UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO

EFEITO ANTIPSICÓTICO DE NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7)

Goiânia - GO
2020

Processo: 23070.024347/2020-71 Documento: 1419634

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[x] Dissertação [ ] Tese

2. Nome completo do autor

Gustavo Almeida de Carvalho

3. Título do trabalho

EFEITO ANTIPSICÓTICO DE NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7)

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [ ] SIM [x] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto**, **Chefe**, em 07/07/2020, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO**, **Discente**, em 07/07/2020, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1419634** e o código CRC **1FA5A1D9**.

Referência: Processo nº 23070.024347/2020-71 SEI nº 1419634

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[x] Dissertação [ ] Tese [ ] Outro*:_____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Gustavo Almeida de Carvalho

3. Título do trabalho

EFEITO ANTIPSICÓTICO DE NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7)

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO**, **Discente**, em 19/10/2022, às 08:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do

Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto**, **Professor do Magistério Superior**, em 20/10/2022, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3274257** e o código CRC **58193F5D**.

Referência: Processo nº 23070.024347/2020-71 SEI nº 3274257

GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO

EFEITO ANTIPSICÓTICO DE NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7)

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a Obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto

Goiânia - GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Almeida de Carvalho, Gustavo
EFEITO ANTIPSICÓTICO DE NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7) [manuscrito] / Gustavo Almeida de Carvalho. - 2020.
LXVII, 67 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2020.
Bibliografia. Anexos.
Inclui abreviaturas, lista de figuras.

1. Transportador de prolina. 2. SLC6A7. 3. Esquizofrenia. 4. Antipsicóticos. I. , Mauro Cunha Xavier Pinto, orient. II. Título.

CDU 615

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 517 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Gustavo Almeida de Carvalho** o título de Mestre(a) em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Ao/s vinte e nove dias do mês de maio de 2020, a partir da(s) 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão fechada de Defesa de Dissertação intitulada **"**EFEITO ANTIPSICÓTICO DE NOVOS INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES DE PROLINA**"**. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) Mauro Cunha Xavier Pinto (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) Ricardo Menegatti (FF - UFG), membro titular interno; Professor(a) Doutor(a) Jacqueline Alves Leite (ICB - UFG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) Mauro Cunha Xavier Pinto, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) vinte e nove dias do mês de maio de 2020.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

EFEITO ANTIPSICÓTICO DE NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7)

Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto**, **Chefe**, em 02/06/2020, às 13:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Alves Leite**, **Professora do Magistério Superior**, em 02/06/2020, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Menegatti**, **Professor do Magistério Superior**, em 02/06/2020, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1354721** e o código CRC **247AE6B4**.

Referência: Processo nº 23070.024347/2020-71 SEI nº 1354721

GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO

EFEITO ANTIPSICÓTICO DE NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7)

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a Obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Goiânia - GO, 29 de maio de 2020

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto

Universidade Federal de Goiás

_____

Prof. Dr. Ricardo Menegatti

Universidade Federal de Goiás

_____

Profa. Dra. Jacqueline Alves Leite

Universidade Federal de Goiás

Dedico este trabalho aos meus pais, Sérgio e Ana, aos meus irmãos Bruno e Marianne, à Tia Margareth e à minha namorada Raquel que são minha inspiração e motivação.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto, por me orientar neste trabalho.

Ao Laboratório de Neurofarmacologia e Neuroquímica por me proporcionar o aprendizado e a base para construção deste trabalho.

À toda coordenação da Pós-graduação em Ciências Biológicas e a todos os professores do curso que me proporcionaram todos os novos aprendizados.

À minha família pelo apoio incondicional que me proporciona crescer cada vez mais.

À minha tia Margareth por ser minha mãe em Goiânia e minha prima/irmã Sumaya que tenho tanto carinho.

Aos meus amigos de Salvador, Rodrigo, Gabriel, Carlos, Larissa, Paula, Caio e Nathália que mesmo longe me dão forças e torcem pelo meu sucesso, sendo sempre a minha segunda família.

À Profª Dra. Jacqueline Alves Leite e ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti por compor a banca avaliadora deste trabalho. O professor Ricardo também por proporcionar a síntese química dos compostos.

Ao Prof. Dr. François Noël (ICB/UFRJ) por proporcionar os experimentos de captação de radioativo.

À Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes (ICB/UFMG) por proporcionar os experimentos em cultura celular.

Às agências de fomento financiadoras deste projeto CNPq, CAPES, FAPEG, FAPEMIG.

Resumo

A esquizofrenia é uma desordem psiquiátrica grave que expressa um conjunto complexo de sintomas positivos, negativos e/ou cognitivos. Algumas hipóteses tentam explicar a causa da esquizofrenia, uma delas a hipótese glutamatérgica é baseada em evidências farmacológicas e estudos fisiopatológicos que apontam para uma hipofunção da sinalização de receptores NMDA no cérebro. Os transportadores de prolina (SLC6A7) são expressos predominantemente no sistema nervoso central (SNC) e estão associados à neurotransmissão glutamatérgica, no entanto, seu papel na regulação da função neural e do seu potencial farmacológico é pouco conhecido. O objetivo deste trabalho foi caracterizar farmacologicamente novos protótipos de inibidores dos transportadores de prolina (SLC6A7) e testar o efeito de um destes em modelo de psicose induzido por cetamina. Os resultados aqui apresentados demonstram que os compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 apresentam baixo impacto na viabilidade de células LUHMES e em cultura de neurônios periféricos e são capazes de reduzir a captação de prolina intracelular em sinaptossomas. O composto LQFM 215 apresentou maior impacto na viabilidade das células LUHMES como também em neurônios periféricos e maior efeito inibitório na captação de prolina. No comportamento de camundongos o composto LQFM 215 reduziu a mobilidade dos animais, sem prejuízo da memória de trabalho na maior dose testada de 10 mg/kg e não foi capaz de induzir comportamentos do tipo ansioso ou do tipo depressivo. No teste de enterrar bolinhas o composto LQFM 215 em todas as doses testadas de 2,5, 5 e 10 mg/kg foi capaz de estimular esse comportamento. Ao testar o composto LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina foi capaz de reduzir a hiperlocomoção induzida dos animais nas doses testadas de 20 e 30 mg/kg. O conjunto destes resultados indica que o composto LQFM 215 é um composto neuroativo com efeito na mobilidade dos animais e com potencial antipsicótico. Este trabalho demonstra que os inibidores de PROT podem ser alvos para o desenvolvimento de novos antipsicóticos.

Palavras-chave: Transportador de prolina; SLC6A7; Esquizofrenia; Antipsicóticos

Abstract

Schizophrenia is a serious psychiatric disorder that expresses a complex set of positive, negative and/or cognitive symptoms. Some hypotheses attempt to explain the cause of schizophrenia, one of which is the glutamatergic hypothesis based on pharmacological evidence and pathophysiological studies that point to a hypofunction of NMDA receptor signaling in the brain. Proline transporters (SLC6A7) are predominantly expressed in the central nervous system (CNS) and are associated with glutamatergic neurotransmission, however, their role in regulating neural function and pharmacological potential is little known. The objective of this work was to pharmacologically characterize new prototypes of proline transporter inhibitors (SLC6A7) and to test the effect of one of these in a ketamine-induced psychosis model. The results presented here demonstrate that the compounds LQFM 215, LQFM 216 and LQFM 217 have a low impact on the viability of LUHMES cells and in culture of peripheral neurons and are capable of reducing the uptake of intracellular proline in synaptosomes. The compound LQFM 215 had a greater impact on the viability of LUHMES cells as well as on peripheral neurons and a greater inhibitory effect on the uptake of proline. In the behavior of mice, the compound LQFM 215 reduced the mobility of the animals, without prejudice to the working memory in the highest tested dose of 10 mg/kg and was not able to induce anxious or depressive behaviors. In the marble burying test the compound LQFM 215 in all the tested doses of 2.5, 5 and 10 mg/kg was able to stimulate this behavior. By testing the compound LQFM 215 in the ketamine-induced psychosis model, he was able to reduce the animals' induced hyperlocomotion at the tested doses of 20 and 30 mg/kg. The set of these results indicates that the compound LQFM 215 is a neuroactive compound with an effect on the mobility of animals and with antipsychotic potential. This work demonstrates that PROT inhibitors can be targets for the development of new antipsychotics.

Keywords: Proline transporters; SLC6A7; Schizophrenia; Antipsychotics

Lista de figuras

Figura 1 - Vias serotoninérgicas cerebrais importantes na patologia da esquizofrenia. 19

Figura 2 - Vias dopaminérgicas e regiões cerebrais..... 20

Figura 3 - Vias glutamatérgicas e regiões cerebrais. 21

Figura 4 - Sinapse glutamatérgica. 24

Figura 5 - Mapa filogenético da distribuição das famílias de transportadores SLC6. 26

Figura 6 - Esquema representativo dos experimentos realizados em células LUHMES..... 31

Figura 7 - Esquema representativo dos experimentos com neurônio periféricos. 32

Figura 8 - Esquema representativo do ensaio de captação de [^{3}H]-prolina. 35

Figura 9 - Representação do aparato do teste de campo aberto..... 36

Figura 10 - Representação do aparato do teste de enterrar bolinhas. 37

Figura 11 - Representação do aparato do teste do labirinto em cruz elevado. 37

Figura 12 - Representação do aparato do teste do labirinto em Y. 38

Figura 13 - Representação do aparato do teste do nado forçado. 39

Figura 14 - Impacto dos compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 na viabilidade de células LUHMES e no crescimento de neuritos. 40

Figura 15 - Gráficos representativos do impacto dos compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 na viabilidade e na área de neuritos de células LUHMES. 41

Figura 16 - Efeito do composto LQFM 215 em lavado celular e em co-cultura de astrócitos..... 42

Figura 17 - Impacto dos compostos LQFM215, LQFM216 e LQFM217 em neurônios periféricos. 42

Figura 18 - Efeito dos compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 na captação de prolina em sinaptossomas. 43

Figura 19 - Efeito do composto LQFM 215 na atividade locomotora no teste do campo aberto..... 44

Figura 20 - Efeito do composto LQFM 215 no número de rearings e no número de entradas no quadrante central no teste do campo aberto. 45
Figura 21 - Efeito do composto LQFM 215 no teste de enterrar bolinhas (marble burying). 45
Figura 22 - Efeito do composto LQFM 215 no teste do labirinto em cruz elevado. 46
Figura 23 - Efeito do composto LQFM 215 no teste do labirinto em Y. 47
Figura 24 - Efeito do composto LQFM 215 no teste do nado forçado. 47
Figura 25 - Efeito do composto LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do campo aberto. 48
Figura 26 - Efeito do composto LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do campo aberto. 49
Figura 27 - Efeito do composto LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do labirinto em Y 50

Lista de abreviaturas

AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico;
AMPAR	Receptor AMPA;
AP5	Antagonista do receptor NMDA;
BHT	di-terc-butil metil fenol;
CA	Cainato;
CA1	Região hipocampal;
CaMK II	Cálcio-calmodulina quinase II;
CEUA	Comitê de ética em uso de animais;
CNQX	Antagonista AMPAR;
DMSO	Dimetilsulfóxido;
GDNF	Fator neurotrófico derivado de célula glial;
GluN1	Unidade 1 do receptor NMDA;
GluN2	Unidade 2 do receptor NMDA;
GluN2A	Subunidade A da unidade 2 do receptor NMDA;
GluN2B	Subunidade B da unidade 2 do receptor NMDA;
GlyR	Receptor de glicina;
iDRG	Neurônios imaturos de gânglios da raiz dorsal;
iGluRs	receptores ionotrópicos de glutamato;
IP	Intraperitoneal;
LTD	Depressão de longo prazo;
LTP	Potencialização de longo prazo;
LUHMES	Células mesencefálicas humanas de Lund;
mGluR2	receptor metabotrópico de glutamato subunidade 2;
mGluRs	receptores metabotrópicos de glutamato;
MK801	Antagonista do receptor NMDA;
NMDA	N-metil-D-aspartato;
NMDAR	Receptor NMDA;
PBS	Tampão fosfato-salino;
PKC	Proteína quinase C;
PLO	poli-L-ornitina;
PRODH	Prolina desidrogenase;

PROT	Transportador de prolina;
PROT KO	Knockout para transportador de prolina;
PROTi	Inibidor do transportador de prolina;
PSD-95	Proteína de densidade pós-sináptica-95;
SCL6A15	Carreador de soluto família 6 membro 15;
SCL6A17	Carreador de soluto família 6 membro 17;
SCL6A20	Carreador de soluto família 6 membro 20;
SCL6A7	Carreador de soluto família 6 membro 7;
SNC	Sistema nervoso central;
TOC	Transtorno obsessivo compulsivo;

Sumário

1. Introdução 18

1.1 Esquizofrenia aspectos gerais e hipóteses 18

1.2 Tratamento da Esquizofrenia 21

1.3 Neurotransmissão Glutamatérgica 23

1.4 Transportadores de prolina 25

1.5 Inibidores dos transportadores de prolina 27

2. Objetivos 29

2.1 Objetivo geral 29

2.2 Objetivos específicos 29

3. Materiais e Métodos 30

3.1 Materiais 30

3.1.1 Células mesencefálicas humanas de Lund – LUHMES cells 30

3.1.2 Neurônios imaturos de gânglios da raiz dorsal 31

3.1.3 Animais 32

3.2 Análise in vitro 32

3.2.1 Ensaios de viabilidade 32

3.3 Análise ex vivo 33

3.3.1 Preparação de sinaptossomas 33

3.3.2 Captação de prolina 34

3.4 Análise in vivo 35

3.4.1 Tratamento com composto LQFM 215 35

3.4.2 Indução do modelo de psicose por Cetamina 35

3.4.3 Testes comportamentais 36

3.4.3.1 Teste do Campo Aberto 36

3.4.3.2 Teste de enterrar bolinhas (Marble Burying) 36

3.4.3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado 37

3.4.3.4 Teste do Labirinto em Y 38

3.4.3.5 Teste do nado forçado 38

3.5 Delineamento experimental 39

3.6 Análise estatística 39

4 Resultados 40

4.1 Avaliação dos inibidores de PROT na viabilidade de células LUHMES 40

4.2 Avaliação dos inibidores de PROT na viabilidade de neurônios periféricos 42

4.3 Avaliação dos inibidores de PROT na captação de prolina em sinaptossomas de hipocampo 43

4.4 Avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto em animais tratados com LQFM 215 43

4.5 Avaliação do perfil ansiogênico no teste de enterrar bolinhas (marble burying) de animais tratados com LQFM 215 45

4.6 Avaliação do perfil ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado de animais tratados com LQFM 215 46

4.7 Avaliação da memória de trabalho no teste do labirinto em Y de animais tratados com LQFM 215 46

4.8 Avaliação do perfil tipo depressivo no teste do nado forçado de animais tratados com LQFM 215 47

4.9 Efeito do LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do campo aberto 48

4.10 Avaliação do efeito do LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do labirinto em Y 49

5. Discussão 51

6. Conclusões 57

7. Perspectivas 58

8. Referências 59

Anexo A – Aprovação do comitê de ética 64

Anexo B – Comprovante de depósito de patente 65

Anexo C – Termo de confidencialidade 66

1. Introdução

1.1 Esquizofrenia aspectos gerais e hipóteses

A esquizofrenia é uma desordem psiquiátrica grave a qual é expressa por um conjunto complexo de sintomas positivos, negativos e/ou cognitivos (*Carbon and Correll, 2014*). Os sintomas positivos incluem agitação, alucinações auditivas, alucinações visuais, ao passo que sintomas negativos são associados à falta de motivação, redução da fala espontânea e afastamento social. Os sintomas cognitivos se apresentam como dificuldades na memória, atenção e tomada de decisões (*Van Os e Kapur, 2009*).

A esquizofrenia afeta cerca 1% da população mundial e está entre as 10 principais causas globais de incapacidade (*Fleischhacker et al., 2014*). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 26 milhões de pessoas são afetadas pela doença no mundo inteiro. Estima-se que 800 mil convivam com a esquizofrenia no Brasil.

A fisiopatologia da esquizofrenia é complexa e os sinais e sintomas podem ser explicados com diferentes hipóteses, onde se destacam a hipótese genética, e as hipóteses neuroquímicas serotoninérgica, a dopaminérgica e a glutamatérgica.

Alguns estudos demonstram que existe um importante fator hereditário envolvido na sua causa, porém os fatores ambientais também são muito importantes para que a doença de fato se desenvolva (*Júnior, 2007*). Sabe-se que existem associações importantes entre polimorfismos genéticos e a possibilidade de um indivíduo desenvolver a doença, no entanto, não há ainda dados que comprovem que um único gene seja o responsável direto para o desenvolvimento desta (*Rang et al., 2016*).

Nos estudos de base genética onde investigam as famílias, fornecem fortes evidências de uma causa familiar, sendo que pessoas que possuem parentes de primeiro grau com esquizofrenia possuem um fator de risco mais consistente e significativo para o desenvolvimento da doença. Os estudos de gêmeos mostram que a predisposição ao desenvolvimento da esquizofrenia em um filho de um gêmeo não afetado é igual ao do gêmeo afetado. Assim o gêmeo não afetado poderia desenvolver a esquizofrenia, mas por alguma razão não se expressa, o motivo pelo qual não expressa está ligado à suscetibilidade, fatores ambientais, e ao fato de que embora sejam idênticos podem expressar genes diferentes (*Rang et al., 2016*). Outros estudos de genética molecular sugerem que a esquizofrenia pode estar ligada ao polimorfismo na região codificadora do gene para o receptor 5-HT2A, ao polimorfismo dos genes para

catecolamina o-metil transferase (COMT) e para o receptor para dopamina D3. (*Gelder et al, 2006*).

A hipótese serotoninérgica, postula que a hiperfunção cortical da serotonina/5-hidroxitriptamina 5-HT2A também pode resultar em sintomas de psicose (*Stahl, 2014*). Essa hipótese começou a ser considerada após a observação dos efeitos de alucinógenos/drogas psicodélicas, como a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e a psilocibina que são principalmente agonistas do 5-HT2A e seus efeitos resultam em alucinações visuais e delírios místicos (Vollenweider et al., 1998; Carhart-Harris et al., 2016; Griffiths et al., 2008 e Rolland et al., 2014). Já a hipótese glutamatérgica ainda pouco explorada e mais recente surge a partir do estudo de anestésicos dissociativos, como fenciclidina (PCP) e cetamina, que são antagonistas do NMDA e que resultam em alucinações visuais e delírios paranóicos, além de um estado dissociativo (Powers et al., 2015).

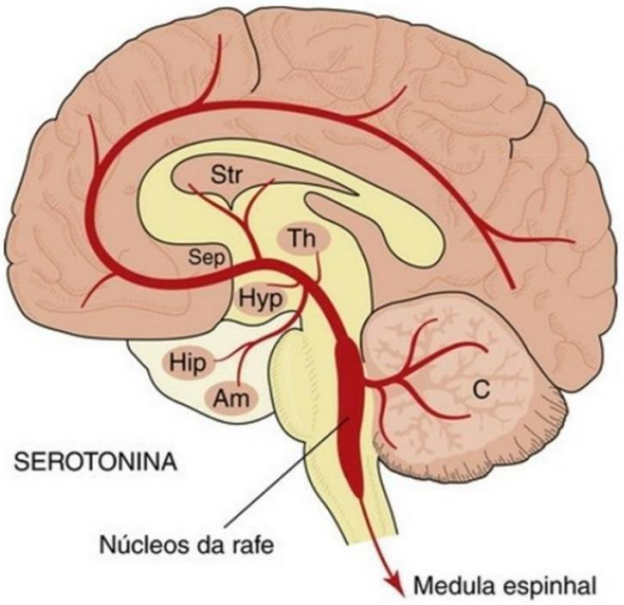


Figura 1 - Vias serotoninérgicas cerebrais importantes na patologia da esquizofrenia. A distribuição dos neurônios contendo 5-HT apresenta corpos celulares agrupados na ponte e na parte superior do bulbo, próximos à linha média (rafe), e são frequentemente referidos como núcleos da rafe. Adaptado Google Imagens.

A hipótese dopaminérgica da esquizofrenia é a explicação predominante para os sintomas positivos da doença, sendo baseada na hiperatividade da sinalização dopaminérgica no sistema mesolímbico e na redução da sinalização dopaminérgica no sistema mesocortical (*Juárez Olguín et al., 2016*). Ainda de acordo com a hipótese

dopaminérgica, alterações nos receptores dopaminérgicos D2 no estriado causam sintomas positivos e deficiências nos receptores D1 do córtex pré-frontal causam sintomas negativos e cognitivos (*Lau et al., 2013*).

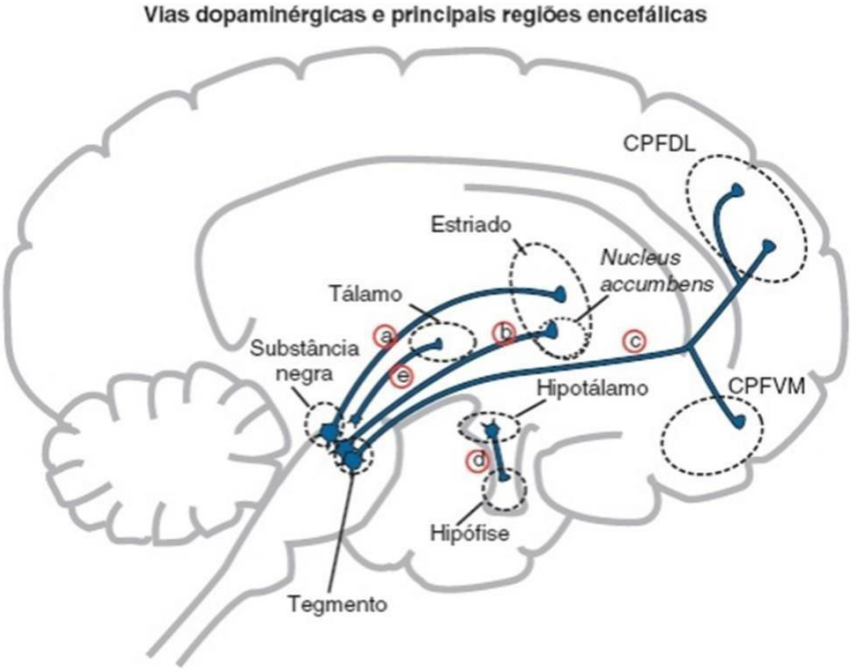


Figura 2 - Vias dopaminérgicas e regiões cerebrais. a. via nigroestriatal, **b.** via mesolímbica, **c.** via mesocortical, **d.** via tuberoinfundibular, **e.** núcleos hipotalâmicos-tálamo. Vias importantes na hipótese dopaminérgica da esquizofrenia, destacam-se a via mesolímbica e a via mesocortical. Adaptado (*Stahl 2015*).

A hipótese glutamatérgica da esquizofrenia é baseada na hipofunção de receptores glutamatérgicos e na capacidade de antagonistas do N-metil-d-aspartato (NMDA), como a cetamina, induzir sintomas semelhantes à psicose (*Steeds, Carhart-Harris e Stone 2015*). Distúrbios nos receptores NMDA nos interneurônios levam à ausência de impulsos de inibição nos neurônios glutamatérgicos, aumentando a atividade do glutamato principalmente no córtex pré-frontal, o que pode estar relacionado a sintomas negativos da esquizofrenia. Além disso, os agonistas dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR2) demonstram a atividade antipsicótica em ensaios clínicos (*Moghaddam e Javitt, 2012*).

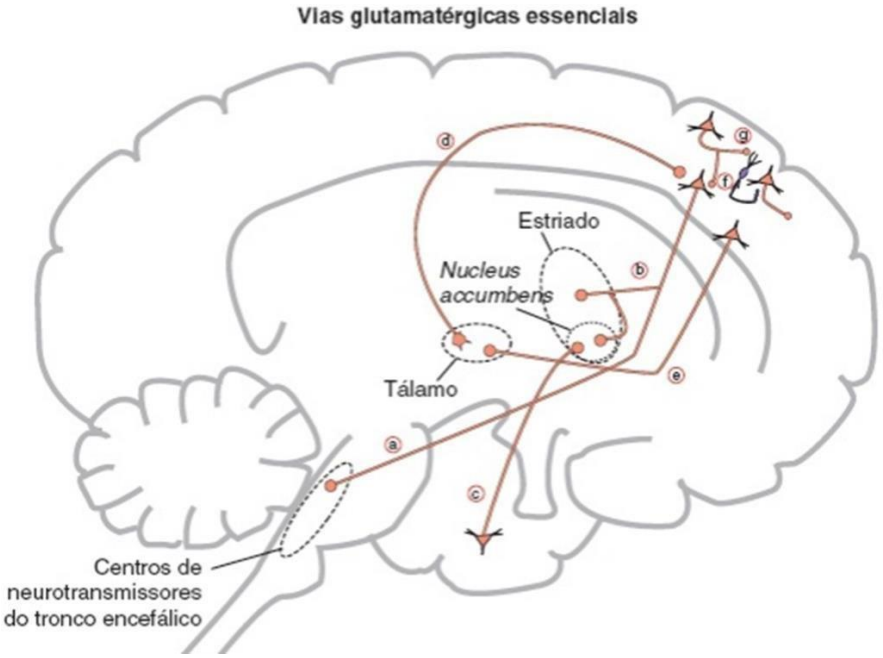


Figura 3 - Vias glutamatérgicas e regiões cerebrais. a. projeção glutamatérgica cortical para o tronco encefálico, **b**. via glutamatérgica corticoestriatal e via glutamatérgica corticoaccumbens, **c.** projeção glutamatérgica do hipocampo ventral para o nucleus accumbens, **d.** vias glutamatérgicas talamocorticais, **e.** vias glutamatérgicas corticotalâmicas, **f.** vias glutamatérgicas corticocorticais, **g.** córtex - interneurônios gabaérgicos. Vias importantes na hipótese glutamatérgica da esquizofrenia, destaca-se a relação com os interneurônios gabaérgicos e as vias mesolímbicas e mesocorticais. Adaptado (*Stahl 2015*).

1.2 Tratamento da Esquizofrenia

O tratamento da esquizofrenia tem como base os fármacos antipsicóticos. Estes foram introduzidos em 1950, sendo um importante progresso para o tratamento da doença. Os antipsicóticos são conhecidos como de primeira geração ou típicos, e de segunda geração ou atípicos (*Hales et al., 2012*). Estão relacionadas ao perfil do receptor, à incidência de efeitos extrapiramidais, à eficácia terapêutica em pacientes resistentes ao tratamento e eficiência contra sintomas negativos (*Rang et al., 2016*). A farmacoterapia tradicional disponível para tratamento da esquizofrenia foi desenvolvida baseando-se na teoria dopaminérgica, entretanto, esta, apresenta limitações significativas como o fato de que nem todos os sintomas da esquizofrenia podem ser eliminados pelos agentes antagonistas da dopamina.

A base do tratamento da esquizofrenia está ligada ao antagonismo da dopamina no sistema mesolímbico-mesocortical, sendo o antagonismo no sistema nigroestriatal é a principal causa dos efeitos extrapiramidais. Ainda, a ação neurohormonal da dopamina na hipófise anterior está ligada à secreção de prolactina. Desta forma, a ação farmacodinâmica dos fármacos antipsicóticos vai apresentar diferentes resultados

psiquiátricos, neurológicos e endocrinológicos, dependendo de sua afinidade pelos diferentes tipos de receptores dopaminérgicos (*Craig et al., 2014*).

Os antipsicóticos de primeira geração ou típicos são aqueles que possuem alta afinidade por receptores de dopamina D2 presentes em todo o SNC, no entanto, seus efeitos terapêuticos são principalmente decorrentes de sua ação sobre os receptores D2 mesolímbicos e mesocorticais. No entanto, quando ocorre a ocupação de mais de 80% dos receptores D2 estriatal, importantes efeitos extrapiramidais são observados, como lentidão, rigidez e tremor. Alguns exemplos de fármacos dessa classe são: clorpromazina, haloperidol, flufenazina, flupentixol e clopentixol (*Hales et al., 2012*). Os efeitos adversos dos antipsicóticos típicos são conhecidos como extrapiramidais e de discinesia tardia, associados ao bloqueio de receptores D2, e este bloqueio na via nigroestriatal causa distúrbios de movimento, bloqueando esta via constantemente produz-se o movimento hipercinético, ou seja, a discinesia tardia, que causa mastigação constante, protrusão de língua e caretas (*Stahl, 2014).*

Os antipsicóticos de segunda geração ou atípicos têm menor afinidade para os receptores D2, apresentando maior afinidade para os receptores serotoninérgicos (5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT6 e 5-HT7) e noradrenérgicos (α1 e α2) e, portanto, apresentam uma menor indução de efeitos extrapiramidais. Estes fármacos são risperidona, sertindol, clozapina, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, zotepina, ziprasidona sendo a clozapina o protótipo (*Albano, 2012; Miyamoto et al., 2005*). Os antipsicóticos atípicos estão relacionados a efeitos adversos metabólicos e cardiovasculares que evoluem do aumento do apetite. Causa o aumento de peso significativamente, desenvolvimento de resistência à insulina que leva à instalação da diabetes mellitus, a hiperlipidemia (*Stahl, 2014*).

Notavelmente, os neurolépticos parecem ser menos eficazes no alívio da disfunção cognitiva e dos sintomas negativos (*Meltzer et al., 1986; Heinrichs, 2007*). Além disso acredita-se atualmente que a maioria dos efeitos extrapiramidais são causados pelo bloqueio excessivo dos receptores D2 na região estriatal (*Wilson et al., 1998; Yang et al., 2003*). O uso de antipsicóticos, melhora predominantemente os sintomas positivos, havendo poucas evidências de melhora dos sintomas negativos, com exceção da clozapina que apresentou respostas clínicas superiores em alguns pacientes, esse fármaco possui baixa afinidade pelos receptores dopaminérgicos D2 (*Meltzer, 1989; Kane, 1988*) e aripiprazol que atualmente seu mecanismo de ação é um agonismo parcial de receptores

D2 e 5-HT1A serotononinérgico, além do antagonismo 5-HT2A (*Veerman et al., 2017; Shirley and Perry, 2014*).

1.3 Neurotransmissão Glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório presente no SNC. Além do seu papel fundamental como aminoácido, de constituir as proteínas, o glutamato desempenha grande relevância no processo energético das células e importante em processos como cognição e memória (*Pinto, 2014; Ruggiero et al., 2011*).

A síntese do glutamato se dá através de duas principais e distintas vias, o α-cetoglutarato advindo do ciclo de Krebs que é convertido por transaminação a glutamato nas terminações nervosas do SNC. A outra via é a produção e secreção da glutamina pelas células da glia que é transportada para as terminações nervosas e convertida em glutamato pela enzima glutaminase (*Golan et al., 2009*).

O glutamato é liberado por exocitose das vesículas sinápticas através de um processo dependente de cálcio. A sua recaptação é feita por transportadores de recaptação de glutamato nos terminais pré e pós-sinápticos. Estes transportadores são Na^+ dependentes e possuem alta afinidade pelo glutamato. Nas células da glia uma enzima chamada glutamina sintetase converte o glutamato em glutamina, que é recaptada novamente para a síntese de glutamato nos neurônios. Esta mesma glutamina também pode voltar para o ciclo de Krebs e sofrer oxidação formando α-cetoglutarato realimentando o ciclo de síntese e degradação do glutamato (*Golan et al., 2009*).

Os receptores glutamatérgicos estão organizados em dois principais grupos, os receptores ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs ocorrem em três tipos NMDA, AMPA e Cainato (CA), apresentando todos uma estrutura tetramérica (Golan et al., 2009). Em seu complexo transmembranar, coexistem sítios de recepção e canais iônicos. Desta forma, a neurotransmissão mediada pelos iGluRs é rápida, pois envolve o fluxo de íons Na^+ e Ca^{2+}, principalmente, e, por consequência, afeta a condição eletroquímica da membrana pós-sináptica. Os mGluRs estão acoplados à proteína G, responsáveis por respostas intracelulares através da ativação de segundos mensageiros. Desta maneira geram respostas pós-sinápticas mais lentas do que receptores ionotrópicos (*Ruggiero et al., 2011*).

Os NMDAR são um tipo de receptor ionotrópico ativado pelo glutamato e seus co-agonistas glicina e serina, que permitem o influxo de Ca^{2+} nos neurônios. Os NMDAR

são compostos por dois tipos de subunidades, a subunidade GluN1 é o local de ligação dos co-agonistas e a subunidade GluN2 é o local de ligação do glutamato e a proteína de densidade pós-sináptica-95 (PSD-95). O NMDAR sináptico é importante para a potencialização a longo prazo (LTP), que requer a ativação do NMDAR contendo GluN2A, enquanto a depressão a longo prazo (LTD) requer a ativação do NMDAR contendo GluN2B. O controle da ativação de NMDAR é crucial para manutenção da função neuronal. Considerando que a teoria glutamatérgica postula que a esquizofrenia estaria associada à uma hipofunção de receptores glutamatérgicos a regulação positiva desses receptores pode ser benéfica para o tratamento desta doença. (*Lee e Zhou, 2019*).

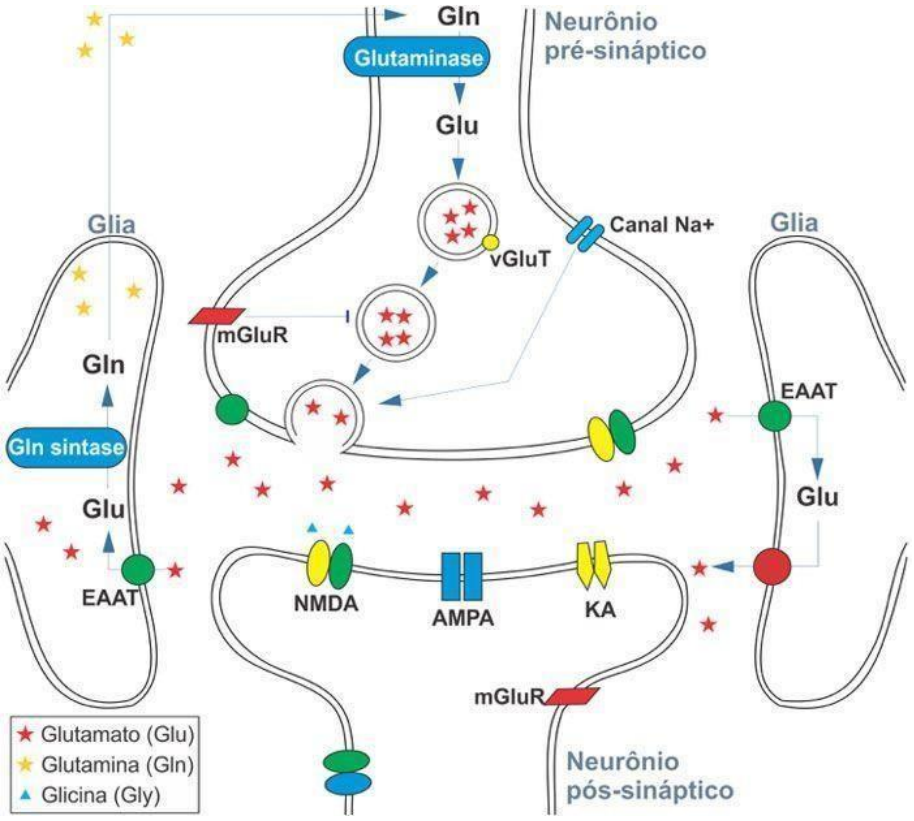


Figura 4 - Sinapse glutamatérgica. A despolarização dos neurônios leva liberação de glutamato na fenda sináptica através do processo de exocitose. Uma vez liberado, o glutamato pode atuar sobre receptores metabotrópicos (mGluR) ou receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e KA), gerando uma resposta em neurônios pós-sinápticos. Os níveis de glutamato na fenda sinápticos são controlados pelos transportadores de glutamato (EAATs). O glutamato captado pelas células gliais é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintase, sendo esta glutamina transportada para os terminais extra-sinápticos. A glutamina é captada pelos neurônios e convertida novamente à glutamato pela enzima glutaminase. No citoplasma, glutamato recém-produzido é transportado para as vesículas pelo transportador vesicular de glutamato (vGluT), estando novamente pronto para ser liberado na fenda sináptica. Fonte: *Pinto (2014)*

1.4 Transportadores de prolina

Alguns aminoácidos ou seus metabólitos demonstraram ser capazes de modular a transmissão sináptica excitatória no sistema nervoso central. Glicina ou D-serina, por exemplo, são necessárias para a ativação do receptor de glutamato do tipo NMDA (*Johnson e Ascher, 1987*). A L-prolina, um aminoácido encontrado em abundância no cérebro, também pode modular a atividade dos receptores NMDA. Foi demonstrado que os níveis fisiológicos de prolina (3 μM no LCR) regulam a transmissão glutamatérgica nos neurônios do hipocampo de ratos (*Cohen e Nadler, 1997b)*.

A L-prolina é um aminoácido presente no SNC, o qual é capaz de modular a neurotransmissão glutamatérgica. No SNC a L-Prolina atua como um agonista fraco do receptor de glicina e dos receptores NMDA e AMPA (*Henzi, Helm e MecDermott, 1992*). A L-prolina despolariza as células piramidais de CA1 principalmente por ativação de receptores NMDA pós-sinápticos (*Martin, Ault e Nadler, 1992*). A prolina também se demonstrou capaz de estimular o potencial de campo em fatias de hipocampo, sendo esse efeito bloqueado por um estímulo prévio de alta frequência independente se este estímulo evocar ou não LTP (*Cohen e Nadler, 1997a*). Aparentemente, a prolina pode ter um papel endógeno na regulação da função basal do hipocampo nas sinapses glutamatérgicas, ajudando-as a se manter parcialmente potenciadas. Em concordância com os efeitos observados no hipocampo, no núcleo paraventricular do hipotálamo a aplicação de L-prolina estimula receptores NMDA e AMPA/Cainato, que medeiam um aumento de pressão arterial em animais através do aumento da circulação de vasopressina (*Lopes-Azevedo, Busnardo e Corrêa, 2016*). Por outro lado, na medula ventrolateral a L-prolina apresenta uma resposta depressora, a qual é mediada por receptores ionotrópicos e inibida pela administração de MK-801 e CNQX (*Takemoto, 2005*).

Em neurônios do corno dorsal da medula espinhal foi demonstrado que a prolina provoca correntes excitatórias as quais são parcialmente antagonizados por AP5 antagonista NMDAR, CNQX antagonista AMPAR e estricnina antagonista GlyR e são abolidas pela combinação dos três antagonistas. Também foi observado que a prolina promove entrada de Ca^{+2} nestas células (*Henzi, Helm e MecDermott, 1992*).

Até o momento, não há descrição de receptor específico de prolina, no entanto, vários transportadores são expressos no tecido cerebral, como PROT (SLC6A7), B^0AT2 (SLC6A15), NTT4 (SLC6A17), IMINO (SLC6A20). Curiosamente, o transportador de prolina de alta afinidade PROT é especialmente supra-regulado em substratos cerebrais

como o hipocampo e é co-localizado em terminais glutamatérgicos (*Crump et al., 1999*). Assim, a expressão de PROT parece estar associada a neurônios glutamatérgicos. Em cultura de neurônios hipocampais, PROT não é detectado em neurônios GABAérgicos, mas é encontrado em neurônios excitatórios. Nos neurônios piramidais PROT é encontrado nos terminais pré-sinápticos e em 60% destes neurônios (*Crump et al., 1999*). O padrão de expressão de PROT sugere um papel fisiológico nestas sinapses.

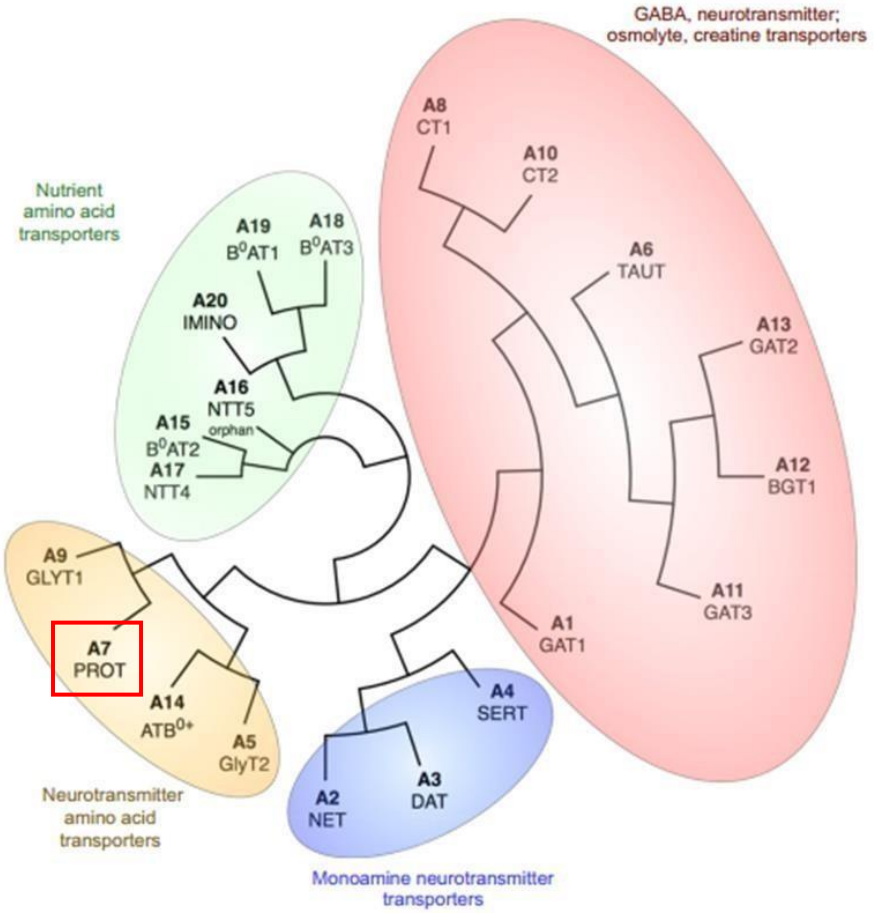


Figura 5 - Mapa filogenético da distribuição das famílias de transportadores SLC6. O PROT transportador de prolina da família SLC6A7 é um transportador do grupo de aminoácidos neurotransmissores, amplamente distribuído principalmente nas regiões cerebrais. Adaptado (*Pramod et al., 2013*).

Com relação ao funcionamento de PROT, as concentrações de Ca^{+2} regulam diferencialmente a função destes transportadores. O aumento de Ca^{+2} inicialmente aumenta o transporte de prolina, porém eventualmente o seu transporte é inibido pela fosforilação de CaMK II em PROT (*Jayanthi et al., 2000*). A ativação de PKC também leva a uma redução do transporte de prolina por PROT (*Jayanthi et al., 2000*). Este padrão de funcionamento indica um papel importante da prolina durante a transmissão sináptica.

Alguns estudos acerca do funcionamento e papel do PROT no SNC foram estudados em modelos de animais KO para o PROT. Estes animais exibem uma redução

do comportamento exploratório, mas não apresentam comportamentos do tipo ansioso ou depressivo e a inativação do PROT, por modificação genética, não desencadeia sintomas perturbadores observados em modelos animais de hiperprolinemia metabólica ou alteração genética do PRODH (*Schulz et al., 2018*).

A distribuição neuroanatômica do PROT coincidente com as sinapses glutamatérgicas e a capacidade da L-prolina de modular a neurotransmissão glutamatérgica suscitam a necessidade de maiores investigações em relação ao papel da prolina na neurotransmissão glutamatérgica, ao mesmo tempo que fornece subsídio para o desenvolvimento de novos inibidores do transportador de prolina.

1.5 Inibidores dos transportadores de prolina

Os estudos acerca dos inibidores dos transportadores de prolina ainda são escassos na literatura. Porém alguns estudos demonstraram que a expressão recombinante de PROT é altamente específica para a L-prolina com um Km de aproximadamente 6 M, e demonstraram que três peptídeos opioides inibiam a captação de L-prolina em sinaptossomas de ratos, no entanto esses peptídeos são instáveis in vivo e têm utilidade limitada no estudo da função do PROT (*Rhoads, Peterson e Raghupathy, 1983; Shafqat et al., 1995*).

Alguns trabalhos mostram que vários peptídeos opióides, incluindo o peptídeo des-tirosil-leuencefina (GGFL), foram encontrados como inibidores do PROT (*Rhoads, Peterson e Raghupathy, 1983)*. No trabalho descrito por *Yu* e colaboradores (2009), foi testado o efeito de alguns inibidores do PROT, incluindo o GGFL, em células que expressavam PROT, onde este composto inibiu a captação de prolina com um IC50 de 1.5 μM, valores próximos aos de trabalhos anteriores (*Galli et al., 1999*). Neste mesmo trabalho a benztropina (pequena molécula inibidora de transportadores de dopamina), apresentou efeito sob a captação de L-prolina com IC50 de 0.75 μM sob linhagem de células COS1 (*Yu et al., 2009*).

O composto LP-403812 também foi testado no trabalho de *Yu* e colaboradores (2009) após uma triagem de aproximadamente 300.000 compostos. O LP-403812 apresentou inibição da captação de prolina dose dependente com um IC50 de 0.11 μM. Interessantemente o composto apresentou certa seletividade pelo PROT já que não apresentou atividade inibirótia em transpostadores de glicina do tipo 1 (GLYT1) e transportadores de dopamina (DAT).

Em estudos mais recentes de *Zipp* e colaboradores (2014) foi realizado uma triagem de compostos a partir de banco de dados de pequenas moléculas e alguns compostos foram planejados e sintetizados, onde as suas estruturas foram otimizadas e testadas na captação de prolina *in vitro* e *in vivo* em camundongos. O trabalho mostra que dois compostos PROT (57 e 58) foram capazes de inibir a captação de prolina com IC50 de 0.027 e 0.018 μM respectivamente. Além disso apresentaram uma seletividade maior ao hPROT. O composto PROT (57) testado in vivo apresentou maior impacto em um teste condicionado ao estímulo de *freezing* embora a diferenças entre o veículo não tenha sido significante (Zipp et al., 2014).

Diante disto, o objetivo deste trabalho é caracterizar farmacologicamente novos protótipos de inibidores dos transportadores de prolina e eleger um composto para avaliar seus efeitos comportamentais e em um modelo de psicose induzido por cetamina.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar farmacologicamente novos protótipos de inibidores dos transportadores de prolina (Slc6A7).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial neurotóxico dos compostos em células LUHMES.

- Avaliar o potencial neurotóxico dos compostos em neurônios dos gânglios da raiz dorsal.

- Determinar o potencial de inibição da captação de prolina de novos protótipos de inibidores dos transportadores de prolina.

- Eleger um dos compostos para avaliar o seu efeito comportamental *in vivo*.

- Analisar o potencial antipsicótico na inibição do transportador de prolina em modelo animal de psicose induzido por cetamina.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Células mesencefálicas humanas de Lund – LUHMES cells

As células precursoras neuronais dopaminérgicas humanas imortalizadas, também conhecidas como linhagem celular mesencefálica humana de Lund (LUHMES), é um modelo útil para analisar o impacto de novas moléculas em neurônios dopaminérgicos. Para avaliação do impacto destes compostos na viabilidade celular de células LUHMES, estas foram cultivadas como descrito anteriormente por *Krug* e colaboradores (2013). Resumidamente, células percusoras neuronais humanas foram mantidas em meio de proliferação (AdvDMEM/F12 contendo L-glutamina 2 mM, suplemento 1 × N2) enriquecido com 40 ng mL^{-1} de fator de crescimento de fibroblastos básico humano recombinante e cultivado em 5% de CO_2/95% de ar atmosférico a 37 °C. Placas e frascos de cultura de células foram pré-revestidos com 50 μg mL^{-1} de poli-L-ornitina (PLO) e 1 μg mL^{-1} de fibronectina. A diferenciação para neurônios pós-mitóticos foi realizada semeando células a uma densidade de 45.000 células cm-2 mantidas em meio de proliferação por 24h e uma subsequente mudança de meio para meio de diferenciação (AdvDMEM/F12 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1 × N2, 1 mM de adenosina monofosfato dibutiril 3,5-cíclico (cAMP), 1 μg mL^{-1} de tetraciclina e 2 ng mL^{-1} de fator neurotrófico derivado de célula glial humana recombinante (GDNF)). Após 48h de diferenciação, as células foram destacadas com 0,05% de tripsina/EDTA e semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 100.000 células.

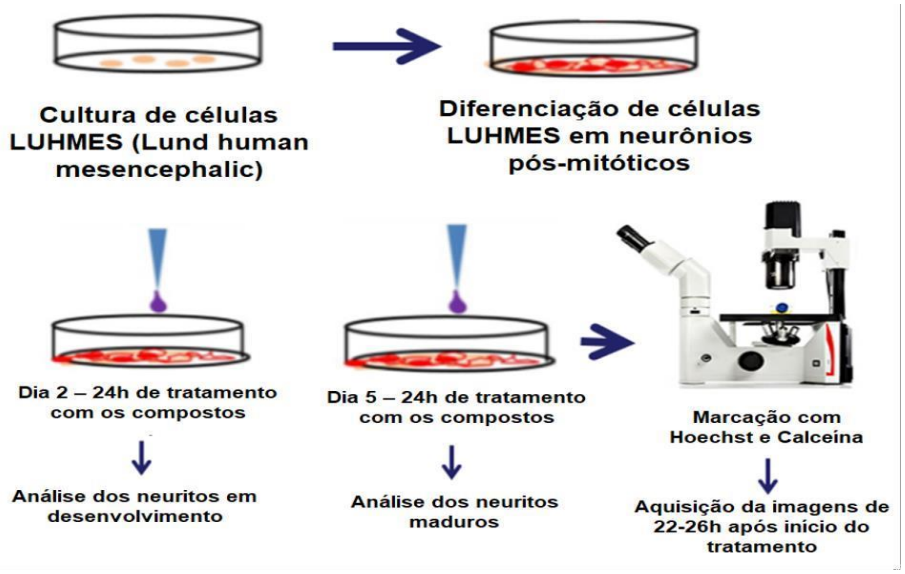


Figura 6 - Esquema representativo dos experimentos realizados em células LUHMES. A cultura de células LUHMES sofreu diferenciação em neurônios pós-mitóticos e foram tratados a partir do dia 2 (células em desenvolvimento) e dia 5 (células maduras). Foram quantificados a viabilidade celular e o crescimento de neuritos. As células foram marcadas com Hoechst e Calceína.

3.1.2 Neurônios imaturos de gânglios da raiz dorsal

As células-tronco humanas pluripotentes induzidas foram cultivadas de acordo com protocolos padrão e diferenciadas em neurônios imaturos de gânglios da raiz dorsal (iDRG) para avaliação do impacto dos compostos na viabilidade de neurônios periféricos, como descrito anteriormente (*Thomson et al, 1998; Chambers et al, 2012*). Para ensaios de viabilidade, as células iDRG foram descongeladas e semeadas a uma densidade de 0,1 x 10^6 células por cm^2 em 75 µL do meio de diferenciação (25% KSR-S e 75% N2-S médio suplementado com CHIR99021 (1,5 µM), SU5402 (5 µM) e DAPT (5 µM)) e semeados em placas de 96 poços revestidas com Matrigel (BD Biosciences). Diluições em série de produtos químicos de teste foram preparadas em meio de diferenciação e 25 µL foram adicionados às células 1 hora após a semeadura. Todos os testes foram realizados 24 horas após o tratamento.

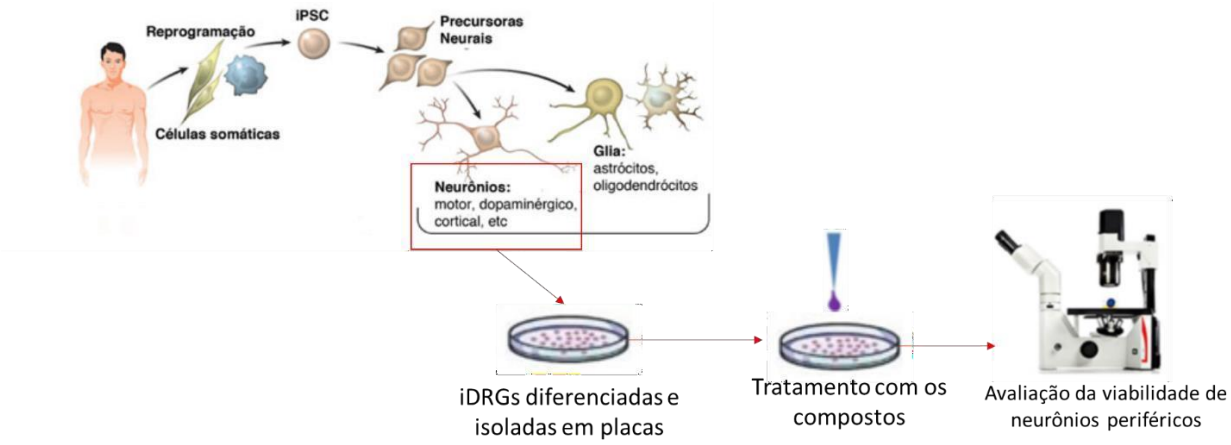


Figura 7 - Esquema representativo dos experimentos com neurônio periféricos. A células-tronco humanas pluripotentes induzidas foram cultivadas de acordo com protocolos padrão e diferenciadas em neurônios de gânglios da raiz dorsal (iDRG) para avaliação do impacto dos compostos na viabilidade de neurônios periféricos.

3.1.3 Animais

Os procedimentos comportamentais foram conduzidos utilizando camundongos *Swiss* machos de 8 a 12 semanas de idade, pesando 40-50g. Cada grupo experimental foi composto de 10 animais. Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidos sob condições de temperatura controlada com um ciclo artificial de 12 horas claro/escuro. Foram mantidos em gaiolas plásticas (50 x 35 x 15 cm), no número de 10 camundongos por gaiola. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da UFG (Protocolo CEUA: 044/2018).

As análises para captação de prolina foram conduzidos utilizando ratos Wistar machos de 8 a 12 semanas de idade, pesando 250-300g. Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidos sob condições de temperatura controlada com um ciclo artificial de 12 horas claro/escuro. Foram mantidos em gaiolas plásticas (50 x 35 x 15 cm), no número de 5 ratos por gaiola. Esse procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional para Cuidado Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro (nº 01200.001568 / 2013-87).

3.2 Análise in vitro

3.2.1 Ensaios de viabilidade

Para os ensaios de viabilidade, as células foram tratadas com novos compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 no segundo dia de diferenciação e uma hora após a semeadura, por 24h. Para avaliar a estabilidade dos neuritos, as células formam neuritos por 72h após a semeadura, isto é, d5 de diferenciação e foram tratadas posteriormente por 24 h. A aquisição da imagem sempre foi realizada 22-26h após o início do tratamento. Os compostos foram adicionados em uma faixa de concentração de 100 µM a 0,09 µM com etapas de diluição 1:2 em meio contendo DMSO. A concentração final de DMSO foi sempre de 0,1% e usada como controle de solvente.

A aquisição foi realizada conforme descrito anteriormente por *Krug* e colaboradores (2013) e *Stiegler* e colaboradores (2011). Resumidamente, as células foram coradas com Hoechst H-33342 coloração vital que marca o DNA das células em azul e calceína-AM que se liga ao cálcio intracelular e emite cor verde, para aquisição de imagem. A área de neurito foi calculada como a área total positiva de calceína corrigida para a área somática, isto é, a área positiva de Hoechst, expandida por um anel circundante de 3,2 µm representando o corpo neuronal. As imagens foram usadas simultaneamente para avaliar a viabilidade. As células duplamente positivas foram contadas como viáveis; células positivas para *Hoechst* sem coloração com calceína foram contados como células mortas. A viabilidade foi expressa como células viáveis/células totais x 100%.

Três experimentos independentes foram realizados em triplicatas. Primeiro, os dados das réplicas foram expressos como porcentagem de tratados com solvente. Depois disso, as réplicas foram calculadas para reduzir a variabilidade. Posteriormente, a média de três repetições foi determinada para a área de neuritos e viabilidade em relação ao controle de solvente. Os ajustes foram calculados usando um modelo de Hill de 4 parâmetros com restrição da linha de base ao máximo 100% do sinal tratado com solvente. A equação do modelo de Hill foi resolvida para f (x) = 50% para determinar a EC50, isto é, concentração na qual o efeito inibidor/desestabilizador do crescimento de neuritos estava em 50% do controle do solvente.

3.3 Análise ex vivo

3.3.1 Preparação de sinaptossomas

Sinaptossoma é um terminal sináptico isolado de um neurónio. A preparação dos sinaptossomas neste experimento foi realizada como descrito anteriormente por *Fremeau* e colaboradores (1996) com algumas modificações. Resumidamente, ratos Wistar machos

adultos foram eutanasiados por decapitação e seus cérebros foram imediatamente removidos, o hipocampo dissecado no gelo e os procedimentos subsequentes foram realizados a 4 °C.

O hipocampo foi homogeneizado em 20 volumes (p/v) de solução de sacarose 0,32 M usando um aparelho Potter com um pilão de Teflon acionado a motor. O homogenato foi centrifugado a 900 g por 5 min e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 20.000 g por 20 min. O sedimento resultante foi ressuspenso no tampão de incubação consistindo em 25 mM de HEPES-NaOH (pH 7,4), 122 mM de NaCI; $MgSO_4$ 1,2 mM; KCl 3,1 mM; 0,4 mM de KH_2PO_4; 1,3 mM de $CaCl_2$ e 10 mM de dextrose. Os sinaptossomas foram mantidos em gelo até serem utilizados no ensaio de captação de [^{3}H]-prolina. A concentração de proteína foi determinada pelo método de *Lowry* e colaboradores com albumina sérica bovina como padrão.

3.3.2 Captação de prolina

Para a avaliação do impacto dos compostos testados na captação de prolina, a captação de [^{3}H]-prolina foi realizado conforme descrito anteriormente por *Pinto* e colaboradores (2014) com algumas modificações. Alíquotas de sinaptossomas do hipocampo de ratos (80-150 µg de proteína) foram incubadas por 5 min a 37 °C, com [^{3}H]-prolina 50 nM e 10 µM os compostos de teste (LQFM 215, 216 e 217), em um volume total de 0,5 mL. A captação não específica foi determinada na presença de prolina 2 mM. A incubação foi terminada por filtração rápida sob vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak, Alemanha), seguida por lavagem (3 x 4 mL) com tampão gelado. Após adição de uma mistura de cintilação, a radioatividade retida nos filtros foi contada com um analisador de cintilação líquida Packard Tri-Carb 1600 TR (PerkinElmer). As curvas de concentração-resposta foram analisadas individualmente (n = 3) por regressão não linear, usando o modelo de "One site - Fit logIC50" (GraphPad Prism 7.0, GraphPad Prism 7.0, GraphPad Software, Inc., CA, EUA) para determinação da média concentração inibidora (IC50) dos compostos.

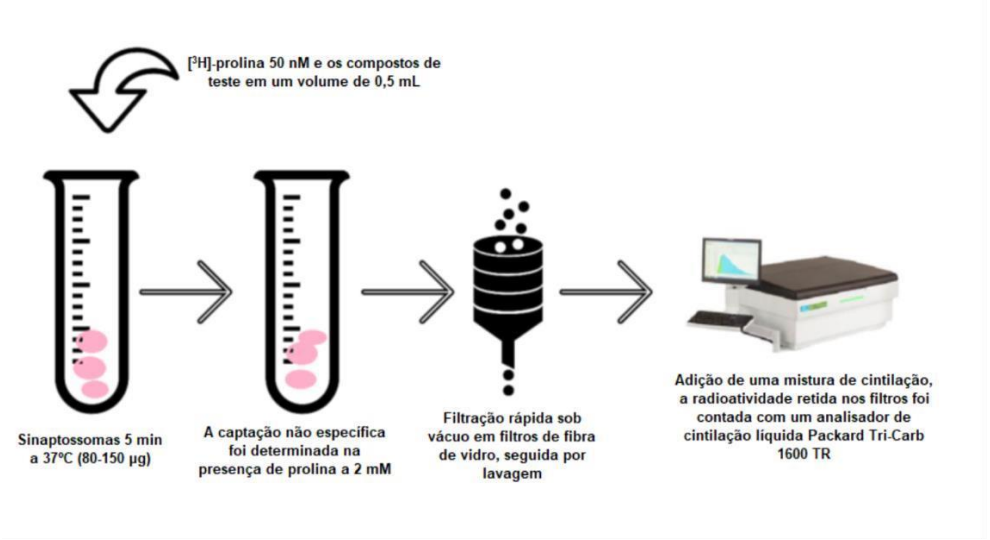


Figura 8 - Esquema representativo do ensaio de captação de [^{3}H]-prolina. Os sinaptossomas foram incubados por 5 minutos a 37 ºC com 50 nM de [^{3}H]-prolina e os compostos, a captação foi determinada na presença de L-prolina a 2 mM e realizada filtração rápida em filtros de fibra de vidro. Foi adicionado uma mistura de cintilação e a radioatividade retida nos filtros foi captada e analisada.

3.4 Análise in vivo

3.4.1 Tratamento com composto LQFM 215

O composto LQFM 215 foi solubilizado em uma solução de DMSO a 10% em solução salina fisiológica 0.09%. Diferentes doses do composto (2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10 mg/kg) foram administradas por injeção intraperitoneal (ip) 30 minutos antes dos testes comportamentais. Os animais do grupo controle receberam apenas injeções (ip) do veículo em volume correspondente ao seu peso. Todos os grupos experimentais foram compostos de 10 animais.

3.4.2 Indução do modelo de psicose por Cetamina

O modelo de psicose induzida por cetamina foi realizado por administração intraperitoneal de 50 mg/kg de cetamina solubilizados em solução salina fisiológica 0,09%, 30 minutos antes dos testes comportamentais (*Chatterjee et al., 2011; Hou et al., 2013*). Após indução do modelo os animais foram testados com o composto LQFM 215 (10, 20 e 30 mg/kg) 30 minutos antes dos testes. Todos os grupos experimentais foram compostos de 10 animais.

3.4.3 Testes comportamentais

3.4.3.1 Teste do Campo Aberto

Neste teste, os animais foram colocados no aparato de acrílico (44 x 44 x 44 cm) após 1 hora de habituação à sala de comportamento, sendo submetidos ao teste após 30 minutos da aplicação (ip) do composto LQFM 215 nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg. Os animais foram filmados por 10 minutos e foram analisados os seguintes parâmetros: levantamento sob as patas traseiras (*rearing*), reflexo de autolimpeza (*grooming*), cruzamentos (número de cruzamentos nos quadrantes do aparato), tempo imóvel, número de entradas no centro do aparato e distância total. Neste experimento e no modelo de psicose induzido por cetamina, os experimentos foram analisados por um software de análise comportamental Any-maze (Versão 6.1; Stoelting Co., Wood Dale, Il).

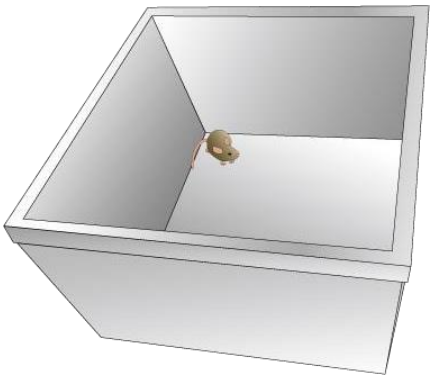


Figura 9 - Representação do aparato do teste de campo aberto. Neste teste o animal é colocado no centro do aparato e é filmado por 10 minutos. No aparato há quadrantes os quais podem ser identificados por um software e os parâmetros escolhido para análise podem ser contabilizados, assim como o animal pode ser mapeado pelo software para registrar seus movimentos. Fonte: Adaptado google imagens.

3.4.3.2 Teste de enterrar bolinhas (Marble Burying)

No teste de enterrar bolinhas os animais foram habituados à sala de comportamento por 1h e foram colocados em gaiolas plásticas (50 x 35 x 15 cm) contendo 20 bolinhas de gude após 30 minutos da administração (ip) do composto LQFM 215 nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg. Ao final do teste o número de bolinhas enterradas foi contabilizado.

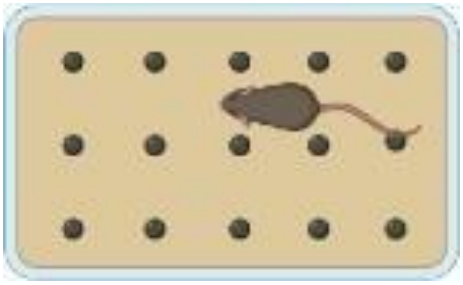


Figura 10 - Representação do aparato do teste de enterrar bolinhas. Neste teste colocamos o animal numa gaiola plástica com maravalha e 20 bolinhas de gude durante 15 minutos. Ao final contabilizamos quantas bolinhas foram enterradas. Fonte: Adaptado google

3.4.3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em cruz elevado é composto por quatro braços, dois braços são cercados por paredes, enquanto os outros dois são abertos. Neste teste, os animais foram colocados no aparato de acrílico (60 cm altura x 15 cm altura das paredes x 35 cm comprimento x 5 cm largura) após 1 hora de habituação à sala de comportamento, sendo submetidos ao teste após 30 minutos de aplicação (ip) do composto LQFM 215 nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg. O teste teve duração de 10 minutos e os animais foram filmados, onde os vídeos foram analisados posteriormente. Os parâmetros considerados foram: número de entradas nos braços abertos e tempo de permanência nos braços abertos.

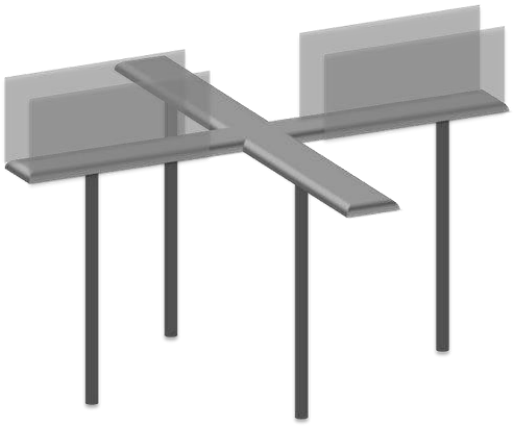


Figura 11 - Representação do aparato do teste do labirinto em cruz elevado. Neste teste colocamos o animal no centro do aparato e por 10 minutos analisamos sua movimentação espontânea. Ao final

contabilizamos o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo gasto nos braços abertos e fechados. Fonte: Adaptado google imagens

3.4.3.4 Teste do Labirinto em Y

Neste teste, os animais passaram por 1 hora de habituação na sala de comportamento e depois receberam a administração do composto. Após 30 minutos da administração (ip) do composto LQFM 215 nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg, os animais foram colocados em um aparato de acrílico (35 x 5 x 10 cm) por 8 minutos. Os animais foram filmados e o número total de entradas nos braços e o índice de alternância foram quantificados. O índice de alternância foi calculado pela fórmula:

(Número de alternâncias) / (Número de entradas nos braços-2) x 100%

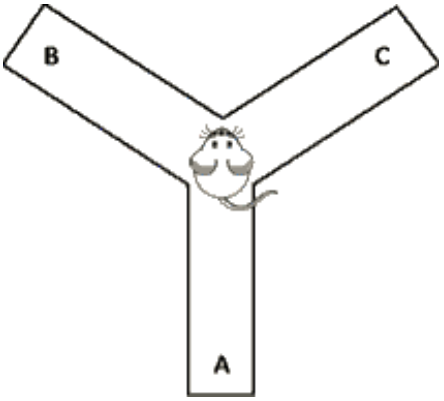


Figura 12 - Representação do aparato do teste do labirinto em Y. Neste teste o animal é colocado na intersecção entre os três braços do aparato e durante 8 minutos sua movimentação espontânea é registrado. Ao final são contabilizados o número de entradas em cada braço e o número de alternâncias corretas entre os braços do aparato, com essas duas informações conseguimos calcular o índice de alternância seguindo a fórmula acima. Fonte: Adaptado google imagens.

3.4.3.5 Teste do nado forçado

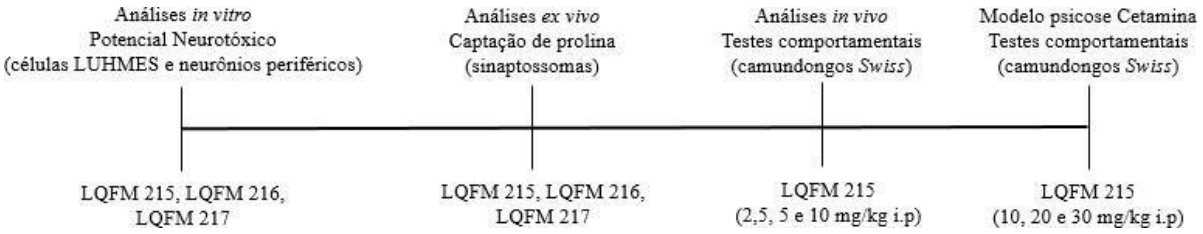
Neste teste os animais foram habituados a sala de comportamento por 1h. Após 30 minutos da administração (ip) do composto LQFM 215 nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg, os animais foram colocados em um cilindo de 40 cm de altura e 20 cm de diâmetro com água (25 ºC) numa profundidade que impedia o apoio da sua cauda no fundo do recipiente. O tempo total de imobilidade foi contabilizado a partir do registro dos animais por 6

minutos onde somente os 4 últimos minutos foram considerados (*Yankelevich-Yahav et al., 2015*).

Figura 13 - Representação do aparato do teste do nado forçado. Neste teste colocamos o animal num cilindro com água e registramos sua movimentação por 6 minutos. Ao final são analisados os 4 últimos minutos de teste e contabilizado seu tempo imóvel no teste. Fonte: Adaptado google imagens

3.5 Delineamento experimental

Esquema 1 – Delineamento experimental



3.6 Análise estatística

Para comparar os dados, utilizamos o One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$. Os conjuntos de dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados usando o GraphPad Prism, versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 Resultados

4.1 Avaliação dos inibidores de PROT na viabilidade de células LUHMES

Imagens representativas do impacto dos compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 na viabilidade celular e na área de neurites de células LUHMES, em desenvolvimento (d2-d3) e maduras (d5-6) são demonstradas nas Figuras 14A e 14B, respectivamente.

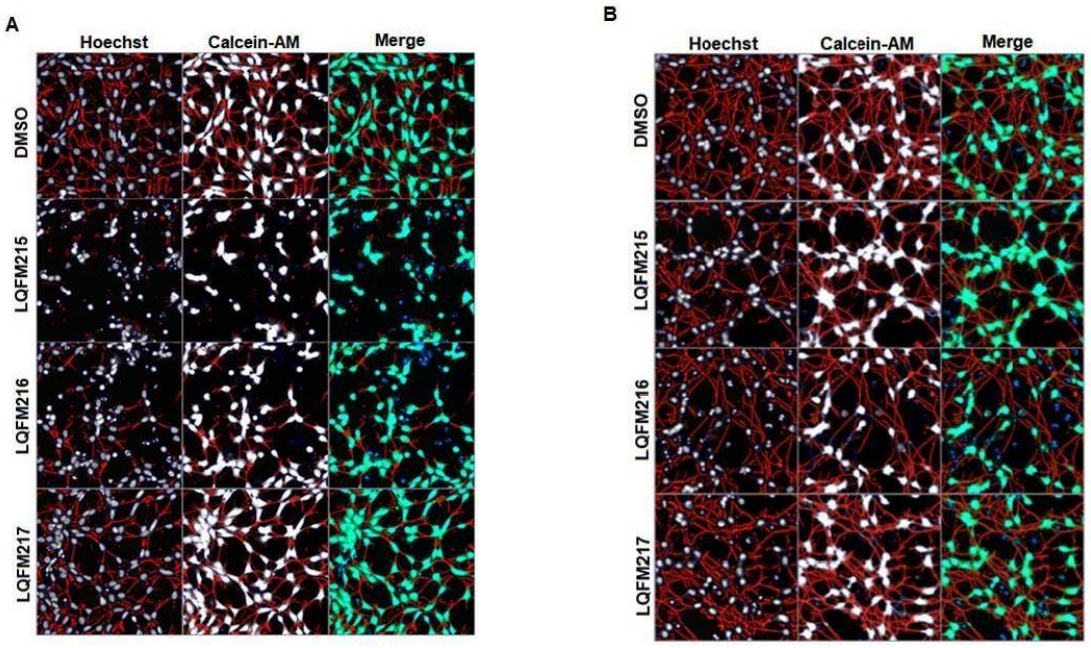


Figura 14 - Impacto dos compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 na viabilidade de células LUHMES e no crescimento de neuritos. As células foram tratadas por 24 h com os compostos. Para avaliação da neurotoxicidade no desenvolvimento, o crescimento de neuritos foi medido 25h após a semeadura em células com 3 dias de idade (**A:** d2-d3) e para avaliação da neurotoxicidade no desenvolvimento, o crescimento de neuritos foi medido 25 h após a semeadura em células com 5 dias de idade (**B:** d5-d6). Para medir os efeitos na integridade dos neuritos, as células foram estimuladas a cultivar neurites por 72 horas após a semeadura, antes de serem tratadas por 24 horas com os compostos. As imagens foram adquiridas após a coloração com Hoechst H-33342 (**azul)** e calceína-AM (**verde**) para calcular a área e a viabilidade dos neuritos. As células duplamente positivas (**azul e verde**) foram contadas como viáveis.

Os gráficos representativos do impacto dos compostos na viabilidade e no crescimento da área de neuritos demonstraram claramente uma redução significativa da área dos neuritos (em laranja) e da viabilidade de LUHMES em d2-3 após o tratamento com LQFM 215 (6µM) e LQFM 216 (25µM), diferentemente do observado em LQFM 217. Resultados semelhantes foram observados para células maduras (d5-6), enquanto

nenhuma redução na área de neurites e viabilidade de LUHMES foi observada após o tratamento com LQFM 217 a 100µM (Figura 15).

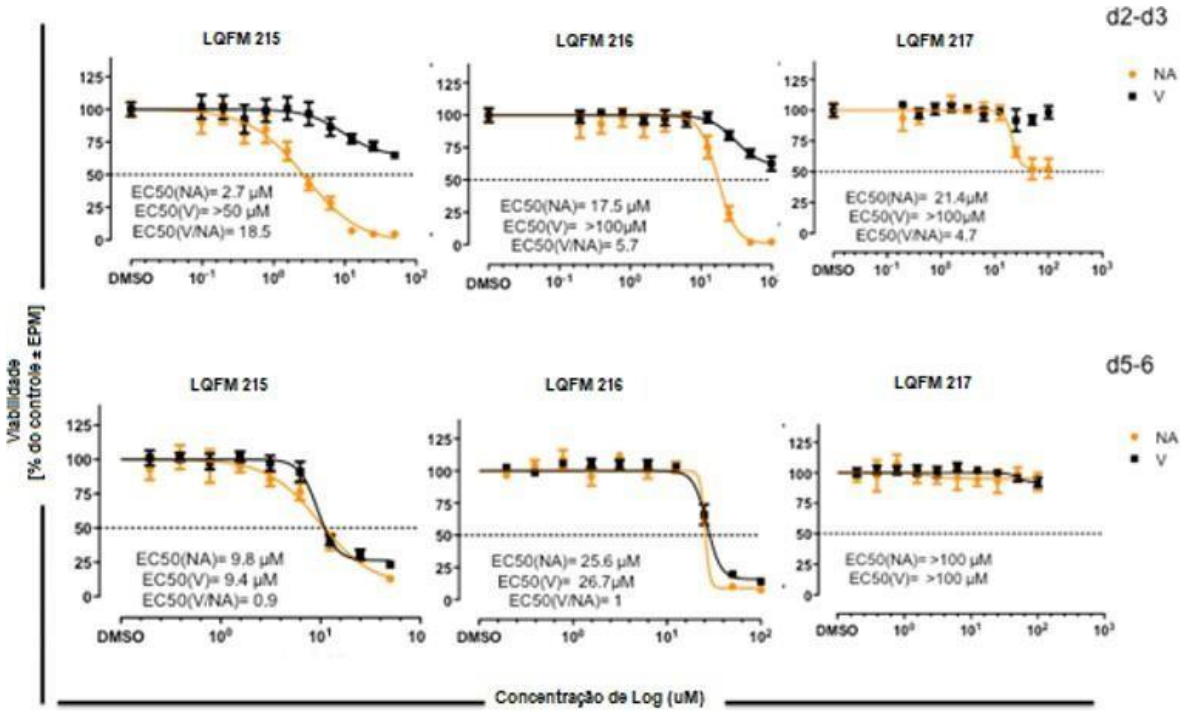


Figura 15 - Gráficos representativos do impacto dos compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 na viabilidade e na área de neuritos de células LUHMES. As células Luhmes em diferentes estágios de diferenciação (desenvolvimento: d2-3 e maduro: d5-6) foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos por 24 horas e a viabilidade celular (**V**) e a área dos neuritos (**NA**) são avaliadas por análise de imagem de alto conteúdo. Dados representativos de quatro experimentos realizados em triplicata.

Foi avaliado se o impacto do composto LQFM 215 na viabilidade das células LUHMES era reversível. Para isso, as células LUHMES foram pré-diferenciadas em meio com glicose por dois dias e tratadas no segundo dia com LQFM 215 por 24 horas em suas respectivas concentrações, que impactam na área dos neuritos e na viabilidade celular (Figura 16A). Após 24 horas de tratamento, o meio foi cuidadosamente substituído por meio fresco/quente e as células cultivadas por mais 24 horas. Na viabilidade celular, o LQFM 215 apresentou IC50 9,31 µM nas células tratadas e IC50 32,89 µM na célula lavada.

As células LUHMES também foram colocadas em co-cultura com astrócitos por cinco dias e tratadas com o composto LQFM 215 por 24 horas. O LQFM 215 reduziu a viabilidade celular no dia cinco, em células LUHMES (IC50 9,3 µM) após 24 horas de tratamento (Figura 10A). Curiosamente, o impacto do LQFM 215 na viabilidade das

células LUHMES foi impedido quando em co-culturas com astrócitos (IC50> 100 µM) (Figura 16B).

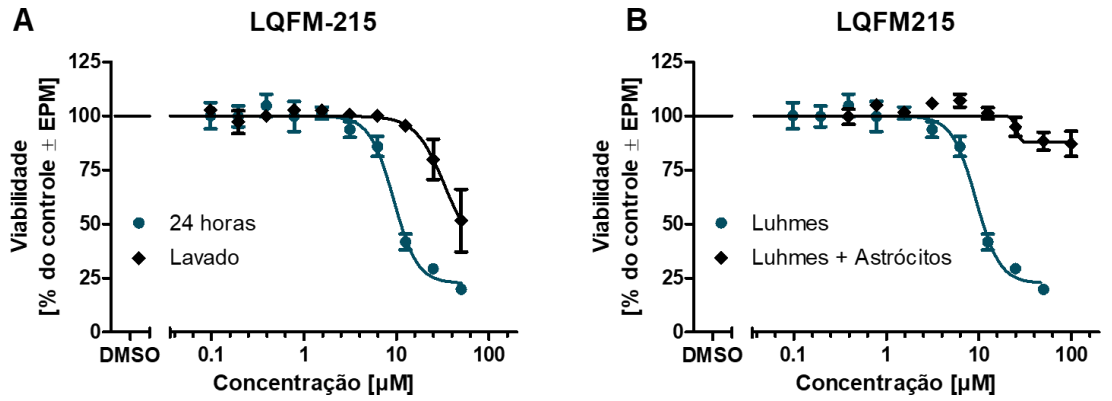


Figura 16 - Efeito do composto LQFM 215 em lavado celular e em co-cultura de astrócitos. **A.** As células LUMES (dia 4-6) foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos por 24 horas e a viabilidade celular avaliada por análise de imagem de alto conteúdo. **B.** O tratamento com o composto é seletivo para células semelhantes a neurônios e seus efeitos na viabilidade celular podem ser revertidos por co-cultura com astrócitos. Dados representativos de quatro experiências realizadas em triplicata.

4.2 Avaliação dos inibidores de PROT na viabilidade de neurônios periféricos

Os gráficos representativos do impacto dos compostos na viabilidade e no crescimento da área de neuritos de neurônios periféricos demonstraram uma menor redução da área dos neuritos e da viabilidade após o tratamento com LQFM 215 e LQFM 216, diferentemente do observado em LQFM 217 (Figura 17).

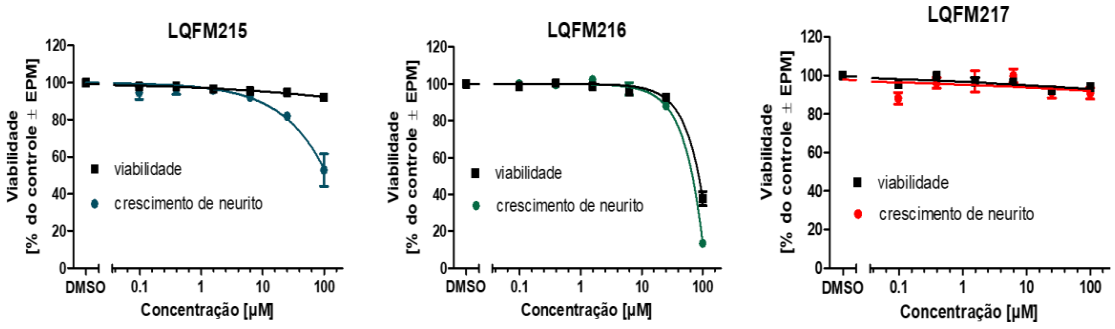


Figura 17 - Impacto dos compostos LQFM215, LQFM216 e LQFM217 em neurônios periféricos. Os neurônios periféricos foram incubados com diferentes concentrações dos compostos e a viabilidade celular e a área dos neuritos são avaliadas por análise de imagem de alto conteúdo. Dados representativos de quatro experimentos realizados em triplicata.

4.3 Avaliação dos inibidores de PROT na captação de prolina em sinaptossomas de hipocampo

O perfil de inibição dos transportadores de prolina foi avaliado primeiro na concentração de triagem de 10 µM nos sinaptossomas do hipocampo por 5 minutos, sendo o LQFM 215 o composto mais ativo (Figura 18A). LQFM215, LQFM216 e LQFM217 reduziram o transporte de prolina de maneira dependente da concentração (Figura 18B). Os valores médios de IC50 (com seu IC de 95%) foram 20,4 µM, 31,5 µM e 25,29 µM respectivamente após 5 minutos de incubação em sinaptossomas.

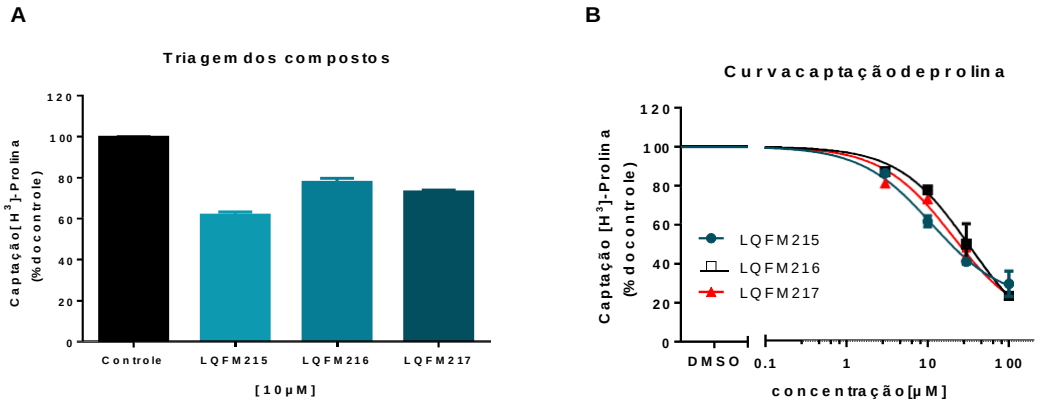


Figura 18 - Efeito dos compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 na captação de prolina em sinaptossomas. Os sinaptossomas foram incubados por 5 min a 37 °C na presença de 50 nM de [^{3}H] - prolina e 10 µM dos compostos. Os dados são médios (± EPM.) de duas experiências independentes, cada uma realizada em duplicata.

4.4 Avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto em animais tratados com LQFM 215

No teste do campo aberto em camundongos tratados com 2,5, 5 e 10 mg/kg de LQFM 215, observou-se redução significativa no número de cruzamentos entre os quadrantes do aparato na dose mais alta de 10 mg/kg (Figura 19A). Também houve uma redução significativa na maior dose testada 10 mg/kg na distância total percorrida no teste (Figura 19B). No parâmetro de auto limpeza (*grooming*) não houve diferença significativa entre as doses testadas (Figura 19C). Já no tempo total de imobilidade dos animais no teste houve um aumento significativo entre o grupo veículo e o grupo que recebeu a maior dose do composto (Figura 19D).

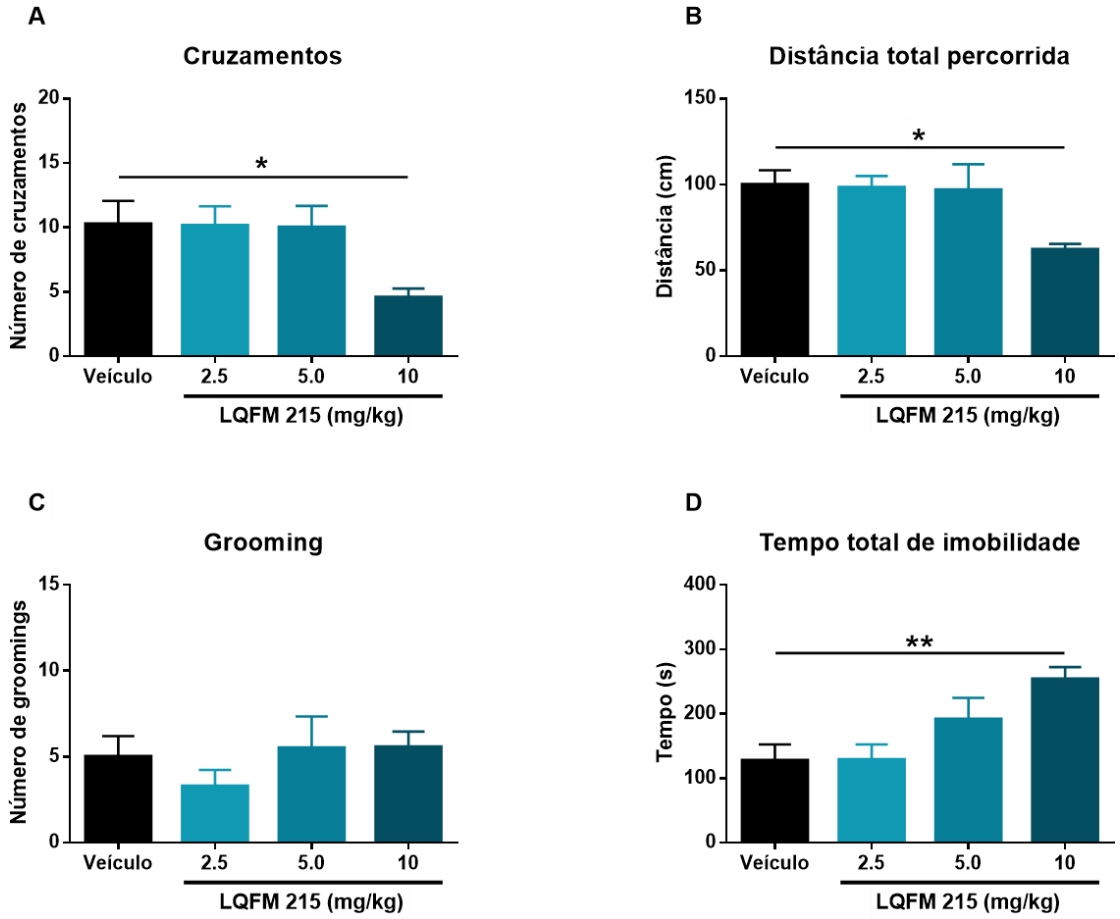


Figura 19 - Efeito do composto LQFM 215 na atividade locomotora no teste do campo aberto. Parâmetros de atividade locomotora avaliados no teste de campo aberto. Todos os dados foram expressos como média ± EPM, * p <0,05 ** p <0,05. Todos os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

Em outros parâmetros testados como número de levantamentos sobre as patas traseiras (*rearing*) houve uma redução significativa na quantidade de *rearings* do grupo que recebeu a maior dose 10 mg/kg de LQFM 215 em comparação ao grupo veículo (Figura 20E). No parâmetro do número de entradas no centro do aparato houve uma redução significativa entre o grupo tratado com a maior dose do composto e o grupo veículo (Figura 20F).

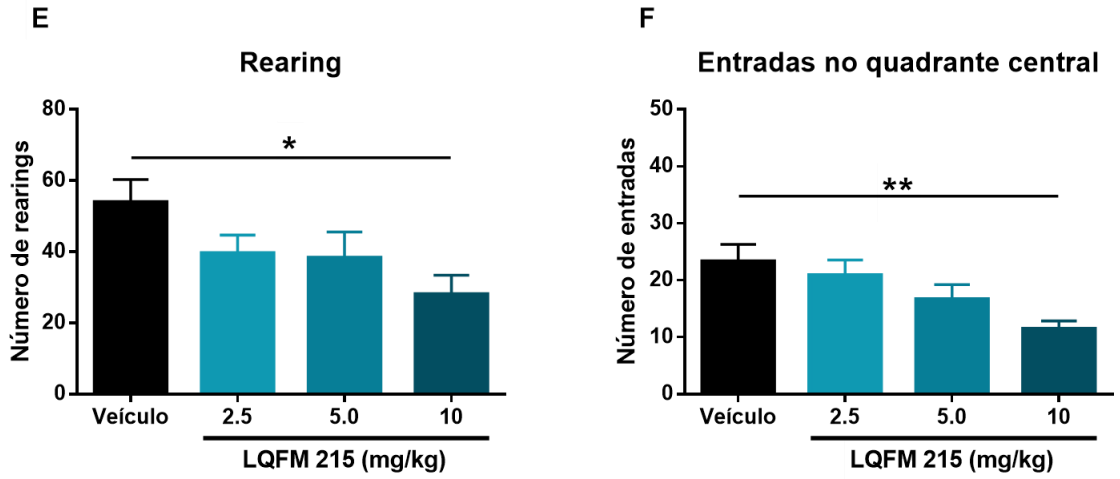


Figura 20 - Efeito do composto LQFM 215 no número de rearings e no número de entradas no quadrante central no teste do campo aberto. Todos os dados foram expressos como média ± EPM, * p <0,05 ** p <0,05. Todos os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

4.5 Avaliação do perfil ansiogênico no teste de enterrar bolinhas (marble burying) de animais tratados com LQFM 215

O teste de enterrar bolinhas é comumente utilizado para avaliar comportamento do tipo ansioso, comportamento obsessivo-compulsivo ou repetitivo em roedores. Neste teste, o composto LQFM 215 mostrou aumentar significativamente o número de bolinhas enterradas em todas as doses testadas de 2,5, 5 e 10 mg/kg quando comparados ao veículo (Figura 21).

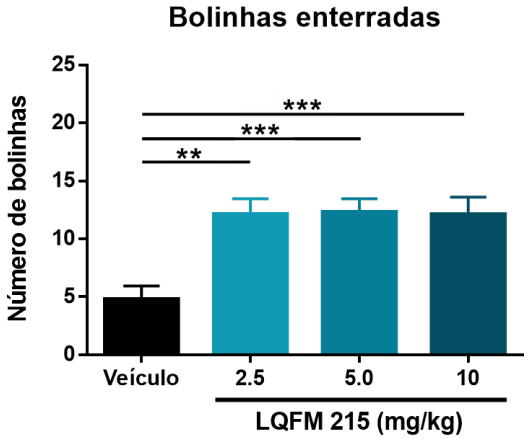


Figura 21 - Efeito do composto LQFM 215 no teste de enterrar bolinhas (marble burying). Gráfico representativo do número de bolinhas enterradas no teste de enterrar bolinhas. Todos os dados foram

expressos como média ± EPM, ** p <0,05 *** p <0,05. Todos os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

4.6 Avaliação do perfil ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado de animais tratados com LQFM 215

Analisamos o potencial efeito ansiogênico do LQFM 215 no teste do labirinto em cruz elevado. Analisamos o tempo gasto nos braços abertos e o número de entradas nos braços abertos e não observamos diferença significativa entre o grupo veículo e os animais tratados com LQFM 215 nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg (Figura 22A e 22B). O percentual de tempo gasto no braço aberto do aparato também foi verificado e não houve diferenças significativas entre as doses testadas do composto e o grupo veículo (Figura 22C).

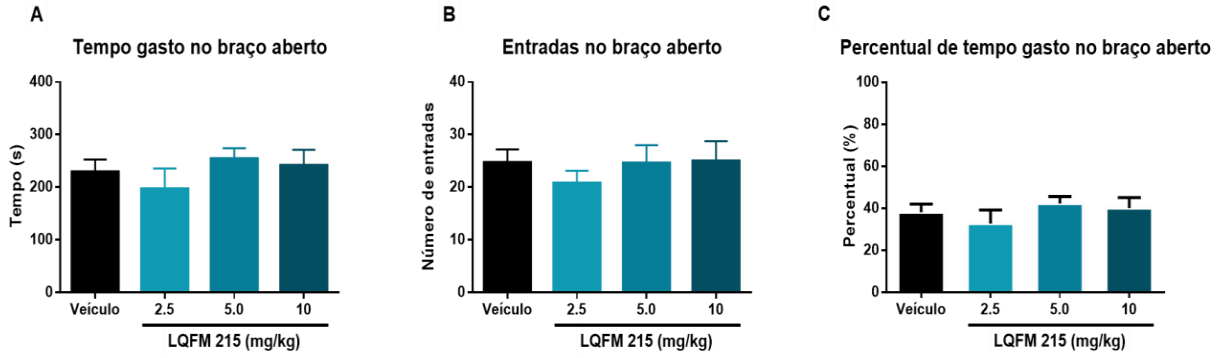


Figura 22 - Efeito do composto LQFM 215 no teste do labirinto em cruz elevado. Gráficos representativos do tempo gasto no braço aberto (A), entradas no braço aberto (B) e percentual de tempo gasto no braço aberto (C) sem diferenças significativas. Todos os dados foram expressos como média ± EPM. Todos os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

4.7 Avaliação da memória de trabalho no teste do labirinto em Y de animais tratados com LQFM 215

No teste do labirinto em Y, foi observado uma redução significativa no número de entradas nos braços do aparato na dose mais alta testada de LQFM 215 10 mg/kg quando comparado ao veículo (Figura 23A). Em relação ao índice de alternância nos braços, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo veículo e os animais tratados com LQFM 215 (Figura 23B).

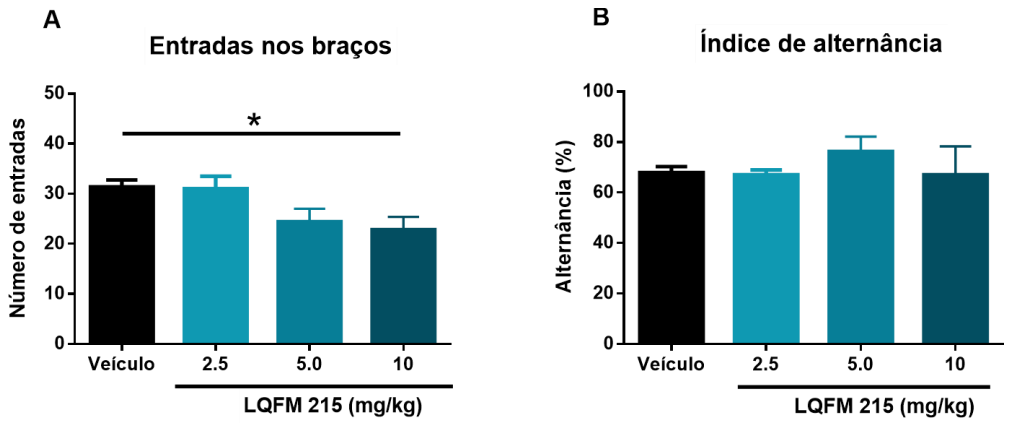


Figura 23 - Efeito do composto LQFM 215 no teste do labirinto em Y. A. Evidencia o número de entradas nos braços do aparato destacando o efeito na redução desse parâmetro no grupo que recebeu a dose mais alta do LQFM 215. **B.** Evidencia o índice de alternância no teste. Todos os dados foram expressos como média ± EPM, * p <0,05. Todos os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

4.8 Avaliação do perfil tipo depressivo no teste do nado forçado de animais tratados com LQFM 215

Avaliamos o potencial efeito depressivo do LQFM215 no teste do nado forçado. O tempo de imobilidade no teste foi contabilizado e em nenhuma das doses testadas do composto LQFM215 2,5, 5 e 10 mg/kg houve diferença significativa quando comparadas ao veículo (Figura 24).

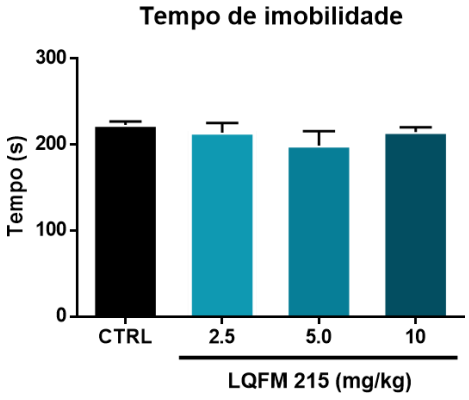


Figura 24 - Efeito do composto LQFM 215 no teste do nado forçado. Os resultados evidenciam que o composto não induz comportamento do tipo depressivo em nenhuma das doses testadas do LQFM-215. Todos os dados foram expressos como média ± EPM. Todos os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

4.9 Efeito do LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do campo aberto

A indução do modelo com cetamina (50 mg/kg) provoca a hiperlocomoção em camundongos, como observado entre o grupo veículo e o grupo que apenas recebeu a cetamina, e consequentemente reduz o tempo de imobilidade dos animais. No número de cruzamentos entre os quadrantes do aparato houve uma redução significativa ao comparar o grupo tratado com o composto LQFM 215 30 mg/kg e o grupo tratado apenas com a cetamina (Figura 25A). Na distância total percorrida no teste também houve uma redução significativa entre o grupo tratado com LQFM 215 na maior dose e o grupo apenas tratado com a cetamina (Fugura 25B). Embora no grooming não haja diferença entre os grupos tratados com o LQFM 215 há uma redução deste parâmetro quando o modelo é induzido (Figura 25C). O tempo de imobilidade como esperado aumento ao comparar o grupo tratado com a maior dose do composto e o grupo tratado apenas com a cetamina (Figura 25D).

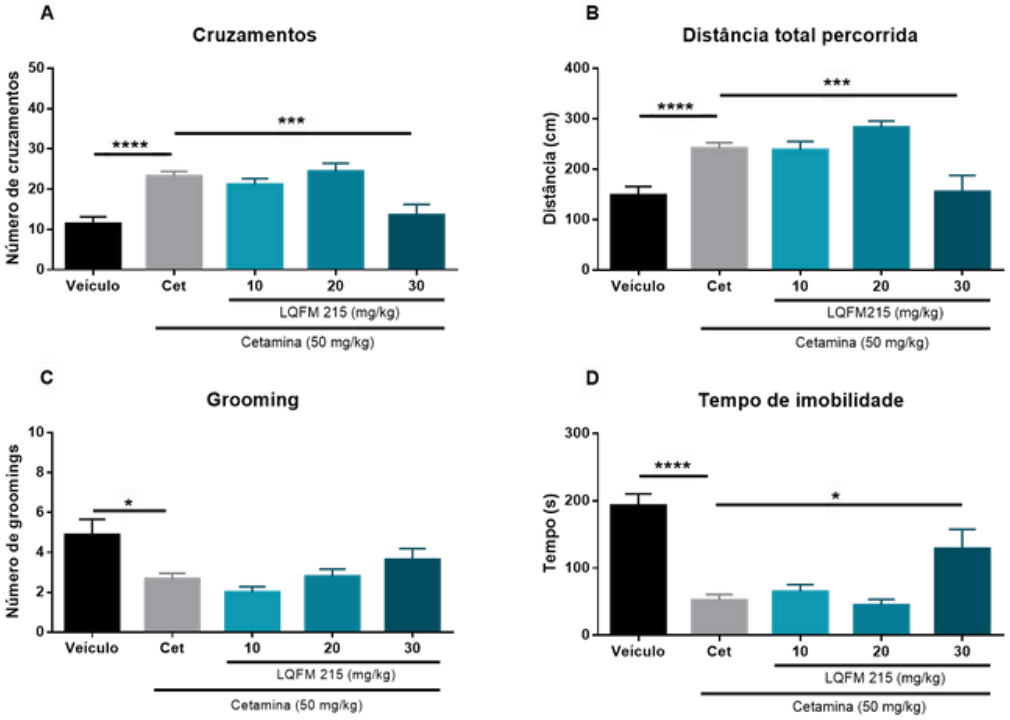


Figura 25 - Efeito do composto LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do campo aberto. Gráficos representativos dos parâmetros de exploração no teste do campo aberto em um modelo de psicose induzido por cetamina. Todos os dados foram expressos como média ± EPM, * p <0,05

*** p <0,05 **** p <0,05. Todos os dados foram analisados pelo teste ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

Ao avaliar o parâmetro de entradas no centro do aparato, os animais tratados com as doses de 20 e 30 mg/kg do LQFM 215 apresentou-se reduzido em comparação com o grupo tratado apenas com a cetamina (Figura 26E).

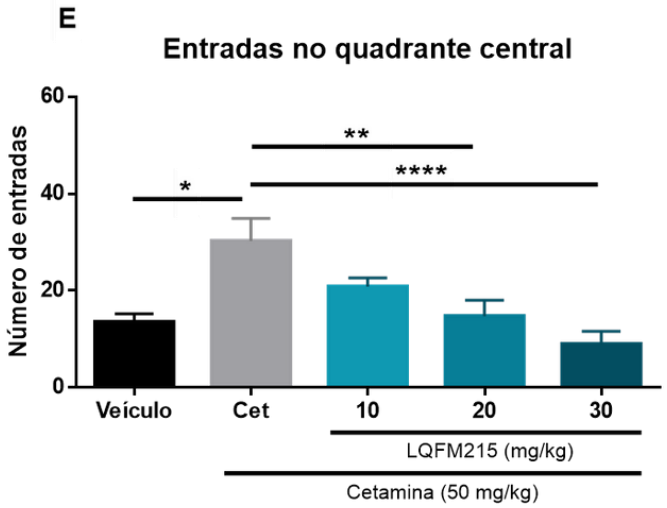


Figura 26 - Efeito do composto LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do campo aberto. Gráfico representativo do parâmetro de entradas no centro do aparato. Todos os dados foram expressos como média ± EPM, * p <0,05 ** p <0,05 **** p <0,05. Todos os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

4.10 Avaliação do efeito do LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do labirinto em Y

A indução do modelo com cetamina (50 mg/kg) provoca a hiperlocomoção em camundongos, como observado entre o grupo veículo e o grupo que apenas recebeu a cetamina bem como afeta a memória de trabalho dos animais no teste. No número de entradas nos braços do aparato houve uma redução significativa em todas as doses testadas do composto LQFM 215 em comparação ao grupo apenas tratado com a cetamina (Figura 27A). Porém não houve diferença significativa no parâmetro do índice de alternância em nenhuma dose do LQFM 215 em comparação ao grupo tratado apenas com a cetamina (Figura 27B).

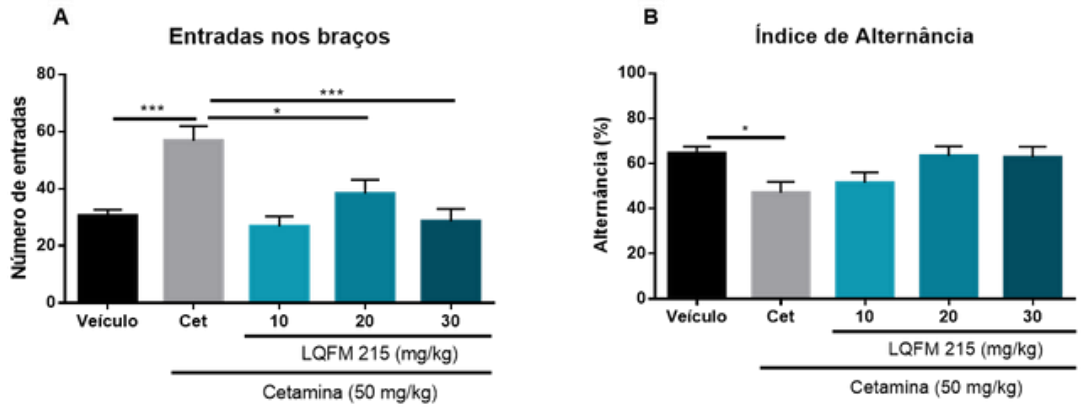


Figura 27 - Efeito do composto LQFM 215 no modelo de psicose induzido por cetamina no teste do labirinto em Y. A. Evidencia o número de entradas nos braços do aparato destacando o efeito na redução desse parâmetro no grupo que recebeu a dose mais alta do LQFM 215. **B.** Evidencia o índice de alternância no teste. Todos os dados foram expressos como média ± EPM, * p <0,05 *** p <0,05. Todos os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (n = 10 animais por grupo).

5. Discussão

Neste trabalho descrevemos o desenvolvimento de novos inibidores dos transportadores de prolina - PROT (Slc6a7) com efeito na viabilidade celular, captação de prolina, na mobilidade de animais e com potencial efeito antipsicótico.

Os compostos LQFM 215, LQFM 216 e LQFM 217 foram testados na viabilidade de culturas de células derivadas de tecido do sistema nervoso. As células percussoras neuronais dopaminérgicas humanas, também conhecida como linhagem celular mesencefálica humana de Lund (LUHMES), é um modelo útil para analisar o impacto de novas moléculas em neurônios dopaminérgico. A sinalização dopaminérgica está relacionada a patologias como Doença de Parkinson e Esquizofrenia (*Zhang, Yin e Zhang, 2014; Eisenstein et al., 2017*).

Durante o desenvolvimento, neurônios e células semelhantes a neurônios ampliam inúmeros processos que se diferenciam em dendritos e axônios. Esses processos, são conhecidos como neuritos e são críticos para a comunicação entre os neurônios (*Krug et al, 2013*). Nossos resultados indicam que os novos inibidores de PROT apresentaram baixo impacto na viabilidade celular de células em desenvolvimento (d2-d3), mas afetam o crescimento de neuritos em células LUHMES tanto em desenvolvimento (d2-d3) quanto maduros (d5-d6) quando aplicados em concentrações na faixa de micromolar (figura 9).

Vale destacar que o impacto do composto LQFM 215 é mais potente que o LQFM 216 e ao LQFM 217, principalmente em neuritos em desenvolvimento, quando comparados aos neuritos maduros. O impacto do composto LQFM-215 sobre a viabilidade de células LUHMES, causou redução na viabilidade destas células, quando em concentrações a partir de 10 uM. Entretanto, este efeito citotóxico foi revertido no protocolo de lavagem da cultura, o que indica que os efeitos dos iPROT em células LUHMES são reversíveis. Além disto, a toxicidade também foi revertida em co-cultura de LUHMES com astrócitos, o que indica maior segurança para utilização destes compostos, uma vez que a co-cultura mimetiza melhor o microambiente fisiológico.

Nós também investigamos o efeito dos compostos inibidores de PROT em neurônios periféricos a partir de cultura de células DRG. Os gânglios da raiz dorsal (DRG) são estruturas que contêm os neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico. Neste modelo, os compostos iPROT apresentaram um impacto menor na viabilidade e na área de neuritos em relação à cultura de células LUHMES. O composto LQFM 215 e LQFM

216 mantiveram um perfil semelhante embora mais discreto assim com o composto LQFM 217 não apresentou nenhum efeito. Estes dados podem nos dar um indicativo do impacto dos compostos em vias periféricas diferentemente de um perfil central.

Na análise dos compostos inibidores de PROT em sinaptossomas do hipocampo de ratos, estrutura rica na expressão destes transportadores, foi observado que os compostos são capazes inibir a captação de [^{3}H] -prolina. Esse efeito é dependente da dose e o LQFM 215 parece ser o composto mais potente como observados nas figuras 8A e 8B. Considerando que os compostos reduziram a captação de prolina de maneira dependente da concentração com respectivos IC50 de 20,4 µM, 31,5 µM e 25,29 µM, estes dados são compatíveis com animais PROT *KO* onde ocorre um acúmulo sinaptossomal de L-prolina (*Schulz et al., 2018*). Em experimentos de *Schulz* e colaboradores (2018) na captação de prolina em sinaptossomas corticais de camundongo, os animais com knockout para PROT apresentaram níveis reduzidos da captação de L-prolina, o que nos leva a concluir que assim como o bloqueio dos transportadores, a falta do PROT funcional impacta na dinâmica de transporte de L-prolina nos neurônios.

Em outros estudos de Yu e colaboradores (2009) foi constatado que a ação de inibidores dos transportadores de prolina como o GGFL, impactam na captação de L-prolina em cultura de células que expressam PROT, assim como observado nos estudos de Galli e colaboradores (1999). Desta forma os nossos resultados corroboram com os efeitos descritos anteriormente, onde a ação de inibidores afeta a dinâmica da captação de prolina nas sinapses. Além disso, utilizando neurônios corticais cultivados, foi demonstrado que a inibição da função PROT pelo GGFL leva à expressão reduzida de GluA1. Isso descartou que alterações no desenvolvimento resultantes da deficiência de PROT são causas de alterações na bioquímica da sinapse glutamatérgica e apoiaram um efeito direto da atividade do PROT na expressão e/ou estabilidade de GluA1 (*Schulz et al., 2018*).

Em posse dos resultados obtidos em células avaliamos o perfil do composto LQFM-215 no comportamento de camundongos. Primeiramente realizamos o teste de campo aberto para avaliar a atividade locomotora destes animais. Observamos neste teste que houve uma redução significativa da mobilidade dos animais no número de cruzamentos realizados no aparato e na distância total percorrida no teste, ambos na maior dose testada do composto LQFM 215 (10 mg/kg) em comparação ao grupo tratado apenas veículo (figuras 13A e 13B). O impacto de inibidores dos transportadores de prolina na redução exploratória é compatível com estudos realizados em animais PROT *KO*, ondeé

observado uma redução da distância total percorrida no mesmo contexto do campo aberto (*Schulz et al., 2018*). A redução na atividade locomotora é observada em camundongos que tem defeitos na PRODH o qual leva a modificações nas sinapses glutamatérgicas e um prejuízo na atividade locomotora (*Gogos et al., 1999; Paterlini et al., 2005*) o que leva a concluir que tanto em camundongos PROT KO e em animais tratados com inibidores destes transportadores o efeito é semelhante, o que podemos constatar com os resultados encontrados com o LQFM 215.

O número de reflexo de auto-limpeza (*groming*) não apresentou diferenças significativas (figura 13C). Em resposta, o tempo total de imobilidade dos animais apresentou-se aumentado no grupo que recebeu a maior dose do LQFM 215 (figura 13D). Estes achados apontam para uma redução não só da mobilidade, mas também do comportamento exploratório, o qual também é observado em estudos com camundongos PROT *KO* (*Schulz et al., 2018*). Em estudos acerca dos efeitos da L-prolina no SNC, como o de *Hamasu* e colaboradores (2010), níveis altos de L-prolina no cérebro levam a efeitos sedativos e redução de estereotipias em pintos neonatos, nossos resultados se assemelham a estes estudos pois ao inibir os transportadores de prolina por consequência aumentamos os níveis de prolina no SNC, com isso o aumento do tempo imóvel com o tratamento com LQFM 215 traduz esse comportamento.

O número de entradas no quadrante central no teste do campo aberto também se mostrou reduzido no grupo tratado com a maior dose do composto, apontando um comportamento do tipo ansioso nestes animais. Esse comportamento é observado em camundongos PROT KO, onde também ocorre uma redução no número de entradas no centro do aparato no teste do campo aberto (*Schulz et al.*, 2018). Em contrapartida, o parâmetro de elevação sobre as patas (rearing) também se mostrou reduzido no grupo tratado com LQFM215 na maior dose em comparação ao grupo tratado apenas com o veículo, o que indica uma redução do comportamento exploratório (figuras 14E e 14F). Desta maneira à primeira vista o nosso composto estaria induzindo um comportamento do tipo ansioso nos animais, porém ao comparar com estudos de outros modelos animais, vemos que a prolina presente no sistema por um curto período de tempo não induziria comportamentos do tipo ansioso (*Savio et al., 2012*). Já a redução do comportamento exploratório e mobilidade é observado nos estudos de *Schulz* e colaboradores (2018) em animais PROT *KO*.

Com base nestes resultados, nós realizamos os testes de enterrar bolinhas (*marble burying*). Em todas as doses testadas do LQFM 215 houve aumento do estímulo

de escavação, ou seja, aumento no número de bolinhas enterradas (figura 15). Em estudos de *Nader* e colaboradores (2019), é demonstrado um recrutamento importante da atividade hipocampal nesse teste o que pode apontar até o momento o aumento da atividade nessa região como um efeito do composto LQFM 215. Por outro lado, estudos também apontam o aumento do comportamento de enterrar como um comportamento repetitivo (*Thomas et al., 2009*).

Considerando que a redução no comportamento exploratório é comumente observada em animais submetidos à modelos de ansiedade e depressão (*Farhan et al., 2014; Willner et al., 1991*), avaliamos se os animais tratados com LQFM 215 apresentavam comportamento do tipo ansioso. Deste modo constatamos pelo teste do labirinto em cruz elevado que não se trata deste tipo de comportamento, já que em todas as doses testadas não houve diferenças significativas em comparação ao grupo tratado com veículo, em nenhum parâmetro de entradas nos braços abertos, tempo gasto no braço aberto nem no percentual de tempo no braço aberto (figura 16).

A diminuição do comportamento exploratório que os camundongos deficientes em PROT mostraram na área central do aparato no teste do campo aberto não foi causada pelo aumento do comportamento do tipo ansioso, uma vez que os animais PROT *KO* apresentam desempenho inalterado em dois testes diferentes que identificam comportamento do tipo ansioso (*Schulz et al., 2018*). Esse achado está alinhado com a observação de que a hiperprolinemia não induz ansiedade em camundongos com deficiência de PRODH (*Gogos et al., 1999*).

Em um teste diferente avaliamos o efeito do composto LQFM 215 na memória dos animais, mais especificamente na memória de trabalho. No teste do labirinto em Y constatamos novamente uma redução do comportamento exploratório, no número de entradas nos braços do aparato onde houve uma redução significativa entre o grupo tratado com a maior dose do composto e o grupo veículo (figura 17A). Por outro lado, não houve prejuízos na memória de trabalho em nenhuma dose testada ao avaliar o índice de alternância desses animais (figura 17B). Em teste comportamental semelhante ao labirinto em Y, animais PRO KO quando submetidos ao teste do labirinto radial de 8 braços não apresentam prejuízos na memória de trabalho (*Schulz et al., 2018*), o que corrobora o resultado encontrado.

Até então temos um composto que reduz o comportamento exploratório dos animais, não induz comportamentos do tipo ansioso e nem prejudica a memória de trabalho destes, porém parece ter uma atividade hipocampal importante. Em estudos

realizados com camundongos PROT *KO*, estes animais não apresentam comportamentos do tipo depressivo avaliados através de testes como o nado forçado (*Schulz et al., 2018*), demonstrando que o aumento nos níveis de L-prolina no SNC não induz esse comportamento em animais. Desta forma realizamos o teste do nado forçado e de forma semelhante não houve diferenças significativas ao avaliar o tempo de imobilidade entre os grupos testados com o LQFM 215 e o grupo veículo (figura 18) compatível com os achados da literatura.

Com base no perfil farmacológico e comportamental do LQFM 215 apresentado até o momento, analisamos seu efeito em um modelo de psicose induzido por cetamina. Neste modelo, observa-se um perfil de hiperlocomoção induzido nos animais quando comparado aos animais veículo (*Hou et al., 2013; Chatterjee et al., 2011*). O modelo utilizado nos dá indicativos para responder sobre o efeito do composto em reduzir o comportamento exploratório destes animais, e o papel dos transportadores de prolina na neurotransmissão excitatória, se tornando alvos para novos tratamentos de doenças psiquiátricas.

Avaliamos o efeito do composto LQFM 215 no modelo de psicose induzido pela cetamina realizando primeiramente o teste do campo aberto. No parâmetro dos cruzamentos entre os quadrantes do aparato observamos uma redução significativa entre o grupo tratado com 30 mg/kg do LQFM 215 e o grupo tratado apenas com a cetamina, esta redução também observada na distância total percorrida no teste (figura 19A e 19B). Ao avaliar o efeito do composto LQFM 215 vemos um efeito semelhante ao de antipsicóticos testados neste modelo, como nos trabalhos de *Chatterjee* e colaboradores (2011), onde os antipsicóticos são capazes de reduzir a mobilidade dos animais no teste do campo aberto, atenuando a hiperlocomoção induzida pelo modelo.

No parâmetro exploratório de grooming não houve diferenças entre os grupos testados em comparação com o grupo tratado com a cetamina (figura 19C). Em contrapartida houve um aumento no tempo total de imobilidade no grupo tratado com 30 mg/kg do LQFM 215 (figura 19D). No número de entradas no quadrante central do aparato houve uma redução significativa nas doses testadas de 20 e 30 mg/kg do LQFM 215 em comparação ao grupo tratado apenas com a cetamina (figura 20). O composto LQFM 215 é capaz de reduzir a mobilidade dos animais, o que podemos verificar com o aumento do tempo imóvel no teste comportamento também verificado em animais PROT KO, onde o efeito é semelhante ao de inibição dos transportadores (*Schulz et al., 2018*).

Avaliamos também o efeito do composto nesse modelo sob a perspectiva da memória de trabalho ser prejudicada na psicose, como um comprometimento cognitivo (Hou et al., 2013). Desta maneira realizamos o teste do labirinto em Y e de maneira semelhante ao perfil comportamental observado verificamos que o composto é capaz de reduzir significativamente o número de entradas nos braços do aparato em todas as doses testadas 10, 20 e 30 mg/kg do LQFM 215 (figura 21A). Do mesmo modo o índice de alternância não apresentou diferença significativa em nenhuma dose testada em comparação ao grupo tratado apenas com a cetamina, embora haja uma tendência de aumento, esta não é significativa (figura 21B). O número de entradas nos braços se apresenta alterado neste modelo devido a hiperlocomoção induzida pela cetamina como observado nos estudos de *Hou* e colaboradores (2013), este efeito é reduzido pelo composto LQFM 215 atenuando o comportamento de hiperlocomoção reduzindo a motilidade e o comportamento exploratório.

As alterações na transmissão glutamatérgica desencadeadas pelo aumento dos níveis extracelulares de prolina-L nos cérebros de animais deficientes em PRODH (*Paterlini et al., 2005*) levam a alterações comportamentais e moleculares que se espera que ocorram de maneira semelhante em camundongos PROT KO. De acordo com a observação de que Drosophila (*Hayward et al., 1993*) e camundongos (*Gogos et al., 1999*) deficientes em PRODH exibem anormalidades de movimento e atividade locomotora prejudicada, os camundongos PROT KO mostraram hipoatividade comparável (*Schulz et al., 2018*).

Tomando o conjunto dos resultados deste trabalho podemos apontar o composto LQFM 215 como um inibidor dos transportadores de prolina, um composto neuroativo e com potencial para o tratamento de desordens psiquiátricas como a esquizofrenia. Seu impacto na inibição da captação de prolina intracelular, bem como na viabilidade de células percussoras neuronais e no perfil comportamental exibido em animais, demonstra o papel importante dos transportadores de prolina na neurotransmissão excitatória.

6. Conclusões

Os compostos apresentam impactona viabilidade celular e em neuritos a nível micromolar, porém abolidos em co-cultura de astrócitos.

Os compostos apresentam um baixo impacto em neurônios periférico a nível micromolar.

Os inibidores dos transportadores de prolina tem potencial de inibir a captação de prolina em sinaptossomas de hipocampo, onde o composto LQFM-215 parece apresentar um maior potencial desta inibição;

O composto LQFM 215 foi capaz de reduzir a mobilidade dos animais sem prejudicar sua memória de trabalho e sem induzir comportamentos do tipo ansioso ou depressivo;

O composto LQFM 215 possui um efeito estimulante no teste do Marble burying, teste com recrutamento hipocampal importante;

O composto LQFM 215 foi capaz de reduzir a hiperlocomoção dos animais em um modelo de psicose induzido por cetamina.

7. Perspectivas

Em estudos futuros avaliar o fator antioxidante presente nas moléculas, já que sua composição molecular lhes confere estas propriedades.

Realizar estudos de segurança das moléculas, análises de histopatologia para investigar os aspectos do metabolismo destes compostos.

Avaliar no modelo de psicose induzido por Cetamina os sintomas negativos da esquizofrenia, investigar o efeito do composto LQFM 215 no teste de interação social de três câmaras.

8. Referências

1. ALBANO, Daniela Alexandra dos Santos. Esquizofrenia – Patologia e Terapêutica, 2012. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2012.
2. CARBON, Maren; CORRELL, Christoph U. Thinking and acting beyond the positive: the role of the cognitive and negative symptoms in schizophrenia. **CNS spectrums**, v. 19, n. S1, p. 35-53, 2014.
3. CARHART-HARRIS, Robin L. et al. The paradoxical psychological effects of lysergic acid diethylamide (LSD). **Psychological medicine**, v. 46, n. 7, p. 1379-1390, 2016.
4. CHAMBERS, Stuart M. et al. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 715, 2012.
5. CHATTERJEE, Manavi et al. Effect of 'chronic'versus 'acute'ketamine administration and its 'withdrawal'effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. **Behavioural brain research**, v. 216, n. 1, p. 247-254, 2011.
6. COHEN, Susan M.; NADLER, J. Victor. Proline-induced inhibition of glutamate release in hippocampal area CA1. **Brain research**, v. 769, n. 2, p. 333-339, 1997b.
7. COHEN, Susan M.; NADLER, J. Victor. Proline-induced potentiation of glutamate transmission. **Brain research**, v. 761, n. 2, p. 271-282, 1997a.
8. CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas.** 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
9. CRUMP, F. Thomas; FREMEAU JR, Robert T.; CRAIG, Ann Marie. Localization of the Brain-Specific High-Affinityl-Proline Transporter in Cultured Hippocampal Neurons: Molecular Heterogeneity of Synaptic Terminals. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 25-39, 1999.
10. EISENSTEIN, Sarah A. et al. Preliminary evidence that negative symptom severity relates to multilocus genetic profile for dopamine signaling capacity and D2 receptor binding in healthy controls and in schizophrenia. **Journal of psychiatric research**, v. 86, p. 9-17, 2017.
11. FARHAN, Muhammad et al. Unpredictable chronic mild stress induced behavioral deficits: a comparative study in male and female rats. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 27, n. 4, 2014.
12. FLEISCHHACKER, W. Wolfgang; UCHIDA, Hiroyuki. Critical review of antipsychotic polypharmacy in the treatment of schizophrenia. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 7, p. 1083-1093, 2014.
13. FREMEAU, Robert T. et al. A novel nonopioid action of enkephalins: competitive inhibition of the mammalian brain high affinity L-proline transporter. **Molecular pharmacology**, v. 49, n. 6, p. 1033-1041, 1996.

14. GALLI, Aurelio et al. l-Proline and l-Pipecolate Induce Enkephalin-Sensitive Currents in Human Embryonic Kidney 293 Cells Transfected with the High-Affinity Mammalian Brainl-Proline Transporter. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 15, p. 6290-6297, 1999.
15. GELDER, M.; MAYOU, R.; COWEN, P. **Tratado de Psiquiatria**, 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
16. GOGOS, Joseph et al. The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. **Nature genetics**, v. 21, n. 4, p. 434-439, 1999.
17. GOLAN, David et al. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. In: **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2009. p. xxiv, 952-xxiv, 952.
18. GRIFFITHS, Roland R. et al. Mystical-type experiences occasioned by psilocybin mediate the attribution of personal meaning and spiritual significance 14 months later. **Journal of psychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 621-632, 2008.
19. HALES, R.; YUDOFSKY, S.; GABBARD, G. **Tratado de psiquiatria clínica.** 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
20. HAMASU, Kousuke et al. Intracerebroventricular injection of L-proline and D-proline induces sedative and hypnotic effects by different mechanisms under an acute stressful condition in chicks. **Amino Acids**, v. 38, n. 1, p. 57-64, 2010.
21. HARVEY, Robert J.; YEE, Benjamin K. Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 11, p. 866-885, 2013.
22. HAYWARD, D. C. et al. The sluggish-A gene of Drosophila melanogaster is expressed in the nervous system and encodes proline oxidase, a mitochondrial enzyme involved in glutamate biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 7, p. 2979-2983, 1993.
23. HEINRICHS, R. Walter. Cognitive improvement in response to antipsychotic drugs: neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. **Archives of general psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 631-632, 2007.
24. HENZI, VICTOR et al. L-proline activates glutamate and glycine receptors in cultured rat dorsal horn neurons. **Molecular pharmacology**, v. 41, n. 4, p. 793-801, 1992.
25. HOU, Yue et al. Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 107-116, 2013.
26. JAYANTHI, Lankupalle D. et al. Differential regulation of mammalian brain-specific proline transporter by calcium and calcium-dependent protein kinases. **British journal of pharmacology**, v. 129, n. 3, p. 465, 2000.
27. JOHNSON, J. W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, v. 325, n. 6104, p. 529-531, 1987.

28. JUÁREZ OLGUÍN, Hugo et al. The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.
29. JÚNIOR, Quirino cordeiro. Estudo de associação entre genes do sistema dopaminérgico de esquizofrenia. Originalmente apresentada como dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2007.
30. KANE, John et al. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic: a double-blind comparison with chlorpromazine. **Archives of general psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 789-796, 1988.
31. KRUG, Anne K. et al. Evaluation of a human neurite growth assay as specific screen for developmental neurotoxicants. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 12, p. 2215-2231, 2013.
32. LAU, Chi-Ieong et al. Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia? **Reviews in the Neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 389-400, 2013.
33. LEE, Gloria Soo-yeon; ZHOU, Yi. NMDAR hypofunction animal models of schizophrenia. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 12, p. 185, 2019.
34. LOPES-AZEVEDO, Silvana; BUSNARDO, Cristiane; CORRÊA, Fernando Morgan Aguiar. Mechanism of the cardiovascular responses caused by L-proline microinjected into the supraoptic nucleus of the hypothalamus in unanesthetized rats. **Amino acids**, v. 45, n. 4, p. 797-810, 2013.
35. LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
36. MARTIN, David; AULT, Brian; NADLER, J. Victor. NMDA receptor-mediated depolarizing action of proline on CA1 pyramidal cells. **European journal of pharmacology**, v. 219, n. 1, p. 59-66, 1992.
37. MELTZER, Herbert Y. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 1, p. S18-S27, 1989.
38. MELTZER, Herbert Y.; SOMMERS, Alison A.; LUCHINS, Daniel J. The effect of neuroleptics and other psychotropic drugs on negative symptoms in schizophrenia. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 6, n. 6, p. 329-338, 1986.
39. MIYAMOTO, S. et al. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 79-104, 2005.
40. MOGHADDAM, Bita; JAVITT, Daniel. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 4-15, 2012.
41. NADER, Karolina et al. Loss of serum response factor in mature neurons in the dentate gyrus alters the morphology of dendritic spines and hippocampus-dependent behavioral tasks. **Brain Structure and Function**, v. 224, n. 8, p. 2691-2701, 2019.

42. PACE, John R. et al. High concentrations of neutral amino acids activate NMDA receptor currents in rat hippocampal neurons. **Neuroscience letters**, v. 141, n. 1, p. 97-100, 1992.
43. PATERLINI, Marta et al. Transcriptional and behavioral interaction between 22q11. 2 orthologs modulates schizophrenia-related phenotypes in mice. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 1586-1594, 2005.
44. PINTO, Mauro Cunha Xavier. Efeito neuroprotetor da inibição do transportador de glicina do tipo 1. 2014.
45. POWERS III, Albert R. et al. Ketamine-induced hallucinations. **Psychopathology**, v. 48, n. 6, p. 376-385, 2015.
46. RANG, H.P; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale farmacologia.** 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
47. RHOADS, Dennis E.; PETERSON, N. A.; RAGHUPATHY, E. Selective inhibition of synaptosomal proline uptake by leucine and methionine enkephalins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 20, p. 12233-12237, 1983.
48. ROLLAND, Benjamin et al. Pharmacology of hallucinations: several mechanisms for one single symptom? **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
49. RUGGIERO, Rafael N. et al. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 44, n. 2, p. 143-156, 2011.
50. SAVIO, Luiz Eduardo Baggio et al. Behavioral changes induced by long-term proline exposure are reversed by antipsychotics in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36, n. 2, p. 258-263, 2012.
51. SCHULZ, Daniel et al. Inactivation of the mouse L-proline transporter PROT alters glutamatergic synapse biochemistry and perturbs behaviors required to respond to environmental changes. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 11, p. 279, 2018.
52. SHAFQAT, Saad et al. Human brain-specific L-proline transporter: molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of the gene in human and mouse genomes. **Molecular Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 219-229, 1995.
53. SHIRLEY, Matt; PERRY, Caroline M. Aripiprazole (ABILIFY MAINTENA®): a review of its use as maintenance treatment for adult patients with schizophrenia. **Drugs**, v. 74, n. 10, p. 1097-1110, 2014.
54. STAHL, S.M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
55. STEEDS, Hannah; CARHART-HARRIS, Robin L.; STONE, James M. Drug models of schizophrenia. **Therapeutic advances in psychopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 43-58, 2015.
56. STIEGLER, Nina V. et al. Assessment of chemical-induced impairment of human neurite outgrowth by multiparametric live cell imaging in high-density cultures. **Toxicological Sciences**, v. 121, n. 1, p. 73-87, 2011.

57. TAKEMOTO, Yumi. Depressor responses to L-proline microinjected into the rat ventrolateral medulla are mediated by ionotropic excitatory amino acid receptors. **Autonomic Neuroscience**, v. 120, n. 1-2, p. 108-112, 2005.
58. THOMAS, Alexia M. et al. Group I metabotropic glutamate receptor antagonists alter select behaviors in a mouse model for fragile X syndrome. **Psychopharmacology**, v. 219, n. 1, p. 47-58, 2012.
59. THOMSON, James A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.
60. VAN OS, J.; KAPUR, S. Schizophrenia. Seminar. **Lancet**, v. 374, 2009.
61. VEERMAN, Selene RT; SCHULTE, Peter FJ; DE HAAN, Lieuwe. Treatment for negative symptoms in schizophrenia: a comprehensive review. **Drugs**, v. 77, n. 13, p. 1423-1459, 2017.
62. VOLLENWEIDER, Franz X. et al. Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. **Neuroreport**, v. 9, n. 17, p. 3897-3902,1998.
63. WILLNER, Paul. Animal models as simulations of depression. **Trends in pharmacological sciences**, v. 12, p. 131-136, 1991.
64. WILSON, Julie M.; SANYAL, Suparna; VAN TOL, Hubert HM. Dopamine D2 and D4 receptor ligands: relation to antipsychotic action. **European journal of pharmacology**, v. 351, n. 3, p. 273-286, 1998.
65. YANG, Yen Kuang et al. Correlation between fine motor activity and striatal dopamine D2 receptor density in patients with schizophrenia and healthy controls. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 123, n. 3, p. 191-197, 2003.
66. YANKELEVITCH-YAHAV, Roni et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 97, p. e52587, 2015.
67. YU, Xuan-Chuan et al. Discovery and characterization of potent small molecule inhibitors of the high affinity proline transporter. **Neuroscience letters**, v. 451, n. 3, p. 212-216, 2009.
68. ZHANG, Xiao-min; YIN, Ming; ZHANG, Min-hua. Cell-based assays for Parkinson's disease using differentiated human LUHMES cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 7, p. 945-956, 2014.
69. ZIPP, G. Greg et al. Novel inhibitors of the high-affinity L-proline transporter as potential therapeutic agents for the treatment of cognitive disorders. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 16, p. 3886-3890, 2014.

Anexo A – Aprovação do comitê de ética

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA

UFG

C E R T I F I C A D O

- Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS PARA DESCOBERTA DE NOVAS DROGAS NEUROATIVAS", registrada com o protocolo nº 044/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), *ad referendum*.

- Finalidade: ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização:31 de outubro de 2022
- Espécie/linhagem/raça: Camundongos/Swiss
- Nº de animais autorizados: 620 animais
- Peso/Idade: 8-12 semanas, 40-60 gramas
- Sexo: 540 machos e 80 fêmeas
- Origem (fornecedor): Biotério Central/UFG

Dra. Liliana Borges de Menezes Leite
Vice-Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

Anexo B – Comprovante de depósito de patente

DECLARAÇÃO DE ENVIO DE FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO PARA PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE

Declaramos para os devidos fins, a pedido das partes interessadas, que **MAURO CUNHA XAVIER PINTO**, CPF: 075.186.466-85; **RICARDO MENEGATTI**, CPF: 932.996.489-34; **FRANÇOIS GERMAIN NOËL**, CPF 837.112.797-91; **ELAINE MARIA DE SOUZA FAGUNDES**, CPF: 572.064.906-97; **LUCIANO MORAES LIÃO**, CPF: 526.967.821-72; **GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO**, CPF: 855.226.605-97; **RAFAELA RIBEIRO SILVA**, CPF: 118.889.847-75; **ONÉSIA CRISTINA OLIVEIRA LIMA**, CPF: 065.932.216-19; **RICARDO CAMBRAIA PARREIRA**, CPF: 088.753.816-90; **LEIDIANA DE ALMEIDA COSTA**, CPF: 110.159.576-09; **FLÁVIO SILVA DE CARVALHO**, CPF: 009.156.491-36; **ANDRÉ LUIS BATISTA DA ROCHA** CPF: 041.386.641-65, preencheram e enviaram, em 18/03/2020, Formulário de Avaliação para Pedido de Depósito de Patente da UFG, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI. Maiores informações acerca da invenção encontram-se no Setor de Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia – SPITT, tendo em vista o teor sigiloso da mesma.

Goiânia, 30 de abril de 2020.

Profa. Helena Carasek Cascudo
Diretora de Transferência e Inovação Tecnológica
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - PRPI

Anexo C – Termo de confidencialidade

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COORDENAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

Eu, (Nome), (nacionalidade), (estado civil), (profissão), portador da carteira de identidade n.º (nº), expedida pelo (órgão expedidor), e do CPF n.º (nº), residente e domiciliado na (endereço), (Bairro), (CEP), Goiânia-GO, assumo o compromisso de manter confidencialidade e sigilo sobre a(s) **TECNOLOGIA(S)** e todas as informações técnicas, científicas, metodologias, processos e observações apresentadas e discutidas no âmbito da defesa do aluno (nome do aluno) ocorrida no dia (data).

Estou ciente também que não poderei fazer registro fotográfico, filmar ou mesmo gravar as discussões, apresentações técnicas e/ou outras informações verbais ocorridas no ambiente da referida defesa.

Considerando as expressões assim definidas:

> "**Informação Confidencial**" significará toda informação revelada relacionada a tecnologia descrita, através da execução do projeto, a respeito de, ou, associada com a Avaliação, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios.
>
> "**Informação Confidencial**" inclui, mas não se limita à informação relativa às operações, processos, planos ou intenções, informações sobre produção, instalações, equipamentos, segredos de negócio, segredos de fábrica, dados, habilidades especializadas, projetos, métodos e metodologia, fluxogramas, especificações, componentes, fórmulas, produtos, amostras, diagramas, desenhos, desenhos de esquema industrial, patentes, oportunidades de mercado e questões relativas a negócios revelados durante a execução do projeto.
>
> "**Avaliação**" significará todas e quaisquer discussões, conversações ou negociações entre, ou com as partes, de alguma forma relacionada ou associada com a apresentação da proposta acima mencionada.

Por este termo de confidencialidade e sigilo comprometo-me também:

1. A não utilizar as informações confidenciais a que tiver acesso, para gerar benefício próprio exclusivo e/ou unilateral, presente ou futuro, ou para o uso de terceiros;
2. A não apropriar para si ou para outrem de material confidencial e/ou sigiloso das informações tecnológicas que venham a ser disponibilizadas;
3. A não repassar o conhecimento das informações confidenciais, por todas as pessoas que vierem a ter acesso às informações, por seu intermédio, e obrigando-se, assim, a ressarcir a ocorrência de qualquer dano e / ou prejuízo oriundo de uma eventual quebra de sigilo das informações fornecidas sem a autorização escrita da **(nome da pessoa)**.

A vigência da obrigação de confidencialidade e sigilo, assumida pela minha pessoa, por meio deste termo, só poderá ser quebrada mediante autorização por escrito, concedida à minha pessoa, pela **(nome da pessoa)**.

Pelo não cumprimento do presente Termo de Confidencialidade e Sigilo, fica o abaixo assinado ciente de todas as sanções judiciais que poderão advir.

Goiânia, (dia) de (mês) de 2014.

_____

Assinatura