aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), da urina dos pacientes com DXB. Já em 1960, Dancis et al. descreveram que o bloqueio metabólico na DXB ocorre na descarboxilação dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada.

### 1.2.2 Etiologia

A DXB pode ser caracterizada como um distúrbio de herança autossômica recessiva (Danner e Elsas, 1989; Nobukuni et al., 1991) causado pela deficiência na atividade do complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (CDCCR) (Figura 1). Esta deficiência leva a um bloqueio metabólico que resulta no acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina e de seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico (CIC), ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -

metilvalérico (CMV) e ácido  $\alpha$ -cetoisovalérico (CIV) (Chuang e Shih, 2001).

Nos mamíferos o complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR) encontra-se na membrana interna mitocondrial das células (Yeaman, 1986; Chuang e Shih, 2001). Este complexo multienzimático está envolvido na descarboxilação dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, valina e isoleucina (Parella et al., 1994; Chuang e Shih, 2001). O fluxo dos aminoácidos de cadeia ramificada usados para a obtenção de energia é regulado pela atividade deste complexo, sendo o passo irreversível da via catabólica, que possui três componentes catalíticos: uma  $\alpha$ -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada heterotetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ), ou E1; uma dihidrolipoil trasacilase (24 subunidades idênticas), ou E2; e uma dihidrolipoamida desidrogenase homodimérica, ou E3. Os componentes E1 e E2 são específicos para CDCCR enquanto a proteína E3 é também componente dos complexos  $\alpha$ -cetogluturato e piruvato desidrogenase (Reed e Hackert, 1990). Além disso, nos mamíferos o CDCCR apresenta duas enzimas regulatórias; uma cinase e uma fosfatase específicas que regulam a atividade do complexo através dos ciclos de fosforilação/defosforilação de dois resíduos de serina da subunidade E1 $\alpha$  (Eisenstein et al., 1991; Peinemann e Danner, 1994). O resultado final da reação da desidrogenase dos aminoácidos de cadeia ramificada é a produção de acil-CoA de cadeia ramificada, CO<sub>2</sub> e NADH na proporção de 1:1:1 (Danner et al., 1979).



**Figura 1.** Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina. As duas primeiras reações comuns são catalisadas pelas seguintes enzimas: transaminação reversível pela aminotransferase dos AACR (1) e a descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (2). Em destaque, demonstrando o bloqueio que ocorre na Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB), devido à deficiência do complexo α-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (Adaptado de Chuang e Shih, 2001).

### 1.2.3 Manifestações clínicas

A frequência mundial com base em dados de rastreamento de rotina de 26,8 milhões de recém-nascidos é de aproximadamente 1 em 185,000 (Chuang e Shih, 2001).

Pacientes com DXB podem apresentar manifestações clínicas variadas de acordo com fenótipo clínico da doença, que compreende desde a forma clássica severa até as formas variantes moderadas (intermediária, intermitente, responsiva a tiamina e deficiência de diidrolipoil desidrogenase –E<sub>3</sub>) (Tabela -1). Os principais sinais clínicos apresentados pelos pacientes com a forma clássica da DXB incluem cetoacidose, hipoglicemia, recusa alimentar, opistótono e disfunção neurológica, convulsões, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, entre outros. A presença de edema generalizado e hipomielinização/desmielinização no SNC também podem ser observados nestes pacientes, principalmente durante os episódios de descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001; Schönberger et al., 2004).

Na maioria dos pacientes com DXB pode ser observado encefalopatia com edema cerebral generalizado (Rosa et al, 2016). Também há relato de hipodensidade difusa no globo pálido e tálamo afetando a substância branca destas regiões, o que é um indicativo de hipomielinização (Treacy et al., 1992). Nos núcleos da base e substância negra observou-se perda neuronal considerável (Chuang e Shih, 2001). Recentemente, foram demonstrados através de exames radiológicos sinais aumentados em neuroimagens compatíveis com modificações no conteúdo aquoso na substância branca característica da desmielinização. As áreas mais afetadas são mesencéfalo, tronco cerebral, tálamo e o globo pálido (Schönberger et al., 2004).

O acúmulo de AACR e seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos também podem causar alterações

comportamentais (Scriever 2006). Walsh e Scott (2010) demonstram alterações no perfil neurocognitivo de uma paciente com DXB, no qual foi observado déficit no raciocínio não-verbal e visuo-espacial, e outras alterações como déficit de atenção, alteração no controle motor fino e prejuízo das funções executivas. Estudos utilizando injeções de leucina em modelos animais demonstraram déficit comportamental de longa duração em ratos submetidos a duas tarefas diferentes de aprendizado, no qual foi observada perdida consolidação da memória com comprometimento na formação da potencialização de longa duração (Referências). Além disso, Coitinho et al. (2001) observaram convulsões após a injeção intraestriatal de  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada em ratos adultos. Foi demonstrado por Scaini et al. (2012a) que animais submetidos a um modelo animal quimicamente induzido de DXB apresentam déficit de memória e aprendizado. Também foi demonstrado pelos mesmos autores que os efeitos comportamentais apresentados pelos animais submetidos ao modelo animal de DXB foram prevenidos pela coadministração de N-Acetilcisteína e deferoxamina, sugerindo que o déficit cognitivo provocado pelos AACR pode ser atribuído ao dano oxidativo causado pelos os radicais livres.

**Tabela 1.** Classificação dos fenótipos da DXB baseada nas manifestações clínicas e na atividade da enzima CDCCR.

<b>Fenótipo clínico</b>	<b>Manifestações clínicas</b>	<b>Atividade enzimática</b>
<b>Clássica</b>	Letargia, recusa alimentar, alterações neurológicas progressivas, cetose, hipoglicemia, convulsões e coma	0-2%
<b>Intermediário</b>	Atraso no desenvolvimento e/ou convulsões e cetoacidose	0-30%
<b>Intermitente</b>	Episódios de ataxia / cetoacidose precipitado por infecções	5-20%
<b>Responsivo à tiamina</b>	Similar à forma intermediária	2-40%
<b>Deficiência de E3</b>	Sem sintomas neonatais, hipotonia, acidose láctica, atraso no desenvolvimento	0-25%

Fonte: Adaptado de Chuang e Shih, 2001.

### 1.2.4 Fisiopatologia

A fisiopatologia dos sintomas neurológicos e os danos cerebrais dos pacientes com DXB são pouco esclarecidos. Alguns estudos em modelos animais demonstraram que os  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada e AACR inibem a captação de glutamato em concentrações similares a observada em pacientes com descompensação metabólica, sendo sugerido inclusive um mecanismo de inibição competitiva entre estes metabólitos (Reis et al.,

2000; Tavares et al., 2000). De acordo com Gibson e Blass (1976), o CIC é o mais tóxico dos  $\alpha$ -cetoácidos porque ele foi capaz de inibir o consumo de oxigênio cerebral e provocar deficiência na formação de mielina no cerebelo de ratos. Outros estudos demonstraram que o aumento de leucina sérica e CIC no espaço extracelular altera a concentração no SNC dos aminoácidos transportados pelo transportador dos aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L) que incluem a metionina, valina, isoleucina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamima (Araújo et al., 2001). Sendo assim, a biossíntese de alguns neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas e a serotonina poderiam ser comprometida pela diminuição na concentração de alguns aminoácidos no cérebro (Huang et al., 1996; Zielke et al., 1997). Outros achados mostraram que o excesso de leucina na dieta diminui a concentração de serotonina no cérebro (Yuwiler e Geller, 1965).

Funchal et al. (2004a) demonstraram, em cultura de astrócitos, que os  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada levam a morte celular em concentrações comparáveis as observadas em indivíduos afetados e que estão no estado de descompensação metabólica. Além disso, estudos têm demonstrado que os metabólitos acumulados na DXB podem comprometer a homeostase mitocondrial (Holiwell e Lee, 1963; Land et al., 1976; Danner e Elsas, 1989; Pilla et al., 2003; Sgaravatti et al., 2003; Ribeiro et al., 2008; Amaral et al., 2010), induzir estresse oxidativo (Bridi et al., 2003, 2005; Fontella et al., 2002; Barschak et al., 2006; Mescka et al., 2011), e apoptose (Jouvet et al., 2000a;b). Scaini et al. (2012b) demonstraram que tanto a administração aguda quanto a crônica de AACR aumenta a atividade da acetilcolinesterase em cérebro de ratos e alterações nos níveis de neurotrofinas (Scaini et al. 2013a, b).

### 1.2.5 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da DXB é feito através da identificação de altas concentrações plasmáticas e urinárias de leucina, isoleucina e valina, e seus respectivos  $\alpha$ -cetoácidos, por cromatografia de aminoácidos e ácidos orgânicos. Em pacientes sem tratamento o principal metabólito acumulado é a leucina, que pode atingir níveis plasmáticos de até 5 mM, enquanto a isoleucina e a valina atingem 1 mM (Zielke et al., 1996).

O tratamento para DXB consiste em uma dieta com restrição de proteínas, baixo conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada e suplementada com uma fórmula semi-sintética contendo aminoácidos essenciais (exceto os aminoácidos de cadeia ramificada), vitaminas e minerais. Esse tratamento reduz o acúmulo de metabólitos tóxicos, principalmente da leucina do CIC, minimizando seus efeitos deletérios ao SNC. O tratamento visa manter os níveis plasmáticos de leucina próximos aos valores de referência (77 a 153  $\mu\text{mol}$ ) ou no limite aceitável (100 a 300  $\mu\text{mol}$ ) sem causar danos ao paciente (Lepage et al., 1997; Morton et al., 2002). Porém, mesmo com tratamento, a disfunção neurológica pode ser observada em muitos pacientes, pois o desenvolvimento mental está relacionado à idade de início da terapia, à duração dos episódios de descompensação metabólica e ao cumprimento da dieta em longo prazo (Chuang Shih, 2001; Morton et al., 2002).

### 1.3 Modelo animal induzido da DXB

O modelo quimicamente induzido de DXB contendo uma solução de AACR preparada com um pool de AACR (leucina, isoleucina e valina) por via subcutânea pode contribuir para investigar os mecanismos de danos cerebrais característicos desta doença. Como os níveis plasmáticos de AACR são semelhantes aos encontrados em pacientes com DXB, com níveis no de AACR no SNC

comparáveis aos dos pacientes não tratados com DXB com a forma clássica da doença. Além disso, este modelo de DXB induzido quimicamente em ratos é de fácil desempenho e reproduz os níveis plasmáticos do AACR, bem como de muitos outros aminoácidos, como encontrado em pacientes com DXB (Bridi et al., 2006)

Outro modelo animal de indução da doença é através da hiperleucinemia induzida pela administração de Leucina à ratos jovens, onde pode-se observando na administração crônica a apresentação de um déficit de aprendizagem e memória (Mello et al., 1999). Parece que um aumento de Leucina no plasma leva à uma diminuição dos níveis de aminoácidos essenciais no plasma e no SNC, o que, por sua vez, compromete a síntese de importantes componentes encefálicos, sendo que este mecanismo possa ser um fator contributivo subjacente à disfunção neurológica característica dos pacientes com DXB (Araújo et al., 2001).

#### 1.4 EIM e Neuropsiquiatria

Manifestações neuropsiquiátricas em IEM são historicamente agrupadas em três grupos: aqueles que se apresentam agudamente como emergências (delírio e confusão), crônicos com flutuações nos sintomas psiquiátricos e aqueles que apresentam cenário de retardo mental leve. A identificação precoce dos sintomas psiquiátricos é crucial para evitar dano neurológico permanente. Além disso, sintomas psiquiátricos, dificuldades cognitivas e dificuldades de aprendizagem estão bem documentados em pacientes com erros inatos do metabolismo conhecidos, mesmo em um contexto de tratamento adequado (Pan e Vockley, 2013).

Até 80% dos casos de IEM são diagnosticados durante a infância, mas há um aumento no reconhecimento

de casos de início tardio, o que levou a realização de diagnósticos dos EIMs no adulto. Um número elevado desses EIMs de início tardio, em adultos, está associado com os sintomas semelhantes à esquizofrenia, incluindo, por exemplo, erros no metabolismo da homocisteína, distúrbios do ciclo da ureia, porfiria, doença de Wilson, xantomatose cerebrotendínea e Niemann-Pick tipo C (Bonnot et al., 2014).

Com o tratamento para DXB e a melhora na sobrevida desses pacientes, agora há um número crescente de adolescentes e adultos com DXB clássica. Efeitos na saúde mental e sua relação com variáveis de tratamento não foram totalmente caracterizados nesta população. No entanto, relatos sugerem que o envelhecimento dos pacientes com DXB aumenta o risco de problemas neuropsiquiátricos crônicos como: transtorno de déficit de atenção, depressão e ansiedade (Muelly et al., 2013). Entretanto os mecanismos subjacentes à neurotoxicidade deste EIM ainda não é totalmente compreendido (Scaini et al., 2013a).

### 1.5 Fatores Neurotróficos

As neurotrofinas são uma família de proteínas, inicialmente sintetizadas na forma de moléculas precursoras (pró-neurotrofinas), compostas por fatores regulatórios capazes de mediar à diferenciação e a sobrevivência de neurônios, bem como, modular a transmissão e plasticidade sináptica (Bibel e Barde, 2000; Kandratavicius et al., 2010). Fatores neurotróficos endógenos são conhecidos não só pela capacidade de aumentar a sobrevivência celular por prover o suporte trófico necessário para os neurônios, mas também por inibir a morte celular programada (Shaltiel et al., 2007) e por seu envolvimento com os processos cognitivos (Rybakowski et al., 2006). Como estes fatores são essenciais para o funcionamento e a sobrevivência neuronal, supõe-se que a viabilidade neuronal pode ser afetada pela

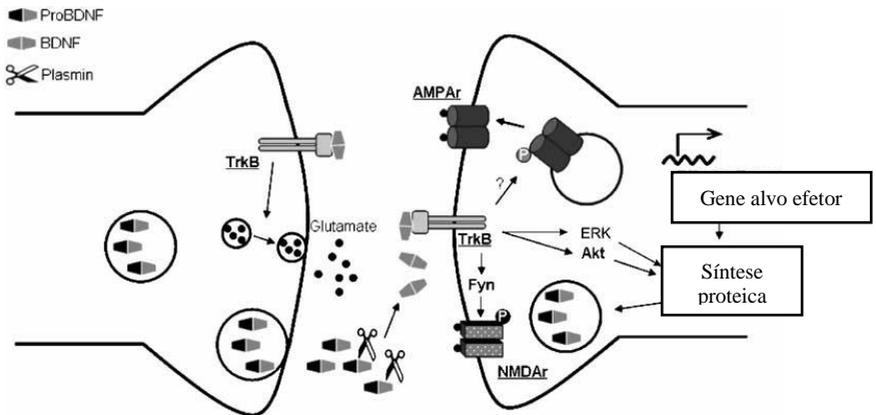
redução persistente dessas neurotrofinas no SNC (Du et al., 2003).

As neurotrofinas compreendem o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4 (NT-4). As formas maduras das neurotrofinas se ligam aos seus receptores tirosina-cinase específicos (Trk), promovendo a sua dimerização e ativação (Lim et al., 2003; Schechter et al., 2005). Já as pró-neurotrofinas apresentam afinidade ao receptor p75<sup>NTR</sup>. Geralmente, a ligação de neurotrofinas maduras ao receptor p75<sup>NTR</sup> desencadeia cascatas de sobrevivência neuronal, enquanto a ligação de pró-neurotrofinas neste mesmo receptor ativa cascatas apoptóticas (Kandravicius et al., 2010; Nurjono et al., 2012).

Através das neurotrofinas, as cascatas de Ras, Rap-1, MAPK (cinase ativada por mitógeno), PI-3-cinase (fosfatidilinositol-3-cinase) e PLC- $\gamma$  (fosfolipase C-C- $\gamma$ ) são ativadas. Estas vias de sinalização estão envolvidas nos mecanismos patológicos, e também na modulação da plasticidade fisiológica, como por exemplo, melhorando os processos de memória em roedores através da ativação da MAPK pelo NGF (Walz et al., 2000) (Figura 2). O NGF é essencial para o desenvolvimento, diferenciação, manutenção e sobrevivência de neurônios simpáticos e sensitivos derivados da crista neural (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968; Thoenen e Barde, 1980; Halegoua et al., 1991). Além disso, o NGF está envolvido em processos de plasticidade, não sendo identificada atividade para sobrevivência neuronal a não ser para neurônios colinérgicos (Rush et al., 1997; Mendell, 2001). Estudos recentes demonstraram que no SNC saudável as neurotrofinas regulam a plasticidade neuronal, provocando mudanças adaptativas na morfologia neuronal adulta (McAllister, 2000; Conner et al., 2009; Ohira e Hayashi, 2009), modulando as propriedades funcionais através de mecanismos pré-sinápticos e pós-sinápticos, e iniciando

respostas sinápticas rápidas (Kafitz et al., 1999; Elmariah et al., 2005).

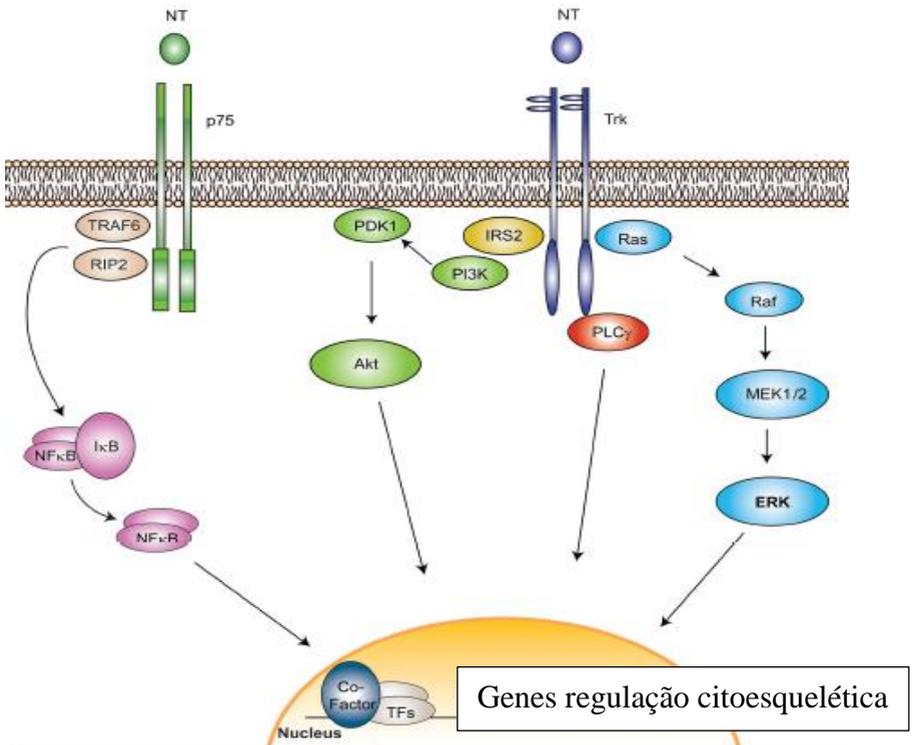
O BDNF é considerado a principal neurotrofina do cérebro e a mais abundante no SNC, produzido principalmente pela glia e pelos núcleos neuronais, apresentando grande expressão no hipocampo, induzindo efeitos neurotróficos e neuroprotetores de longo prazo (Murer et al., 2001). O BDNF promove a neurogênese, plasticidade sináptica e a sobrevivência celular (Lee et al., 2002), ele também atua na liberação de neurotransmissores, facilitando a liberação de glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina e serotonina (Tyler et al., 2002; Yoshii e Constantine-Paton, 2010).



**Figura 2:** O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) modula as sinapses glutamatérgicas através de alvos pré e pós-sinápticos. O proBDNF é segregado de uma forma regulada por atividade, processada por proteases extracelulares, como a plasmina, e atua nos receptores TrkB pré e pós-sinápticos. Presencialmente, o BDNF regula a liberação de glutamato, enquanto que as ações pós-sinápticas do BDNF incluem mudanças na fosforilação e síntese dos receptores de glutamato, mudanças na expressão

gênica e alterações locais na síntese protéica. (adaptado: Carvalho et al. 2008).

Estudos já demonstraram que o estresse crônico diminui os níveis de BDNF no SNC de ratos, e a sua expressão é aumentada em diferentes regiões cerebrais após tratamento crônico com fármacos antidepressivos e estabilizadores de humor (Hashimoto e Shimizu, 2004; Frey et al., 2006; Carreno e Frazer, 2014; Réus et al., 2014). Alguns estudos sugerem que os fatores neurotróficos podem estar envolvidos na fisiopatologia da DXB, já que os pacientes apresentam degeneração aguda e/ou crônica de estruturas cerebrais (Chuang e Shih, 2001; Schönberger et al., 2004). Além disso, Nitta et al. (2004) relataram que a leucina-isoleucina (Leu-Ile), um dipeptido hidrofóbico, induz a síntese de BDNF no estriado e em cultura de neurônios mesencefálicos. Por outro lado, o BDNF regula a expressão de mRNA da aminotransferase de AACR citosólica, enzima que catalisa a transaminação de AACR com  $\alpha$ -cetogluturato, o que resulta na produção  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada no cérebro (Castellano et al., 2006).



### Figura 3. Sinalização intracelular das neurotrofinas.

Neurotrofinas (NT), q incluem: BDNF, NGF, NT-3 e NT4 / 5; sinalizam através dos receptores Trk para ativar 3 caminhos principais, IRS-PI3K-Akt, Ras-MEK-ERK e PLC $\gamma$ . As neurotrofinas também sinalizam através do receptor p75 (p75NTR) para ativar várias cascatas intracelulares, incluindo o fator 4/6 (TRAF4/6) associado ao receptor de TNF (fator de necrose tumoral) ou a proteína 2 que interage com o receptor (RIP2) e NFκB. A ativação dessas vias afeta uma ampla gama de funções celulares, incluindo: diferenciação, sobrevivência, apoptose, crescimento e reorganização do citoesqueleto. (adaptado: Russo et al.,2008)

## 1.6 Tianeptina

Tianeptina é classificada farmacologicamente como um antidepressivo atípico (Jantas et al., 2014). Dados clínicos mostram que o tratamento com tianeptina tem um efeito positivo sobre os principais sintomas da depressão (WlaŸ et al., 2011).

Os primeiros estudos sugeriram que tianeptina aumentava a captação de serotonina, mas hoje se sabe que as ações dela como um antidepressivo estão além da modulação dos níveis de serotonina, não tendo efeito sobre os sistemas noradrenérgico ou dopaminérgico, mas dados pré-clínicos recentes indicam que a transmissão glutamatérgica possa ter um papel importante na atividade do antidepressivo (WlaŸ et al., 2011). A tianeptina teria como ação, influência sobre a plasticidade sináptica por meio da modulação da neurotransmissão glutamatérgica (Zoladz et al., 2008).

Seus mecanismos de ação desafiam claramente a hipótese de uma modulação imediata das monoaminas como ação antidepressiva. Ao invés disso, a tianeptina desencadearia uma cascata de adaptações celulares que, finalmente, levaria à eficácia antidepressiva. Entre essas adaptações sofridas, o aumento da fosforilação dos receptores de glutamato parece particularmente interessante. Os mecanismos glutamatérgicos desempenham um papel crucial nas funções de praticamente todos os principais estados depressivos. Além disso, o glutamato é um participante essencial em muitas formas de plasticidade adaptativa, incluindo aprendizagem e memória (McEwen et al., 2010).

Na literatura parece que, entre os antidepressivos, a tianeptina tem sido o mais extensamente investigado por seu efeito protetor e consistente contra o estresse, o qual poderia induzir à remodelação neuronal. A aprendizagem e memória podem ser consideradas como uma forma de

resposta a neuroplasticidade, de modo que os efeitos dos antidepressivos sobre estas habilidades seja objeto de estudo (McEwen et al., 2010).

As ações da tianeptina sobre o sistema glutamatérgico oferecerem novas perspectivas sobre como este composto pode ser útil no tratamento de distúrbios depressivos e neste caso, sintomas depressivos de pacientes com DXB (McEwen et al., 2010).

## 1.7 Justificativa

Tendo em vista que o tratamento da DXB não é específico, sendo meramente de suporte, e sabendo da dificuldade em obter o diagnóstico da maioria dos EIM, este grupo de pesquisa busca por melhores entendimentos sobre a fisiopatologia dos danos neurológicos e psiquiátricos apresentados por esses pacientes, possibilitando assim o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para os pacientes com DXB.

Levando em consideração que pacientes com EIM, incluindo a DXB, possuem alto risco para desenvolver problemas neuropsiquiátricos crônicos e que até o momento a fisiopatologia do dano cerebral desses pacientes ainda é pouco esclarecida, o propósito do presente trabalho é avaliar sintomas depressivos, bem como os níveis de neurotrofinas em ratos submetidos à administração crônica de AACR durante o desenvolvimento e também a influência da administração da tianeptina nas tarefas comportamentais e nos parâmetros neuroquímicos, buscando elucidar os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo dano neurológico encontrado nos pacientes portadores da DXB e uma nova estratégia terapêutica para esses pacientes.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo fo avaliar os sintomas tipo depressivos e os níveis de neurotrofinas em ratos submetidos à administração crônica de AACR durante o desenvolvimento e também a influência da administração da tianeptina nas tarefas comportamentais e nos parâmetros neuroquímicos.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos comportamentais (anedonia e imobilidade) após a administração crônica de um *pool* de AACR (leucina, isoleucina e valina) em ratos Wistar, e o efeito da tianeptina como uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da DXB.
- Avaliar o peso corporal e da glândula adrenal após a administração crônica de um *pool* de AACR (leucina, isoleucina e valina) em ratos Wistar, e o efeito da tianeptina como uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da DXB.
- Avaliar os níveis de neurotrofinas (BDNF, proBDNF e NGF) em tecido cerebral (córtex cerebral, hipocampo e estriado) de ratos Wistar após a administração crônica de um *pool* de AACR (leucina, isoleucina e valina), e o efeito da tianeptina como uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da DXB.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 Procedimento experimental

Foram utilizados 120 ratos Wistar machos (10-15 g) com 7 dias de idade provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Foram utilizados 60 animais em cada teste comportamental (2 testes). Para cada teste, os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o protocolo de administração (n=15 animais por grupo), conforme descrito abaixo:

**Grupo 1:** Controle (administração salina) + Salina

**Grupo 2:** Controle (administração salina) + Tianeptina 15 mg/kg

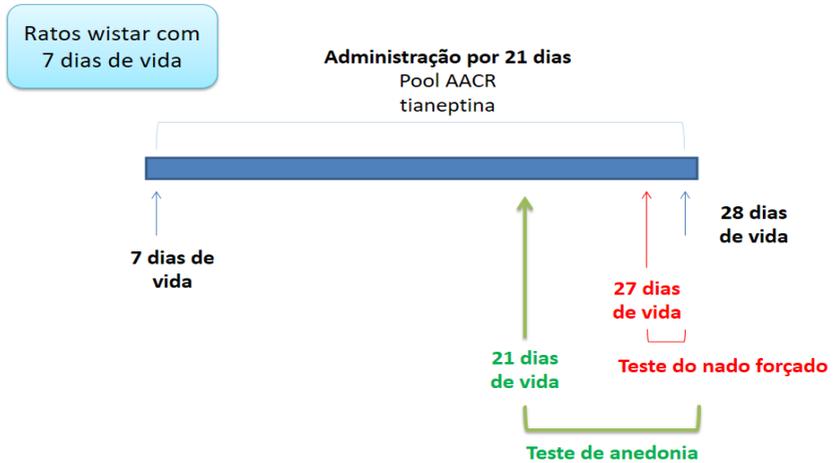
**Grupo 3:** DXB + Salina

**Grupo 4:** DXB + Tianeptina 15 mg/kg

#### 3.2 Pool de AACR (Modelo de DXB quimicamente induzido)

Os animais receberam duas administrações (12/12h) por via subcutânea do *pool* de AACR (15.8  $\mu\text{L/g}$  do peso corporal) contendo leucina 190 mmol/L, isoleucina 59 mmol/L e valina 69 mmol/L em solução salina (0.85% NaCl) a partir do 7º dia de vida durante 21 dias (Bridi et al. 2006). No 7º dia de vida, imediatamente após a administração do *pool* de AACR no período da manhã, os animais foram submetidos à administração de tianeptina, 15 mg/kg, intraperitoneal, uma vez ao dia, durante 21 dias (Della et al., 2012) (Figura 1).

## Esquema 1



**Figura 4.** Desenho experimental da pesquisa

### 3.3 Testes comportamentais

#### 3.3.1 Teste de anedonia

O consumo de alimentos doces foi avaliado, em todos os grupos, durante 7 dias (21º dia de vida até o 28º dia de vida). Para a realização deste teste, usou-se o *Open Field*, onde o teste foi realizado em uma caixa de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas. Dez *Froot Loop(s)* (Kellogg's® - cereal de trigo,

milho e açúcar) foram colocados em uma das extremidades da caixa. Os animais foram submetidos a cinco ensaios de 3 minutos, uma vez por dia, durante 5 dias, para se familiarizar com os alimentos (PN 21-26). Depois de habituados, os animais foram expostos a duas sessões de teste de 3 minutos cada, no qual o número de Froot Loops® ingeridos será medido (PN 27-28). Os resultados foram observados quando o animal comeu 1, 1/2 ou 1/4 de Froot Loops®.

Durante os 5 primeiros dias, os animais foram expostos a um jejum de 22 horas antes da contagem de Froot Loops, depois os animais foram expostos a uma alimentação padrão durante 2 h. No entanto, nas sessões de teste (últimos dois dias), os animais não estavam em jejum. Estas avaliações foram realizadas porque a privação de alimentos, utilizada em muitas tarefas comportamentais como um estímulo motivador, também pode ser um estressor agudo (Katz et al, 1981a.; Gamaro et al. 2003). A privação de comida eleva os níveis séricos de cortisol e reduz a atividade dopaminérgica após alimentação (Pothos, 1995).

Os testes de comportamento foram realizados pela mesma pessoa para o grupo experimental. O número de cruzamentos de linhas pretas e levantamentos foram avaliados durante a primeira sessão (DP 21) para avaliar a atividade motora. Após o último teste os animais foram levados a eutanásia por decapitação e as estruturas cerebrais (córtex cerebral, hipocampo e estriado) e a glândula adrenal foram dissecadas e isoladas para avaliações dos parâmetros imunológicos.

### **3.3.2. Teste do Nado forçado**

O tempo de imobilidade no teste do nado forçado foi avaliado durante 2 dias (27º dia – treino / 28º dia teste). Este teste foi realizado de acordo com estudo anterior descrito por Porsolt et al. (1977) e utilizado como modelo para avaliar o comportamento tipo depressivo.

Resumidamente, o teste envolve duas exposições a um tanque cilíndrico de água em que os ratos não podem tocar o fundo e do qual não podem escapar. O reservatório é feito de Plexiglas transparente, com 80 cm de altura e 30 cm de diâmetro, e é preenchido com água (22-23 °C) a uma profundidade de 40 cm. Para a primeira exposição, os ratos foram colocados na água durante 15 minutos (sessão treino). Após 24 horas, os ratos foram colocados novamente na água para uma sessão de 5 minutos (sessão teste). O tempo de imobilidade foi analisado na sessão teste. Após o último teste os animais foram levados a eutanásia por decapitação e as estruturas cerebrais (córtex cerebral, hipocampo e estriado) foram dissecadas e isoladas para avaliações dos parâmetros imunoquímicos.

### 3.4 Avaliação imunoquímica das neurotrofinas

As dosagens de BDNF maduro, pro-BDNF, NGF maduro, pro-NGF, foram realizadas por Western Blotting. Primeiramente as estruturas cerebrais (córtex cerebral, hipocampo e estriado) foram homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol). As concentrações de proteínas foram analisadas pelo método de Lowry et al. (1951) e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína. Foram utilizados 30 µg de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) para a eletroforese em gel monodimensional em um sistema descontínuo com 10 a 15% de gel. As proteínas separadas foram, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. A carga de proteína e a eficiência da transferência foram verificadas com coloração Ponceau S. Logo após, os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados por uma hora de incubação com solução

bloqueadora (5% albumina) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos pro-BDNF, BDNF maduro e NGF maduro. Após a incubação, o anticorpo primário foi removido e as membranas foram lavadas 4 vezes durante 15 min. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:2500) foram aplicados à membrana e uma incubação por 2 horas à temperatura ambiente foi realizada e as membranas foram lavadas novamente. Logo após, as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS – Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce). A quantificação das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab (Bio-Rad). Seguidamente, a membrana foi submetida ao processo de ‘stripping’ e foi incubada com um anticorpo contra  $\beta$ -actina na presença de 5% de leite. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:10000) foram aplicados à membrana e uma incubação por 1 hora à temperatura ambiente foi realizada e as membranas foram lavadas novamente. Finalmente, as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS – Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce). A densitometria das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab (Bio-Rad). SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen) foi utilizado como um marcador de peso molecular para certificar-se de que as faixas corretas foram analisadas.

### 3.5 Peso corporal e da glândula adrenal

O peso corporal foi medido antes da administração do *pool* AACR (dia 0), e 22 dias (dia 22) após a primeira administração do *pool* AACR. No dia 22, após o consumo do alimento doce, os ratos foram levados a eutanásia por

decapitação e a glândula adrenal foi removida através de laparotomia e pesada em balança analítica (Krishnan e Nestler, 2008; Katz et al., 1981b; Nestler et al., 2002; Gamaro et al., 2003).

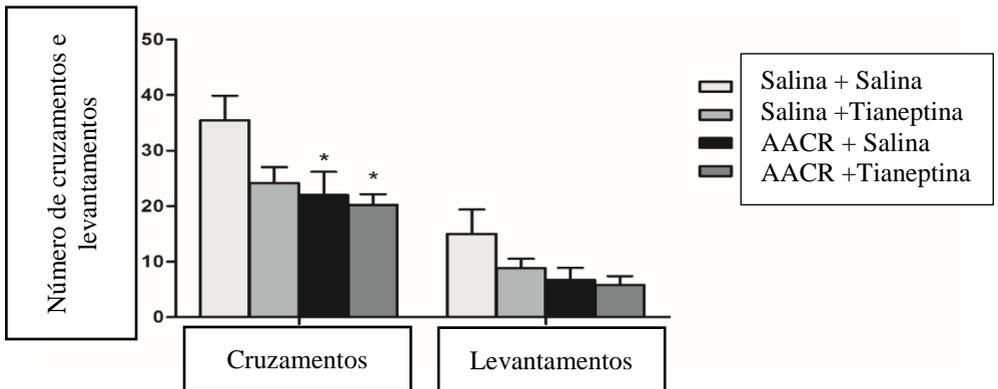
### 3.6 Análise estatística

A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentada pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados apresentaram uma distribuição normal, para comparação de três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para análise dos dados obtidos na determinação dos efeitos imunoquímicos dos compostos testados. Enquanto nos dados obtidos na análise comportamental de uma variável quantitativa dependente de duas variáveis qualitativas foi utilizado ANOVA de duas vias. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS versão 17.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina, sobre a atividade locomotora de ratos.

Pode-se observar que ratos submetidos ao modelo animal de DXB (AACR+salina) apresentam uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) de números de cruzamentos em relação ao controle, sendo também percebido mesmo resultado naqueles em que houve administração concomitante de AACR+Tianeptina ( $p < 0,05$ ). Entretanto, quando analisado os números de levantamentos, não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação (Figura 4).

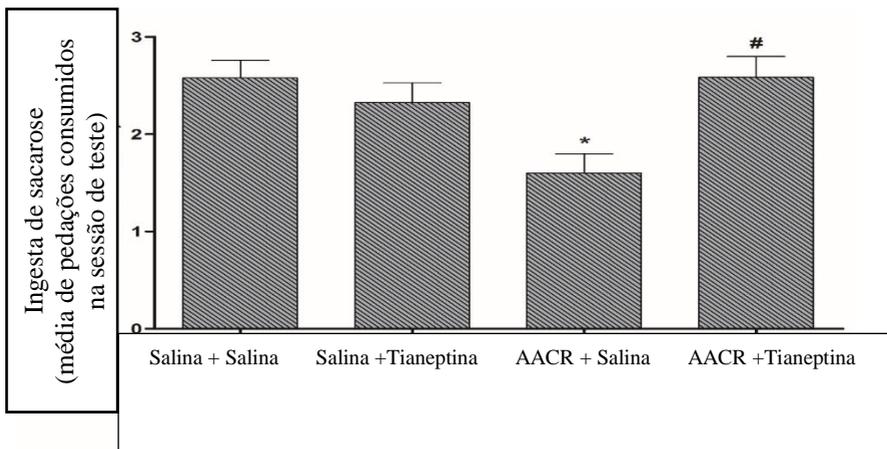


**Figura 5- Avaliação da atividade locomotora em ratos submetidos à administração crônica de AACR e com uso concomitante de Tianeptina.** Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. Testes para determinar a normalidade e variâncias iguais foram realizados para examinar se os dados se qualificaram para testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ), com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais,  $p > 0,05$ ). Portanto, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de

uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.2 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina, sobre anedonia.

Quando avaliou-se o consumo de sacarose no modelo animal de DXB (AACR + salina) percebe-se uma queda considerável do consumo de sacarose ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo controle. Este efeito foi melhor ( $p < 0,05$ ) no grupo DXB tratado (AACR + Tianeptina), retornando à níveis semelhantes ao do grupo controle (salina + salina) (Figura 5).



**Figura 6- Avaliação da anedonia em ratos submetidos à administração crônica de AACR e com uso concomitante de Tianeptina.** Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. Testes para determinar a normalidade e variâncias iguais foram realizados para examinar se os dados se qualificaram para testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos

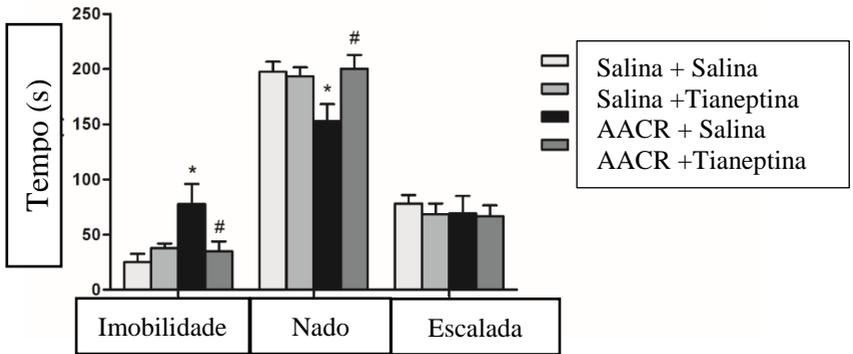
normalmente (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ), com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais,  $p > 0,05$ ). Portanto, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.3 Avaliação dos efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre o teste de nado forçado

Durante o teste de nado forçado os ratos em que houve administração de AACR + salina apresentaram um maior tempo de imobilidade ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle (salina + salina). Nos animais em que a Tianeptina foi administrada concomitantemente com os AACR foi percebido resultado semelhante aos do grupo controle, diminuindo a imobilidade ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo DXB (AACR + salina) (Figura 6).

Quanto ao tempo de natação os resultados mostraram uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo DXB (AACR + salina) quando comparado ao grupo controle. O grupo DXB+Tianeptina melhorou este aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo DXB, atingindo efeito semelhantes ao do grupo controle (Figura 6).

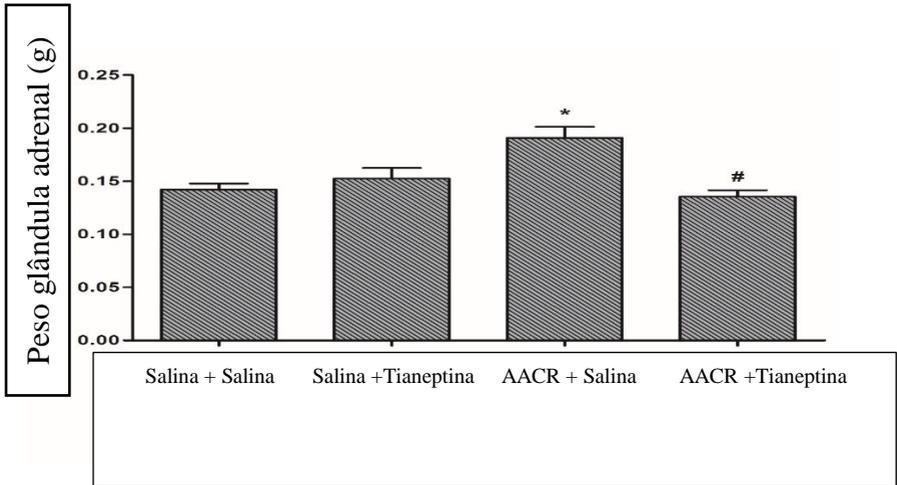
Nas tentativas de escaladas não houve dados estatisticamente significativos (Figura 6).



**Figura 7- Avaliação do teste de nado forçado em ratos submetidos à administração crônica de AACR e com uso concomitante de Tianeptina.** Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. Testes para determinar a normalidade e variâncias iguais foram realizados para examinar se os dados se qualificaram para testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ), com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais,  $p > 0,05$ ). Portanto, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre o peso da Glândula Adrenal

A análise do peso da glândula adrenal mostrou um aumento do peso ( $p < 0,05$ ) da glândula nos ratos submetidos ao modelo animal de DXB quando comparado ao grupo controle. no grupo DXB+Tianeptina, o peso foi semelhante ao grupo controle porém estatisticamente menor ( $p < 0,05$ ) que o grupo DXB (Figura 7).

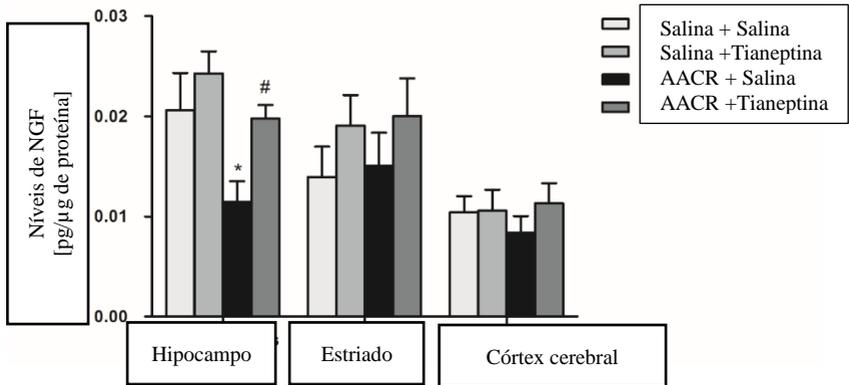


**Figura 8- Avaliação do peso da Glândula Adrenal em ratos submetidos à administração crônica de AACR e tratados com Tianeptina.** Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. Testes para determinar a normalidade e variâncias iguais foram realizados para examinar se os dados se qualificaram para testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ), com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais,  $p > 0,05$ ). Portanto, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.5 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre os níveis de NGF

Quando os níveis de NGF foram avaliados, foi observado, nas diferentes estruturas cerebrais, que no grupo DXB doença (AACR+ salina) houve uma diminuição

considerável ( $p < 0,05$ ) nos níveis presentes no hipocampo. O grupo DXB+ Tianeptina induziu níveis de NGF no hipocampo similares aos do grupo controle (salina+salina), mas quando comparado ao grupo DXB + salina apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de NGF no hipocampo. Tanto no estriado quanto no córtex cerebral, não ocorreram mudanças significativas dos níveis de NGF nos diferentes grupos avaliados (Figura 8).



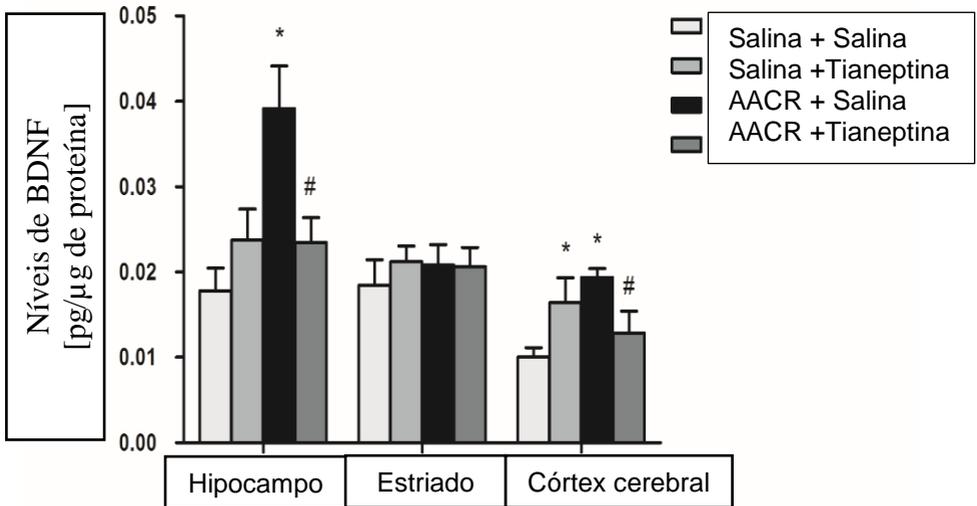
**Figura 9. Avaliação dos níveis de NGF [pg/μg de proteína] em ratos submetidos à administração crônica de AACR e tratados com Tianeptina.** Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. Testes para determinar a normalidade e variâncias iguais foram realizados para examinar se os dados se qualificaram para testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ), com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais,  $p > 0,05$ ). Portanto, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.6 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre os níveis de BDNF

Novamente foram avaliadas nas três estruturas cerebrais nos diferentes grupos os níveis de BDNF. No hipocampo o grupo DXB doença (AACR + salina) os níveis de BDNF foram aumentados ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (salina+salina). Enquanto no grupo que recebeu administração de AACR +Tianeptina apresentou níveis mais baixos ( $p < 0,05$ ) comparados ao AACR + salina, com níveis praticamente idênticos aos do grupo controle (Figura 9).

Na análise dos níveis de BDNF no estriado não foram encontradas diferenças significativas dos resultados nos diferentes grupos pesquisados (Figura 9).

Ao analisar os níveis de BDNF no córtex cerebral percebe-se que tanto o grupo que recebeu a Tianeptina isolada (tianeptina+ salina) quanto o grupo DXB (AACR + salina) obtiveram maiores níveis de BDNF ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle (salina+salina). Na mesma estrutura, porém no grupo DXB tratado (AACR+ Tianeptina), pode-se observar níveis menores de BDNF ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos encontrados nos grupos Tianeptina + salina e AACR + salina , alcançando níveis similares ao do grupo controle (Figura 9).

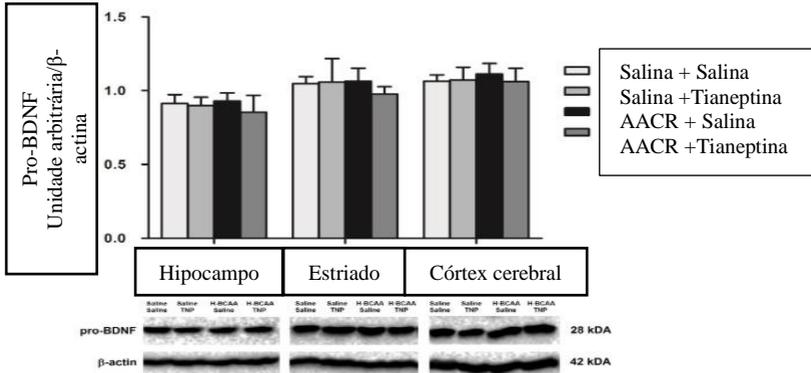


**Figura 10- Avaliação dos níveis de BDNF [pg/ $\mu$ g de proteína] em ratos submetidos à administração crônica de AACR e tratados com Tianeptina.** Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. Testes para determinar a normalidade e variâncias iguais foram realizados para examinar se os dados se qualificaram para testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ), com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais,  $p > 0,05$ ). Portanto, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### 4.7 Efeitos da administração crônica de AACR e tratamento com Tianeptina sobre os níveis de proBDNF

Também foram analisados os níveis de proBDNF em três diferentes regiões cerebrais: córtex, estriado e

hipocampo. Não foram encontradas qualquer alteração significativa desta proteína no tecido cerebral, seja no grupo DXB ou nos demais (Figura 10).



**Figura 11. Avaliação dos níveis de proBDNF (arbitrary units/ $\beta$ -actin) em ratos submetidos à administração crônica de AACR e tratados com Tianeptina.** Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. Testes para determinar a normalidade e variâncias iguais foram realizados para examinar se os dados se qualificaram para testes estatísticos paramétricos. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ), com variâncias iguais entre as amostras (teste de variâncias iguais,  $p > 0,05$ ). Portanto, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Post Hoc Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

Com o avanço na terapia de DXB, principalmente através da dieta e do transplante de fígado, o risco de desenvolver ataques agudos caiu acentuadamente e o dano crônico da exposição aos aminoácidos e AACR tomou grande importância (Muelly et al. 2013). Uma alta prevalência de transtornos neuropsiquiátricos em pacientes com MSUD e outros EIM tem sido relatada nos últimos anos (Sedel et al., 2017; Strauss et al., 2010) e ainda não há entendimento completo sobre o assunto. A depressão, a ansiedade, a hiperatividade e os déficits cognitivos são alguns dos distúrbios comuns (Muelly et al., 2013; Strauss et al., 2015).

A depressão como um transtorno complexo neurocomportamental, com uma fisiopatologia complexa caracterizado por heterogêneos sintomas e mecanismos patogênicos não totalmente conhecidos. Têm dentre os processos que contribuem para o desenvolvimento do transtorno a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), caracterizado por níveis elevados de cortisol possivelmente relacionados à redução da expressão do receptor de glicocorticóides (GR), levando à um aumento da atividade do eixo HPA (Brigitta et al., 2002; Molteni et al., 2010; Piroli et al., 2013). Embora a teoria das monoaminas postule que a diminuição da concentração sináptica de neurotransmissores como a norepinefrina, a dopamina e a serotonina sejam os principais fatores de depressão maior (Brigitta et al., 2002; Piroli et al., 2013), estudos da última década enfatizam que o sistema glutamatérgico cerebral esteja envolvido na etiologia da depressão, e as drogas que atuam nesse foco estão atualmente sendo exploradas como novos medicamentos antidepressivos (Gulyaeva, 2017).

Foram avaliados os comportamentos tipo depressivos nos animais submetidos ao modelo DXB. Foi observado um aumento da anedonia, tempo de imobilidade e redução da natação nestes animais. Foi observado redução

dos cruzamentos dos animais submetidos à DXB e DXB + tianeptina, isso poderia indicar efeito sedativo da administração do DXB. Porém avaliou-se também a anedonia, o que mostrou que DXB induz anedonia, confirmando o efeito depressogênico induzido por DXB. Corroborando com os achados clínicos encontrados nos pacientes com este EIM, demonstrando que a exposição crônica pode estar associada ao aparecimento e desenvolvimento de sintomas tipo depressivos (Muelly et al, 2013). Sabe-se que pacientes com encefalopatia causada pela DXB no momento do diagnóstico tem cinco e dez vezes mais chances de desenvolverem ansiedade e depressão, respectivamente (Couce et al.,2015).

Há evidências que os aminoácidos de cadeia ramificada atuam como doadores de nitrogênio nos tecidos periféricos, particularmente no músculo esquelético, onde há um sítio importante para a transaminação dos AACR (Bonfils et al, 2000). A transaminação de leucina muscular, derivada tanto da degradação da proteína do músculo esquelético quanto da absorção de leucina aumentada pela insulina, apoia a formação de glutamato, que, por sua vez, é transaminado para produzir alanina (Yudkoff , 2017) (Figura 11).

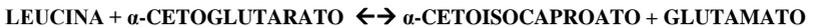


Figura 12. Transaminação bidirecional da leucina e do glutamato. Com o aumento da leucina encontrada nos pacientes com DXB, a reação seria deslocada para a maior produção de glutamato. (Yudkoff, 2017)

Os AACR, e particularmente a leucina, são conhecidos por atravessar a barreira hematoencefálica rapidamente tendo um papel importante na oxidação e síntese do neurotransmissor excitatório glutamato no cérebro (Hutson et al.,2001). A manutenção de um meio bioquímico constante apresenta desafios especiais para o cérebro concentrando esses compostos dentro de uma série de compartimentos intracelulares para maximizar a relação após sua liberação na sinapse e para evitar a neurotoxicidade que acompanha um aumento indesejável da concentração extracelular (Hutson et al.,2001; Funchal et al.,2002; Yudkoff , 2017). A causa do dano cerebral no DXB é multifatorial, mas as evidências sugerem que os próprios fatores que fizeram contribuições vitais dos AACR para uma função neurológica saudável tornaram-se agentes destrutivos e tóxicos se esses aminoácidos e  $\alpha$ -cetoácidos estiverem presentes em quantidade excessiva (Hutson et al.,2001). A hiperleucinemia inibe o transporte de tirosina, triptofano e outros aminoácidos essenciais em toda a barreira hematoencefálica e, portanto, limita a disponibilidade de substrato para catecolamina cerebral, serotonina e síntese proteica (Morris e Leonard, 2015; Strauss et al.,2010). O glutamato, por exemplo, desempenha um papel importante na neurotransmissão, plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (Dong et al.,2017).

O estresse e a depressão são frequentemente relacionados. Modelos animais mostraram que o estresse leve crônico induz à um espectro de anormalidades comportamentais em roedores similares aos comportamentos tipo depressivos, incluindo diminuição da ingestão de sacarose e anedonia, diminuição da motivação, diminuição da higiene e alterações no sono. O estresse, a perda ou o traumatismo precoce podem levar ao desenvolvimento de um viés negativo que confere uma vulnerabilidade cognitiva ao paciente, aumentando o risco de desenvolver depressão em resposta a estressores futuros ou crônicos. (Dean e Keshavan, 2017). O estresse precoce

tem um efeito duradouro no eixo HPA, causando uma sensibilidade biologicamente determinada aos estressores posteriores, bem como, fatores psicológicos patológicos que predisõem a afecções depressivas. Assim, o estresse pode levar a mudanças no desenvolvimento neurológico nos circuitos de processamento afetivo, induzindo uma predisposição biológica à depressão na vida adulta (Hanson et al., 2015).

Verificou-se um peso aumentando da glândula adrenal no modelo animal de DXB (BCAA+salina), sugerindo uma alta atividade com possível aumento da produção e liberação de glicocorticóides. Isso está de acordo com o processo de estresse crônico gerado pelo excesso de AACR no SNC e também com os achados neuropsiquiátricos citados anteriormente, corroborando com o quadro encontrado nos pacientes com DXB, principalmente na vida adulta.

Na patogênese da DXB investigações pré-clínicas em animais indicam que AACR diminuem os níveis de BDNF em cérebro dos ratos (Scaini et al., 2016). Há evidências acumuladas para o envolvimento do BDNF, um mediador chave da proliferação neuronal, diferenciação, sobrevivência e resposta ao estresse (Dwivedi, 2013; Dean e Keshavan, 2017). Tanto os glicocorticóides quanto o BDNF como estão envolvidos na função neuronal e a fisiopatologia da depressão (Numakawa et al.,2010). Os glicocorticóides demonstraram suprimir a interação com receptor TrkB, impedindo assim a via MAPK / Erk estimulada por BDNF (Gupta et al.,2007). A sinalização do BDNF é regulada negativamente por glicocorticóides o que prejudica a plasticidade sináptica no cérebro mediante a regulação negativa da densidade da coluna vertebral, neurogênese e potencialização a longo prazo. O BDNF é responsável pela regulação da atividade, estrutura e função sináptica, particularmente das sinapses glutamatérgicas (Gulyaeva, 2017). Embora essa evidência indique que o BDNF desempenha um papel crucial nos processos de

aprendizagem e memória, seus efeitos sobre a memória continuam controversos. Os modelos animais deficientes em BDNF apresentam dano na aprendizagem e memória, enquanto que o aumento da expressão crônica do BDNF também resultou em déficits de aprendizagem (Cunha et al., 2009)

No presente estudo foram avaliados os níveis de NGF e BDNF em três estruturas cerebrais diferentes (hipocampo, córtex cerebral e estriado). Encontrou-se níveis significativamente diminuídos de NGF no grupo DXB somente na estrutura cerebral do hipocampo, mantendo-se semelhantes aos do grupo controle nas demais estruturas analisadas. Já na avaliação do BDNF, os níveis de BDNF estavam aumentados no hipocampo comparados ao grupo controle, assim como no córtex cerebral, fato que pode ser decorrente da função que exerce essa neurotrofina: estimulando a sobrevivência neuronal quando em presença de uma modulação bioquímica, de neurotransmissores e hormônios estressores, trazendo dano ao sistema nervoso central (Molteni et al., 2010; Gulyaeva, 2017).

O RNAm de BDNF é acumulado em dendritos de neurônios do hipocampo, ativando o receptor de glutamato e estimulação de receptores de TrkB por BDNF endógeno. Foi relatado que altas doses de BDNF *in vitro* (em concentrações de 10 a 100 ng / ml) aceleram a necrose neuronal excitotóxica (Gwag et al., 1995). O cérebro exposto cronicamente à altas concentrações de AACR, pode gerar um aumento nos níveis de BDNF, esse aumento no BDNF pode estar relacionado ao comprometimento da memória espacial, causando déficit da memória em tarefas. Essa sobre-expressão do BDNF está associada à hiperexcitabilidade, e com isso pode contribuir para déficits de aprendizagem e plasticidade (Croll et al 1999). No entanto, é possível que o BDNF aumentado possa ser um efeito protetor em resposta à toxicidade do AACR (Scaini et al, 2012)

Os receptores ionotrópicos de glutamato medeiam a maior parte da transmissão sináptica excitadora no cérebro, onde também desempenham papéis fundamentais na plasticidade sináptica e na patologia. Os principais receptores são o  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico (AMPA) e N-metil-D -aspartato (NMDA). O BDNF mostrou inibir fortemente as correntes pós-sinápticas AMPA mediadas em um grande subconjunto de neurônios de recém-nascidos. Essas alterações induzidas por BDNF na atividade sináptica podem ser devidas à inserção ou remoção de AMPA de sinapses potenciadas e deprimidas ou a mudanças no estado de fosforilação dos receptores de glutamato do tipo AMPA (Wu et al., 2004). As evidências fisiológicas e bioquímicas implicam o NMDA como alvo para a modulação do BDNF. A exposição aguda ao BDNF aumenta rapidamente e reversivelmente a magnitude das correntes sinápticas mediadas pelo NMDA, aumentando especificamente a atividade do NMDA contendo a subunidade NR2B. Este efeito do BDNF é dependente da ativação dos receptores TrkB. Esses resultados proporcionaram um mecanismo potencial para o papel proposto para o BDNF na plasticidade sináptica dependente da atividade e, talvez, processos de aprendizagem e memória (Carvalho et al., 2008; Gulyaeva, 2017; Yudkoff, 2017).

Em relação ao pro-BDNF, os resultados do presente estudo não mostraram aumentos significativos inclusive no grupo BCAA+salina (modelo animal de DXB). As funções das neurotrofinas dependem de suas formas imaturas ou maduras e a ativação de dois tipos de receptores. P75 (receptor de neurotrofinas), uma proteína transmembranas do tipo 1, pertencente à superfamília do receptor de fator de necrose tumoral (TNF), é o receptor comum para neurotrofinas maduras e seus precursores, as pro-neurotrofinas (Namakawa et al., 2010). O BDNF é sintetizado em uma forma precursora (pro-BDNF), que é clivado para formar sua forma madura por clivagem

proteolítica. Ambos os pro-BDNF e BDNF são segregados e exibem efeitos opostos sobre a proliferação e a apoptose das células neurais. A função anti-apoptótica do BDNF é mediada por interações com o receptor TrkB de alta afinidade. Em contraste, a ligação ao BDNF com o receptor p75, induz a geração de apoptose.(Cruz-Morcillo et al., 2016). Talvez não foi encontrado um nível elevado desta neurotrofina por esta ser precursora do próprio BDNF e este apresentar-se elevado em algumas estruturas cerebrais do estudo.

Em virtude da preocupação dos danos neuronais causados pela exposição crônica dos AACR e leucina na DXB (Scaini et al, 2013) utilizou-se a Tianeptina em dois grupos nos experimentos. Tianeptina associada à salina e também um grupo que recebeu AACR + Tianeptina. Em relação ao comportamento observou-se que esse antidepressivo não reverteu o efeito causado pelo grupo AACR + salina em relação atividade locomotora de cruzamentos, mantendo ainda uma diminuição significativa desta atividade. Na ingesta de sacarose, teste de anedonia, houve uma melhora do comportamento anedônico induzido por DXB. Tianeptina reduziu o comportamento anedônico aos níveis semelhantes ao grupo controle, revertendo este comportamento depressivo, indicando efeito antidepressivo. O mesmo perfil foi observado no teste de nado forçado em que o tempo de imobilidade foi reduzido e houve um aumento do tempo de nado, indicando reversão pela tianeptina. Também foi percebido uma redução do peso da glândula adrenal comparado ao grupo DXB.

A tianeptina é um fármaco antidepressivo atípica. Os dados clínicos mostram que o tratamento com tianeptina tem uma influência positiva sobre os principais sintomas de depressão. Demonstrou-se que produz efeitos ansiolíticos sem qualquer efeito sedativo pronunciado, para promover a normalização do sono e para ser eficaz no tratamento da depressão leve a moderada (Wlaz et al.,2009). O conceito de déficit serotoninérgico na depressão é particularmente

desafiado pela droga tianeptina, um antidepressivo com semelhanças estruturais aos fármacos antidepressivos tricíclicos, mas com diferentes propriedades farmacológicas. Em vez disso, a tianeptina pode influenciar a expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica, através da modulação da neurotransmissão glutamatérgica. A eficácia da tianeptina no tratamento da depressão é de importância clínica, bem como conceitual, servindo como um desafio para o valor da hipótese da monoamina da depressão (Zoladz et al., 2008). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro que controla a excitabilidade e plasticidade sináptica na maioria dos circuitos cerebrais. Este neurotransmissor é um participante essencial em muitas formas de plasticidade adaptativa, incluindo aprendizado e memória. O estresse crônico mostrou aumentar a expressão do transportador de glutamato, o GLT-1, que é importante para remover o excesso de glutamato das regiões sinápticas, demonstrou que a tianeptina bloqueia o aumento induzido pelo estresse em níveis de GLT-1 no hipocampo. Em teoria, a tianeptina realiza esse feito normalizando os níveis de glutamato induzidos pelo estresse no hipocampo, removendo assim o estímulo (Zoladz et al., 2008). As ações da tianeptina no sistema glutamatérgico oferece uma alternativa no tratamento de distúrbios com sintomas depressivos, como a DXB. (McEwen et al, 2010)

A Tianeptina é um antidepressivo que protege o hipocampo contra os efeitos deletérios do estresse e dos glicocorticóides (Della et al., 2013; Uzbekov et al., 2009). Atualmente, o tratamento crônico com tianeptina mostrou atenuar os sintomas da depressão comportamental e ativação do eixo HPA (Della et al., 2013). Este fármaco modula a resposta neuroendócrina ao estresse (no eixo HPA), por regulação negativa dos GR1, seguida da diminuição da concentração do fator de liberação de corticotropina (CRF) no hipotálamo e hormônio

adrenocorticotrópico (ACTH) no plasma (Vučovic et al., 2009).

Os níveis de neurotrofinas também sofreram uma modulação no grupo que utilizou AACR associado à tianeptina, retornando ao nível normal o NGF no hipocampo quando comparados ao grupo DXB assim como do BDNF no hipocampo e também no estriado. O estudo dos efeitos do estresse sobre os fenômenos de plasticidade sináptica dependentes de BDNF mediada por receptores de glutamato no hipocampo de ratos é uma ferramenta útil para aprender mais sobre a patogênese de sintomas depressivos (Gulyaeva, 2017). A tianeptina pode promover a neuroplasticidade ao aumentar a expressão de genes de fatores neuroplásticos que são diminuídos em modelos animais de estresse. Estes incluem os genes para BDNF e NGF no hipocampo (Zoladz et al., 2008). Além disso, a tianeptina pode bloquear o aumento induzido pelo estresse nas correntes dos receptores glutamatérgicos NMDA, na região do hipocampo (McEwen et al, 2010).

No modelo animal de DXB do presente estudo, a relação entre BDNF pro e maduro pode ser a favor do primeiro. Esta proporção resulta em hiperativação geral dos receptores p75 de baixa afinidade e um envolvimento relativamente menor dos receptores TrkB de alta afinidade. Infelizmente, esta possibilidade parece ser bastante improvável com base em nos resultados do presente estudo. Na verdade, encontrou-se aumentos muito significativos nos níveis totais de BDNF sem alterações significativas nos níveis de proteínas pro-BDNF. Esses resultados sugerem que quando o cérebro é exposto cronicamente a altas concentrações de AACR, ocorre um aumento nos níveis de BDNF, uma neurotrofina crítica, que regula muitos aspectos neuronais, incluindo: diferenciação celular, sobrevivência celular, neurotransmissão e plasticidade sináptica no sistema nervoso central (Numakawa et al. 2010). Esse aumento no BDNF pode estar relacionado ao comprometimento da memória espacial. No entanto, é

possível que o BDNF aumentado possa ser um efeito protetor em resposta à toxicidade do AACR para manutenção da sobrevivência celular, por exemplo (Scaini et al., 2013).

## **6. CONCLUSÕES**

O modelo animal DXB induziu comportamentos tipo depressivos em ratos. O antidepressivo Tianeptina demonstrou efeito benéfico no tratamento das alterações comportamentais e imunoquímicas induzidas pelo DXB. Tianeptina foi capaz de modular o eixo HPA, melhorando também os níveis das neurotrofinas, com isso melhorando os comportamentos tipo depressivos nos animais. Este estudo indica potencial terapêutico da tianeptina em pacientes DXB.

**REFERÊNCIAS**

- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG., Seminotti B, Schuck PF, Wajner M. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res.* 2010; 1324: 75-84.
- Araújo P, Wassermann GF, Tallini K, Furlanetto V, Vargas CR, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem International.* 2001; 38(6):529-537.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Olivera MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 2006; 21:279-86.
- Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 2000; 14:2919-2937.
- Bonfils J, Faure M, Gibrat JF, Glomot F, Papet I. Sheep cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase: cDNA cloning, primary structure and molecular modelling and its unique expression in muscles. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1494:129–136. [PubMed: 11072075]
- Bonnot O, Klünemann HH, Sedel F, Tordjman S, Cohen D, Walterfang M. Diagnostic and treatment implications of psychosis secondary to treatable metabolic disorders in adults: a systematic review. *Orphan J Rare Dis.* 2014; 9 (65): 2-14.
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple

- syrup urine disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2003; 21:327-32.
- Bridi R, Fontella FU, Pulrolnik V, Braun CA, Zorzi GK, Coelho D, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS. A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Methods.* 2006; 155:224-30.
- Bridi R, Latini A, Braun CA, Zorzi GK, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS. Evaluation of the mechanisms involved in leucine induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res.* 2005; 39:71-9.
- Brigitta B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues Clin Neurosci [Internet].* 2002;4(1):7–20.
- Carreno FR, Frazer A. Activation of signaling pathways downstream of the brain-derived neurotrophic factor receptor, TrkB, in the rat brain by vagal nerve stimulation and antidepressant drugs. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; 17:247-258.
- Carvalho AL<sup>1</sup>, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br J Pharmacol.* 2008 Mar;153 Suppl 1:S310-24.
- Castellano S, Macchi F, Scali M, Huang JZ, Bozzi Y. Cytosolic branched chain aminotransferase (BCATc) mRNA is up-regulated in restricted brain areas of BDNF transgenic mice. *Brain Res.* 2006; 1108:12-18.
- Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver, CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D, editores. *The metabolic and Molecular*

- Bases of Inherited Disease. 8 ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Coitinho AS, de Mello CF, Lima TT, de Bastiani J, Figuera MR, Wajner M. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Res.* 2001; 894:68-73.
- Conner JM, Franks KM, Titterness AK, Russell K, Merrill DA, Christie BR, Sejnowski TJ, Tuszynski MH. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J Neurosci.* 2009; 29:10883-10889.
- Couce ML, Ramos F, Bueno MA, Díaz J, Meavilla S, Bóveda MD, Fernández-Marmiesse A, García-Cazorla A ; Evolution of maple syrup urine disease in patients diagnosed by newborn screening versus late diagnosis. *Eur J Paediatr Neurol.* 2015 Nov;19(6):652-9. doi: 10.1016/j.ejpn.2015.07.009. Epub 2015 Jul 20
- Croll SD, Suri C, Compton DL (1999) Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93:1491–1506
- Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A (2009) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiol Dis* 33:358–368
- Dancis J, Hutzler J, Levitz M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1960; 23:342-3.
- Danner DJ, Elsas LJ. Disorders of branched chain amino acids and keto acid metabolism. In: Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic basis of inherited disease.* 6 ed. New York: McGraw-Hill; 1989.

- Danner DJ, Lemmon SK, Besharse JC, Elsas LJ. Purification and characterization of branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1979; 254 (12):5522-6.
- De la Cruz-Morcillo MA, Berger J, Sánchez-Prieto R, Saada S, Naves T, Guillaudeau A, Perraud A, Sindou P, Lacroix A, Descazeaud A, Lalloué F, Jauberteau MO. p75 neurotrophin receptor and pro BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2016 Jun 7;7(23):34480-97.
- Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr.* 2017 Jun;27:101-111.
- Della fp , abelaira hm, réus gz, ribeiro kf, ar, scaini g, jeremias ic, dos santos lm, jeremias gc, streck el, quevedo j. Tianeptine treatment induces antidepressive-like effects and alters bdnf and energy metabolism in the brain of rats. *Behav brain res.* 2012; 233(2):526-35.
- Della FP, Abelaira HM, Réus GZ, Santos MA, Tomaz DB, Antunes AR, Scaini G, Morais MO, Streck EL, Quevedo J. Treatment with tianeptine induces antidepressive-like effects and alters the neurotrophin levels, mitochondrial respiratory chain and cycle Krebs enzymes in the brain of maternally deprived adult rats. *Metab Brain Dis.* 2013 Mar;28(1):93-105.
- Dong Y, Kalueff AV, Song C. N-methyl-d-aspartate receptor-mediated calcium overload and endoplasmic reticulum stress are involved in interleukin-1 $\beta$ -

- induced neuronal apoptosis in rat hippocampus. *J Neuroimmunol.* 2017 Jun 15; 307:7-13.
- Du J, Gould TD, Manji HK. Neurotrophic signaling in mood disorders. In: Gutkind JS, editor. *Signal transduction and human disease.* John Wiley & Sons. 2003. p. 411-446.
- Dwivedi Y. Involvement of brain derived neurotrophic factor in late-life depression. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2013 May;21(5):433-49.
- Eisenstein RS, Hoganson G, Miller RH, Harper AE. Altered phosphorylation state of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in a branched-chain acyltransferase deficient human fibroblast cell line. *J Inher Metab Dis.* 1991; 14(1):37-44.
- Elmariah SB, Hughes EG, Oh EJ, Balice-Gordon RJ. Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biol.* 2005; 1:1-11.
- Fontella FU, Gassen E, Pulrolni V, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 2002; 17:47-54.
- Frey BN, Andreazza AC, Ceresér KM, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.* 2006; 79:281-286.
- Funchal C, Dall Bello Pessutto F, de Almeida LM, de Lima Pelaez P, Loureiro SO, Vivian L, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Alpha-keto-beta-methylvaleric acid increases the in vitro phosphorylation of intermediate filaments in cerebral cortex of young rats through the gabaergic system. *J Neurology Sciences.* 2004; 217:17-24.

- Funchal C, de Lima Pelaez P, Loureiro SO, Vivian L, Dall Bello Pessutto F, de Almeida LM, Tchernin Wofchuk S, Wajner M, Pessoa Pureur R. alpha-Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002 Dec 15;139(2):267-76.
- Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int.* 2003; 42:107–114.
- Garrod AG. *Inborn Errors of Metabolism.* Oxford, Oxford University Press. 1909.
- Gibson GE, Blass JP. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple syrup urine disease metabolites. *J Neurochem.* 1976; 26:1073-8.
- Gimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The effect of mendelian disease on human health. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: MCGraw-Hill Inc. 2001.
- Gulyaeva NV. Interplay between brain BDNF and Glutamatergic Systems: A Brief State of the Evidence and Association with the Pathogenesis of Depression. *Biochemistry (Mosc).* 2017 Mar;82(3):301-307.
- Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, Graham SL. TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *Int J Mol Sci.* 2013 May 13;14(5):10122-42.
- Gwag BJ, Koh JY, Chen MM (1995) BDNF or IGF-I potentiates free radical-mediated injury in cortical cell cultures. *Neuroreport* 7:93–96

- Halegoua S, Armstrong RC, Kremer NE. Dissecting the mode of action of neuronal growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991; 165:119-170.
- Hanson, J.L., Knodt, A.R., Brigidi, B.D., Hariri, A.R., 2015. Lower structural integrity of the uncinate fasciculus is associated with a history of child maltreatment and future psychological vulnerability to stress. *Dev. Psychopathol.* 27 (4 pt 2),1611– 1619.
- Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004; 45:104-114.
- Howell RK, Lee M. Influence of  $\alpha$ -keto acids on the respiration of brain in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1963; 113:660-3.
- Huang Y, Zielke HR, Tildon JT, Zielke CL, Baab PJ. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Developmental Neuroscience.* 1996; 18 (5-6):415-9.
- Hutson SM, Lieth E, LaNoue KF. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr.* 2001 Mar;131(3):846S-850S.
- Jantas D, Krawczyk S, Lason W. The Predominant Protective Effect of Tianeptine Over Other Antidepressants in Models of Neuronal Apoptosis: The Effect Blocked by Inhibitors of MAPK/ERK1/2 and PI3-K/Akt Pathways. *Neurotox Res.* 2014; 25:208-225.

- Jantas D, Krawczyk S, Lason W. The predominant protective effect of tianeptine over other antidepressants in models of neuronal apoptosis: the effect blocked by inhibitors of MAPK/ERK1/2 and PI3-K/Akt pathways. *Neurotox Res.* 2014 Feb;25(2):208-25.
- Jouvet J, Rustin P, Taylor DL. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: Implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell.* 2000b; 11:1919-32.
- Jouvet P, Kozma M, Mehmet H. Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000a; 926:116-21.
- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature.* 1999; 401:918-921.
- KandrataVICIUS L, Monteiro MR, Silva RA do V, Leite JP. Neurotrofinas na epilepsia do lobo temporal. *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.* 2010; 16(1):7-12.
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Animal models and human depressive disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981; 5:231-246.
- Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 2008; 455:894-902.
- Land JM, Mowbray J, Clark JB. Control of pyruvate and  $\alpha$ -hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J Neurochem.* 1976; 26:823-30.
- Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of

- neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 2002; 82:1367-75.
- Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma aminoacid concentration in healthy pediatric population. *Clinical Chemistry.* 1997; 43: 2397-2402.
- Levi-Montalcini R, Angeletti P. Nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1968; 48:534-569.
- Lim KC, Lim ST, Federoff HJ. Neurotrophin secretory pathways and synaptic plasticity. *Neurobiol Aging.* 2003; 24:1135-1145.
- Lowry oh, rosebrough nj, farr al, randall rj. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265.
- McAllister AK. Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex.* 2000; 10:963-973.
- McEwen BS, Chattarji S, Diamond DM, Jay TM, Reagan LP, Svenningsson P, Fuchs E. The neurobiological properties of Tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Mol Psychiatry.* 2010; 15(3): 237-249.
- McEwen BS, Chattarji S, Diamond DM, Jay TM, Reagan LP, Svenningsson P, Fuchs E. The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation . *Mol Psychiatry.* 2010 Mar; 15(3):237-49.
- Mello, C.F., Feksa, L., Brusque, A.M., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 1999. Chronic early leucine administration induces behavioral deficits in rats. *Life Sci.* 65, 747 – 755.
- Mendell LM. Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. *J Physiol.* 2001; 533:91-97.

- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*. 1954; 14 (5):462.
- Menkes JH. Maple syrup urine disease. Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics*. 1959; 23:348-53.
- Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M, Regla Vargas C, Dutra-Filho CS. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis*. 2011; 26:21-28.
- Molteni R, Calabrese F, Chourbaji S, Brandwein C, Racagni G, Gass P, Riva MA. Depression-prone mice with reduced glucocorticoid receptor expression display an altered stress-dependent regulation of brain-derived neurotrophic factor and activity-regulated cytoskeleton-associated protein. *J Psychopharm*. 2010; 24(4): 595-603
- Morris A, Leonard J. Acute presentations of inherited metabolic disorders: investigation and initial management. *Paediatr Child Health (Oxford)* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015 Mar [cited 2014 Nov 29];25(3):97–102.
- Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI. Diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: a study of 36 patients. *Pediatrics*. 2002. 109:999-1008.
- Muelly ER, Moore GJ, Bunce SC, Mack J, Bigler DC, Morton DH, Strauss KA. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1809–1820.

- Mueller ER, Moore GJ, Bunce SC, Mack J, Bigler DC, Morton DH, et al. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2013;123(4):1809–20.
- Mueller ER, Moore GJ, Bunce SC, Mack J, Bigler DC, Morton DH, Strauss KA. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 2013 Apr;123(4):1809-20.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001; 63:71-124.
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Bunce M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical model: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*. 2002; 52:503–528.
- Nitta A, Nishioka H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Sugiura H, Shen L, Furukawa S. Hydrophobic dipeptide Leu<sup>1</sup> protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis. *J Neurosci Res*. 2004; 78:250-258.
- Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Ohta K, Akaboshi I, Indo Y, Endo F, Matsuda I. Molecular diagnosis of maple syrup urine disease: screening and identification of gene mutations in the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase multienzyme complex. *J Inher Metab Dis*. 1992; 15(5):827-33.
- Numakawa T, Yokomaku D, Richards M, Hori H, Adachi N, Kunugi H. Functional interactions between

- steroid hormones and neurotrophin BDNF. *World J Biol Chem.* 2010 May 26;1(5):133-43.
- Nurjono M, Lee J, Chong S-A. A Review of Brain-derived Neurotrophic Factor as a Candidate Biomarker in Schizophrenia. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* [Internet]. 2012 Aug;10(2):61–70.
- Ohira K, Hayashi MA. New aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Curr Neuropharmacol.* 2009; 7:276-285.
- Pan L, Vockley J. Neuropsychiatric Symptoms in Inborn Errors of Metabolism: Incorporation of Genomic and Metabolomic Analysis into Therapeutics and Prevention. *Curr Genet Med Rep* [Internet]. 2013;1(1):65–70.
- Parrella T, Surrey S, Iolascon A, Sartore M, Heidenreich R, Diamond G, Ponzzone A, Guardamagna O, Burlina AB, Cerone R, Parini R, Dionisi-Vici C, Rappaport E, Fortina P. Maple syrup urine disease (MSUD): screening for known mutations in Italian patients. *J Inherit Metab Dis.* 1994; 17(6):652-60.
- Peinemann F, Danner DJ. Maple syrup urine disease 1954-1993. *J Inherit Metab Dis.* 1994; 17(1):3-15.
- Pilla C, Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res.* 2003; 28 (5):675-9.
- Piroli GG, Reznikov LR, Grillo C a., Hagar JM, Fadel JR, Reagan LP. Tianeptine modulates amygdalar glutamate neurochemistry and synaptic proteins in rats subjected to repeated stress. *Exp Neurol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;241(1):184–93.

- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977; 21:266-730.
- Pothos EM. Restricted eating with weight loss selectively decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and alters dopamine responses to amphetamine, morphine, and food intake. *J Neurosci*. 1995; 15:6640-6650.
- Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem*. 1990; 265(16):8971-74.
- Reis M, Farage M, Wolosker H. Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1475(2):114-18.
- Réus GZ, Vieira FG, Abelaira HM, Michels M, Tomaz DB, Dos Santos MA, Carlessi AS, Neotti MV, Matias BI, Luz JR, Dal-Pizzol F, Quevedo J. MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. *J Psychiatr Res*. 2014; 55:15-21.
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grandó V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry L, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res*. 2008; 33:114-24.
- Rosa L, Scaini G, Furlanetto CB, Galant LS, Vuolo F, Dall'Igna DM, Schuck PF, Ferreira GC, Dal-Pizzol F, Streck EL. Administration of branched-chain amino acids alters the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines *Int J Dev Neurosci*. 2016 Feb; 48:24-30. Epub 2015 Nov 30.

- Rush RA, Chie E, Liu D, Tafreshi A, Zettler C, Zhou XF. Neurotrophic factors are required by mature sympathetic neurons for survival, transmission and connectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997; 24:549-555.
- Russo SJ, Mazei-Robison MS, Ables JL, Nestler EJ. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology*. 2009;56 Suppl 1:73-82. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.059. Epub 2008 Jul 4.
- Rybakowski JK, Borkowska A, Skibinska M, Hauser J. Illness-specific association of val66met BDNF polymorphism with performance on Wisconsin Card Sorting Test in bipolar mood disorder. *Mol Psychiatry*. 2006; 11:122-124.
- Scaini G, de Rochi N, Jeremias IC, Deroza PF, Zugno AI, Pereira TC, Oliveira GM, Kist LW, Bogo MR, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Neurobiol*. 2012b; 45:279-86.
- Scaini G, Teodorak BP, Jeremias IC, Morais MO, Mina F, Domingui D, Pescador B, Comim CM, Schuck PF, Ferreira GC, Quevedo J, Streck EL. Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease. *Behav Brain Res*. 2012a; 231:92-6.
- Scaini G, Tonon T, Souza CFM, Schuck PF, Ferreira GC, Seda J Neto, Amorin T, Schwartz IVD, Streck EL. Serum Markers of Neurodegeneration in Maple Syrup Urine Disease. *Mol Neurobiol*. 2016 Sep 22. [Epub ahead of print].
- Scaini G, Comim CM, Oliveira GM, Pasquali MA, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JC, Schuck

- PF, Ferreira GC, Bogo MR, Streck EL. Chronic administration of branched-chain amino acids impairs spatial memory and increases brain-derived neurotrophic factor in a rat model. *J. Inher Metab Dis.* 2013 Sep;36(5):721-30.
- Schechter LE, Ring RH, Beyer CE, Hughes ZA, Khawaja X, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S. Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. *NeuroRx.* 2005; 2:590-611.
- Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Gen Metab.* 2004; 82(1):69-75.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8.ed. New York: MCGraw-Hill Inc; 2001.
- Sedel F, Baumann N, Turpin JC, Lyon-Caen O, Saudubray JM, Cohen D. Psychiatric manifestations revealing inborn errors of metabolism in adolescents and adults. *J Inher Metab Dis.* 2007;30(5):631–41.
- Shaltiel G, Chen G, Manji HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7:22-26.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. Maple Syrup Urine Disease [Internet]. *GeneReviews*(®). 2015.
- Strauss KA, Wardley B, Robinson D, Hendrickson C, Rider NL, Puffenberger EG, et al. Classical maple syrup urine disease and brain development: Principles of management and formula design. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;99(4):333–45.

- Tavares RG, Santos CE, Tasca CI, Wajner M, Souza DO, Dutra-Filho CS. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurology Sciences*. 2000; 181:44-9.
- The forced swim test in mice. *Pharmacol Rep*. 2011; 63: 1526 -1532.
- Thoenen H, Barde YA. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev*. 1980; 60:1284-1335.
- Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR. Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis*. 1992; 15(1):121-35.
- Tyler WJ, Perrett SP, Pozzo-Miller LD. The role of neurotrophins in neurotransmitter release. *Neuroscientist*. 2002; 8:524-531.
- Uzbekov MG. Antidepressant action of tianeptine is connected with acceleration of serotonin turnover in the synapse: a hypothesis. *Neuropsychopharmacol Hung*. 2009 Jun;11(2):83-7.
- Vuković O<sup>1</sup>, Marić NP, Britvić D, Cvetić T, Damjanović A, Prostran M, Jasović-Gasić M. Efficacy, tolerability and safety of tianeptine in special populations of depressive patients. *Psychiatr Danub*. 2009 Jun;21(2):194-8.
- Walsh KS, Scott MN. Neurocognitive profile in a case of maple syrup urine disease. *Clin neuropsychol*. 2010; 24:689-700.
- Walz R, Lenz G, Roesler R, Vianna MM, Martins V, Brentani R, Rodnight R, Izquierdo I. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of

- hippocampus of adult rats. *Eur J Neurosci.* 2000; 12:2185-2189.
- Westall RG, Dancis J, Miller S. Maple syrup urine disease. *AM J Dis Child.* 1957; 94:571-2.
- Właż P, Kasperek R, Właż A, Szumiło M, Wróbel A, Nowak G, Poleszak E. NMDA and AMPA receptors are involved in the antidepressant-like activity of tianeptine in the forced swim test in mice. *Pharmacol Rep.* 2011;63(6):1526-32.
- Yeaman SJ. The mammalian 2-oxo acid dehydrogenases: a complex family. *Trends Biochem Sci.* 1986; 11:293-6.
- Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 2010; 70:304-322.
- Yudkoff M. Interactions in the Metabolism of Glutamate and the Branched-Chain Amino Acids and Ketoacids in the CNS. *Neurochem Res.* 2017 Jan;42(1): 10-18.
- Yuwiler A, Geller E. Serotonin depletion by dietary leucine. *Nature.* 1965. 208 (5005): 83-4.
- Zielke HR, Huang Y, Baab PJ, Collins RM Jr, Zielke CL, Tildon JT. Effect of alpha-ketoisocaproate and leucine on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochem Res.* 1997; 22:1159-64.
- Zielke HR, Huang Y, Tildon JT, Zielke CL, Baab PJ. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: alpha-ketoisocaproate infusion. *Dev Neurosci.* 1996; 18:420-5.

Zoladz PR, Park CR, Muñoz C, Fleshner M, Diamond DM.  
Tianeptine: An Antidepressant with Memory-  
Protective Properties. *Current Neuropharmacology*,  
2008; 6: 311-321.

**ANEXO I**



### **Resolução**

*A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.*

**Protocolo: 068/2013-2**

**Professor Responsável:** Emilio Luiz Streck.

**Equipe:** João Quevedo, Giselli Scaini, Milena Carvalho Silva, Lara Mezari Gomes, Fábio Almeida Morais e Camila Brulezi Furlanetto.

**Título:** “Avaliação de sintomas depressivos em ratos submetidos à administração crônica de aminoácidos de cadeia ramificada tratados com tianeptina.”

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 240 Ratos heterogênicos 7 dias 15 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail [ceua@unesp.net](mailto:ceua@unesp.net).*

*The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:*

**Protocol number: 068/2013-2**

**Principal Investigator:** Emilio Luiz Streck.

**Researchers:** João Quevedo, Giselli Scaini, Milena Carvalho Silva, Lara Mezari Gomes, Fábio Almeida Morais e Camila Brulezi Furlanetto.

**Project title:** “Depressive-like-behavior in rats submitted to chronic administration of branched-chain amino acids treated with tianeptine.

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyses. May you have further questions, please contact us on [www.unesp.net/propex/ceua](http://www.unesp.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesp.net](mailto:ceua@unesp.net).*

Criciúma, 16 de outubro de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA