



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**EFEITO NEUROPROTETOR DA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR  
DE PROLINA (SLC6A7)**

**GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO**

**Goiânia-GO**

**2024**



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

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 NEUROPROTETOR DA INIBIÇÃO 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     NÃO<sup>1</sup>

[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, Professor do Magistério Superior**, em 02/01/2025, às 14:19, 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 **Gustavo Almeida De Carvalho, Discente**, em 02/01/2025, às 15:15, 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](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5072640** e o código CRC **9E13B838**.

---

Referência: Processo nº 23070.059385/2024-79

SEI nº 5072640

**GUSTAVO ALMEIDA DE CARVALHO**

**EFEITO NEUROPROTETOR DA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR  
DE PROLINA (SLC6A7)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, para a defesa de produto final - Nível Doutorado.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto  
Coorientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

**Goiânia-GO**

**2024**

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

Carvalho, Gustavo Almeida de  
EFEITO NEUROPROTETOR DA INIBIÇÃO DO  
TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7) [manuscrito] / Gustavo  
Almeida de Carvalho. - 2024.  
LXXXI, 81 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto; co-orientador Dr.  
Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, Goiânia, 2024.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de  
tabelas.

1. L-prolina. 2. SLC6a7. 3. PROT. 4. IPROT. 5. Neurodegeneração.  
I. Pinto, Mauro Cunha Xavier, orient. II. Título.

CDU 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata nº 127 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Gustavo Almeida de Carvalho** o título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e nove dias do mês de novembro de 2024, a partir das 13:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “EFEITO NEUROPROTETOR DE INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7)”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Mauro Cunha Xavier Pinto (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Bruno Benetti Giunta Torres (EVZ - UFG), membro titular externo; Professor Doutor João Francisco Cordeiro Pedrazzi (USP), membro titular externo; Professora Doutora Onésia Cristina de Oliveira Lima (HDT), membro titular externo; Professor Doutor Diego Basile Colugnati (ICB - UFG), membro titular interno. 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 Tese, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor 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, aos vinte e nove dias do mês de novembro de 2024.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

EFEITO NEUROPROTETOR DA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (SLC6A7)



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 17:34, 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 **Diego Basile Colugnati, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 17:35, 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 **João Francisco Cordeiro Pedrazzi, Usuário Externo**, em 29/11/2024, às 18:05, 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 **Onésia Cristina de Oliveira Lima, Usuário Externo**, em 02/12/2024, às 15:51, 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 **Bruno Benetti Giunta Torres, Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2024, às 09:54, 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](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4990863** e o código CRC **001A55DB**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.059385/2024-79

SEI nº 4990863



*“Todo homem, se estiver tão determinado, pode se tornar o escultor de seu próprio cérebro.”*

Santiago Ramón y Cajal

## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto pela orientação e parceria durante os 7 anos que trilhei no Neurolab, pelos ensinamentos e oportunidades que pode me proporcionar, sem sua orientação, não seria capaz de construir meu caminho profissional.

Aos professores da UFMG, Dr. Antônio de Oliveira, Dra. Luciene Vieira, Dra. Elaine Fagundes, Dr. Célio Junior por me receberem na UFMG e me auxiliarem durante 1 ano no desenvolvimento de parte deste trabalho e aos colegas do Neurofar que me auxiliaram enquanto estive em Belo Horizonte.

Aos meus colegas de trabalho do Neurolab, especialmente os que me acompanharam desde a minha iniciação científica, o Me. Raul Izidoro e a Profa. Dra. Raphaela Chiareli, sem a parceria e o apoio incondicional nada seria possível.

Aos meus colegas do PPGCB, Marcos Divino e Keilah Cavalcante pela parceria nos corredores do ICB e na correria da pós-graduação.

Aos meus pais Sérgio Carvalho e Ana Luiza Carvalho e aos meus irmãos Bruno Carvalho e Marianne Carvalho que sempre me apoiaram e me incentivaram em todas as minhas escolhas.

À minha esposa Raquel Carneiro que esteve ao meu lado sempre em todos os momentos me apoiando, me incentivando e me aconselhando.

Aos meus amigos de longa data Caio Leite, Paula Casé, Carlos Eduardo Mascarenhas, Rodrigo Marques, Larissa Midlej, Nathália Mangureira, Gabriel Guimarães que mesmo de longe estão sempre presentes em minha vida no apoio incondicional.

Por fim, dedico este trabalho a minha querida avó Maria Auxiliadora (Vó Lia) que não está mais entre nós, porém sonhava em ter um neto doutor, com certeza estaria orgulhosa.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| Lista de abreviaturas e siglas .....  | 12 |
| Lista de figuras .....  | 14 |
| Lista de tabelas .....  | 16 |
| Resumo.....   | 17 |
| Abstract .....  | 18 |
| 1. Divulgação científica e popularização da ciência.....                          | 19 |
| 2. Introdução.....  | 20 |
| 2.1. A transmissão sináptica.....   | 20 |
| 2.2. Metabolismo da L-prolina.....  | 22 |
| 2.3. A via da L-prolina no encéfalo.....  | 25 |
| 2.4. O transportador de prolina (PROT/SLC6A7) .....                               | 27 |
| 2.5. A neurotransmissão glutamatérgica.....                                       | 30 |
| 2.6. Demência, Neurodegeneração e Doença de Alzheimer.....                        | 31 |
| 3. Justificativa.....   | 35 |
| 4. Objetivo.....  | 36 |
| 4.1. Objetivo geral.....  | 36 |
| 4.2. Objetivos específicos .....  | 36 |
| 5. Metodologia.....   | 37 |
| 5.1. Análises <i>in silico</i> .....  | 37 |
| 5.1.1. Modelagem molecular, otimização e busca por sítio de ligação do PROT ..... | 37 |
| 5.1.2. Molecular Docking.....   | 37 |
| 5.2. Análises bioquímicas e de biologia molecular.....                            | 38 |
| 5.2.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....                    | 38 |
| 5.2.2. <i>Western-blot</i> .....  | 39 |
| 5.3. Análises <i>ex vivo</i> .....  | 40 |
| 5.3.1. Sinaptossomas.....   | 40 |
| 5.4. Análises <i>in vivo</i> .....  | 41 |
| 5.4.1. Animais.....   | 41 |
| 5.4.2. Compostos e tratamentos.....   | 41 |
| 5.4.3. Cirurgia de estereotaxia.....  | 42 |
| 5.4.4. Teste do campo aberto.....   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 5.4.5. Teste do labirinto em cruz-elevado .....  | 44 |
| 5.4.6. Teste de reconhecimento de novo objeto ( <i>NORT</i> ) .....  | 45 |
| 5.5. Análises morfológicas.....  | 46 |
| 5.5.1. Coloração de Golgi.....   | 46 |
| 5.6. Estatística .....   | 47 |
| 6. Resultados.....   | 47 |
| 6.1. O papel da prolina no SNC .....   | 47 |
| 6.1.1. L-prolina afeta o conteúdo de Ca <sup>2+</sup> intracelular em sinaptossomas corticais e hipocampais.....           | 48 |
| 6.1.2. L-prolina altera perfil motor/exploratório de camundongos e não causa comportamento do tipo ansioso.....            | 48 |
| 6.2. O papel do transportador de prolina (SLC6A7) no SNC.....  | 51 |
| 6.2.1. PROT ( <i>Slc6a7</i> ) é expresso no encéfalo e possui ampla distribuição.....                                      | 51 |
| 6.2.2. <i>PROT</i> ( <i>Slc6a7</i> ) é específico do encéfalo em diferentes regiões .....                                  | 52 |
| 6.2.3. PROT é um alvo farmacológico dos inibidores iPROT, LQFM215 e LX6171 .....   | 53 |
| 6.2.4. iPROT afeta o conteúdo de cálcio intracelular em sinaptossomas corticais e hipocampais semelhante a L-prolina ..... | 56 |
| 6.2.5. iPROT altera perfil motor/exploratório de camundongos e não causa comportamento do tipo ansioso.....                | 57 |
| 6.3. O transportador de prolina (SLC6A7) como alvo terapêutico .....   | 59 |
| 6.3.1. iPROT possui potencial neuroprotetor em modelo animal de Doença de Alzheimer .....                                  | 59 |
| 6.3.2. iPROT preserva a memória e os brotamentos dendríticos de animais submetidos ao modelo de DA.....                    | 63 |
| 6.3.3. iPROT altera expressão de proteínas da neurotransmissão glutamatérgica e da via do BDNF .....                       | 64 |
| 5. Discussão.....  | 66 |
| 6. Conclusão .....   | 71 |
| 7. Referências .....   | 72 |
| 8. Anexos.....   | 77 |

## Lista de abreviaturas e siglas

**AA** - aminoácido;  
**AEA** - anandamida  
**AMPA** - amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato;  
**AT** – tecido adiposo;  
**AVC** – acidente vascular cerebral;  
**A $\beta$**  - amiloide beta;  
**BDNF** - fator neurotrófico derivado do encéfalo;  
**CA** - cainato;  
**CA1** - *cornu ammonis 1*  
**CEUA** - comissão de ética no uso de animais;  
**CoQ** - coenzima Q;  
**CytC** - citocromo C;  
**DA** - doença de Alzheimer;  
**DAT** - transportador de dopamina;  
**DO** - densidade óptica;  
**eCBs** – endocanabinoides;  
**EROs** - espécies reativas de oxigênio;  
**GABA** - ácido  $\gamma$ -aminobutírico;  
**GlyT1** - transportador de glicina do tipo 1;  
**GlyT2** - transportador de glicina do tipo 2;  
**iGluRs** - receptores de glutamato ionotrópicos;  
**IHP** - intrahipocampal  
**IPP** - inibição de pré-pulso;  
**iPROT** - inibidor dos transportadores de prolina;  
**KA** -  $\alpha$ -cetoácido;  
**KRH** - Krebs-Ringer-HEPES  
**LTD** - depressão a longo prazo;  
**LTP** - potencialização a longo prazo;  
**mGluRs** - receptores de glutamato metabotrópicos;  
**NMDA** - N-metil-D-aspartado;  
**NMDAR** - receptor de NMDA;

**NTT4** - *synaptic vesicle protein*;

**P5C** - 1-pirrolina-5-carboxílico;

**PCR** - reação em cadeia da polimerase;

**PEP** - potencial excitatório pós-sináptico;

**PIP** - potencial inibitório pós-sináptico;

**PRODH** - prolina desidrogenase;

**PROT** - transportador de prolina;

**PROT-KO** - *knockout* para o transportador de prolina;

**RM** - ressonância magnética;

**Slc6a14** - *solute carrier family 6 member 14*;

**Slc6a17** - *solute carrier family 6 member 17*;

**Slc6a20** - *solute carrier family 6 member 20*;

**Slc6a5** - *solute carrier family 6 member 5*;

**Slc6a7** - *solute carrier family 6 member 7*;

**Slc6a9** - *solute carrier family 6 member 9*;

**SNC** - sistema nervoso central;

**TC** - tomografia computadorizada;

## Lista de figuras

- Figura 1.** Representação de uma sinapse química padrão.
- Figura 2.** Síntese e degradação da L-prolina.
- Figura 3.** Distribuição neuroanatômica da L-Prolina no encéfalo.
- Figura 4.** Localização genômica, características estruturais e afinidade funcional dos transportadores de L-prolina na família SLC6 SLC6a7 (PROT), SLC6a17 (NTT4) e SLC6a20 (IMINO).
- Figura 5.** Distribuição neuroanatômica do gene SLC6A7 em cérebros humanos e de camundongos.
- Figura 6.** Alterações patológicas na doença de Alzheimer.
- Figura 7.** Delineamento experimental.
- Figura 8.** Representação da cirurgia de estereotaxia para acessar regiões de interesse.
- Figura 9.** Representação do aparato do campo aberto.
- Figura 10.** Representação do aparato de cruz elevado.
- Figura 11.** Representação do aparato do teste reconhecimento de novos objetos (NORT).
- Figura 12.** Análise do efeito da L-prolina em sinaptossomas corticais e hipocampais de camundongos C57BL/6 quanto ao conteúdo de Ca<sup>2+</sup> intracelular.
- Figura 13.** Análise do efeito comportamental da L-prolina ICV em camundongos C57BL/6 no teste do campo aberto.
- Figura 14.** Análise do efeito comportamental da L-prolina ICV em camundongos C57BL/6 no teste do campo aberto.
- Figura 15.** Análise do efeito comportamental da L-prolina ICV em camundongos C57BL/6 no teste do labirinto em cruz elevado.
- Figura 16.** Análise de expressão relativa do transportador de prolina (SLC6a7/PROT) no encéfalo de camundongos C57BL/6 por rtPCR.
- Figura 17.** Análise da expressão de PROT em diferentes regiões encefálicas.
- Figura 18.** Estrutura e *docking* molecular do PROT com o iPROT, LX6171 e o LQFM215.
- Figura 19.** Análise do efeito do iPROT em sinaptossomas corticais e hipocampais de camundongos C57BL/6 quanto ao conteúdo de Ca<sup>2+</sup> intracelular.
- Figura 20.** Análise do efeito comportamental do iPROT em camundongos C57BL/6 no teste do campo aberto.

**Figura 21.** Análise do efeito comportamental do iPROT em camundongos C57BL/6 no teste do labirinto em cruz elevado.

**Figura 22.** Análise do efeito do pré-tratamento com iPROT em camundongos C57BL/6 submetidos a IHP de A $\beta$  no teste do campo aberto.

**Figura 23.** Análise do efeito do pré-tratamento com iPROT em camundongos C57BL/6 submetidos a IHP de A $\beta$  no teste de reconhecimento de novo objeto.

**Figura 24.** Análise do efeito do pré-tratamento com iPROT em camundongos C57BL/6 submetidos a IHP de A $\beta$  sob as espinhas dendríticas hipocâmpais (CA1).

**Figura 25.** Efeito de iPROT (24h) na expressão das subunidades do receptor de NMDA em hipocampo de camundongos C57BL/6.

**Figura 26.** Efeito de iPROT (24h) na expressão de diferentes transportadores, GlyT1, GlyT2 e PROT em hipocampo de camundongos C57BL/6.

**Figura 27.** Efeito de iPROT (24h) na expressão de proteínas da via do BDNF em hipocampo de camundongos C57BL/6.

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1:** Pares de primers para PCR em tempo real.

## Resumo

Este trabalho investiga o papel da L-prolina e do transportador de prolina (PROT, Slc6a7) na modulação da neurotransmissão glutamatérgica e explora potenciais abordagens terapêuticas para doenças neurodegenerativas. Demonstramos que a L-prolina influencia o conteúdo de cálcio intracelular em sinaptossomas corticais e hipocampais de camundongos, observando aumento no conteúdo de cálcio intracelular em doses mais altas. Avaliamos também o impacto da L-prolina no comportamento motor e exploratório de camundongos, utilizando o teste do campo aberto. Verificamos que a L-prolina, em altas concentrações, reduz a mobilidade dos animais, mas não induz comportamentos ansiosos. Em contraste, concentrações mais baixas mostraram efeito estimulante, embora não significativo, sugerindo efeito dual dependente da concentração da L-prolina. Realizamos análises de expressão gênica e proteica para elucidar a distribuição e função do PROT no encéfalo. Descobrimos que o PROT é altamente expresso no córtex, estriado e hipocampo, indicando possível especialização regional em sua função. Além disso, investigamos a interação do PROT com inibidores potenciais, como o iPROT, LQFM215 e o LX6171, através de modelagem e *docking* molecular. Essas análises revelaram que ambos os inibidores se ligam eficazmente ao PROT, com implicações para a modulação da neurotransmissão glutamatérgica. Ao analisar os efeitos do inibidor do transportador de prolina (iPROT) em sinaptossomas, notamos que o iPROT mimetiza os efeitos da L-prolina, aumentando o conteúdo de cálcio intracelular. Investigamos também o impacto comportamental do iPROT, constatando reduções no comportamento motor e exploratório em camundongos, sem induzir comportamento do tipo ansioso. Por fim, avaliamos o potencial neuroprotetor do iPROT em um modelo animal de neurodegeneração induzido por injeção intrahipocampal de A $\beta$ . O pré-tratamento com iPROT demonstrou preservar a memória e prevenir a perda de espinhas dendríticas, indicando potencial terapêutico significativo. A análise da expressão de proteínas chave na neurotransmissão glutamatérgica e da via do Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo (BDNF) sugere um mecanismo de neuroproteção associado a essas vias. Este estudo fornece *insights* valiosos sobre a neurobiologia da L-prolina e do PROT, abrindo caminho para novas abordagens terapêuticas em neurodegeneração.

**Palavras-Chave:** L-prolina; SLC6a7; PROT, iPROT, Neurodegeneração

## **Abstract**

This study investigates the role of L-proline and the proline transporter (PROT, Slc6a7) in modulating glutamatergic neurotransmission and explores potential therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. We demonstrated that L-proline influences intracellular calcium content in cortical and hippocampal synaptosomes of mice, observing an increase in intracellular calcium content at higher doses. We also assessed the impact of L-proline on motor and exploratory behavior in mice using the open field test. High concentrations of L-proline were found to reduce animal mobility without inducing anxious behaviors. In contrast, lower concentrations showed a stimulatory, though not significant, effect, suggesting a dual concentration-dependent effect of L-proline. We performed gene and protein expression analyses to elucidate the distribution and function of PROT in the brain. Our findings revealed that PROT is highly expressed in the cortex, striatum, and hippocampus, indicating possible regional specialization of its function. Furthermore, we investigated the interaction of PROT with potential inhibitors, such as iPROT, LQFM215, and LX6171, through modeling and molecular docking. These analyses revealed that both inhibitors bind effectively to PROT, with implications for modulating glutamatergic neurotransmission. Analyzing the effects of the proline transporter inhibitor (iPROT) in synaptosomes, we observed that iPROT mimics the effects of L-proline, increasing intracellular calcium content. We also explored the behavioral impact of iPROT, noting reductions in motor and exploratory behavior in mice without inducing anxiety-like behavior. Finally, we evaluated the neuroprotective potential of iPROT in an animal model of neurodegeneration induced by intrahippocampal A $\beta$  injection. Pretreatment with iPROT demonstrated memory preservation and prevention of dendritic spine loss, indicating significant therapeutic potential. The analysis of key proteins involved in glutamatergic neurotransmission and the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) pathway suggests a neuroprotection mechanism associated with these pathways. This study provides valuable insights into the neurobiology of L-proline and PROT, paving the way for new therapeutic approaches in neurodegeneration.

**Keywords:** L-proline; Slc6a7; PROT, iPROT, Neurodegeneration

## 1. Divulgação científica e popularização da ciência

Neste estudo, identificamos que a L-prolina, além de sua função estrutural nas proteínas, atua como uma molécula moduladora dos níveis intracelulares de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) no córtex e no hipocampo cerebral de camundongos. Verificamos que concentrações baixas de L-prolina diminuem os níveis de cálcio, enquanto concentrações mais elevadas os aumentam, um efeito dose-dependente com implicações relevantes para a comunicação neuronal. Esse comportamento sugere um papel regulador da L-prolina em processos neurológicos fundamentais e levanta hipóteses de sua participação em doenças neurológicas e neurodegenerativas, como acidente vascular cerebral (AVC) e Doença de Alzheimer (DA) respectivamente.

Para explorar e tentar controlar esses mecanismos, utilizamos o composto iPROT, um protótipo que inibe um transportador neuronal de L-prolina (SLC6a7/PROT). Este inibidor demonstrou efeitos semelhantes aos da L-prolina, sugerindo seu potencial como ferramenta farmacológica para investigar vias relacionadas à L-prolina cerebrais. Verificamos o potencial neuroprotetor do iPROT em modelos de neurodegeneração. Testes em camundongos demonstraram que o pré-tratamento com iPROT melhorou significativamente a mobilidade e a memória em modelos que simulam doenças como a de Alzheimer. Além disso, o iPROT altera a expressão de proteínas associadas à neurotransmissão glutamatérgica e na via do fator neurotrófico derivado do encéfalo (*BDNF*), que são fundamentais para a neuroproteção e a memória. Esses resultados indicam que o iPROT pode ser um agente promissor no combate a doenças neurodegenerativas.

Essas descobertas marcam um avanço significativo na neurociência e na compreensão da neurodegeneração. A influência da L-prolina e do iPROT na regulação do glutamato e nos níveis de cálcio no cérebro abre novas possibilidades para o tratamento de doenças cerebrais. Este trabalho também apresenta o transportador de prolina como um possível alvo para novos fármacos neuroprotetores. Especificamente, o potencial terapêutico deste alvo oferece esperança para o desenvolvimento de novas estratégias para enfrentar condições como a doença de Alzheimer.

## 2. Introdução

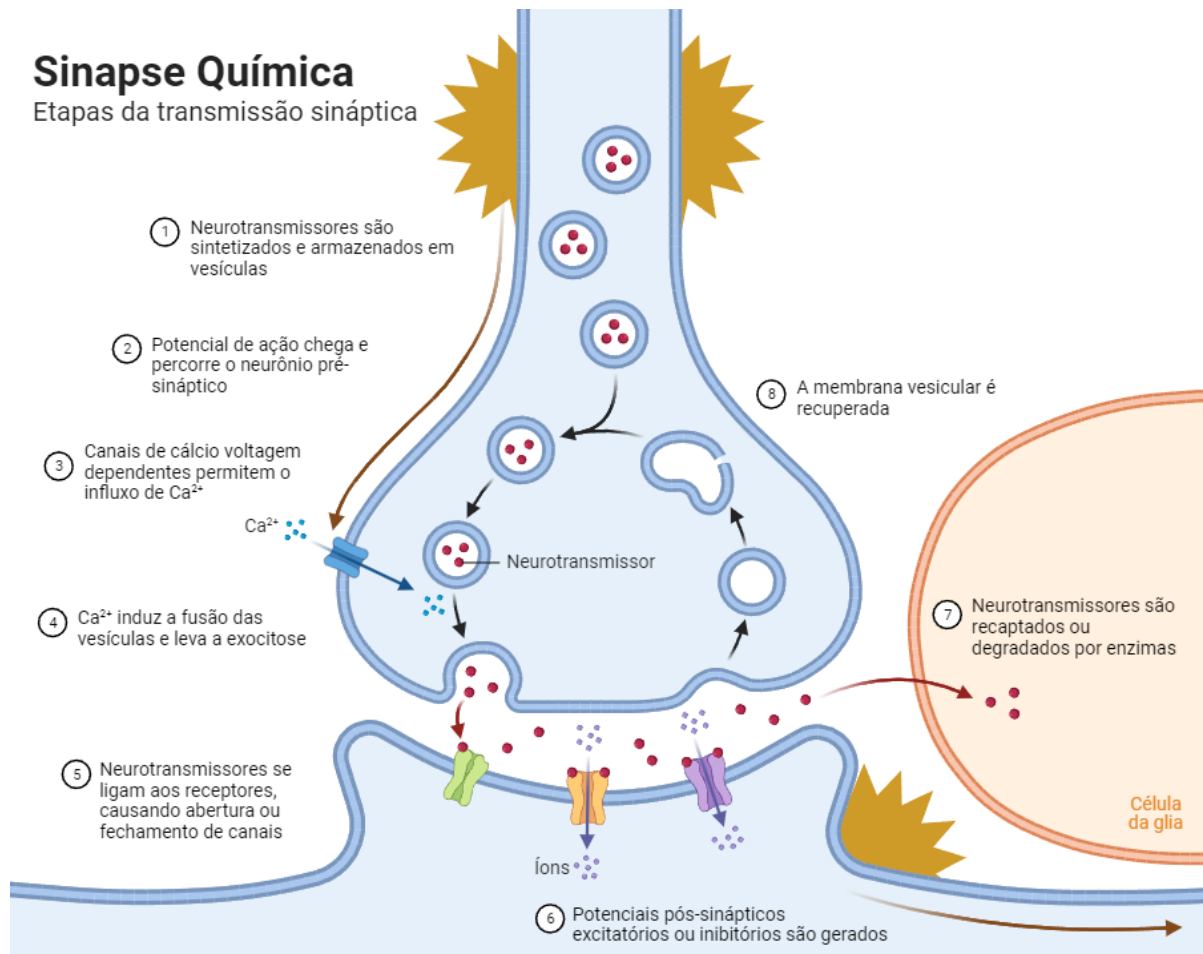
### 2.1. A transmissão sináptica

A comunicação celular no sistema nervoso central (SNC) é mediada por junções especializadas denominadas sinapses, que utilizam compostos chamados neurotransmissores como sinais químicos (1, 2). Os neurotransmissores são liberados pelo neurônio pré-sináptico na fenda sináptica e interagem com receptores no neurônio pós-sináptico. Esta interação desencadeia uma mudança conformacional nos receptores, resultando em transdução de sinal intracelular ou na abertura de canais iônicos, permitindo o transporte de íons (3). A transmissão sináptica ocorre quando os neurotransmissores ativam o neurônio pós-sináptico, gerando um potencial de ação pós-sináptico, que pode ser inibitório ou excitatório, dependendo do tipo de receptor (3). A natureza dessa resposta está relacionada ao potencial de membrana das células, sendo que o citoplasma é geralmente mais eletronegativo em comparação com o meio extracelular (3) (**Figura 1**).

A ativação de receptores pós-sinápticos permeáveis a cátions, como sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), geralmente resulta em um potencial excitatório pós-sináptico (PEP), devido ao influxo desses íons positivos que despolarizam a membrana. Por outro lado, a ativação de receptores permeáveis a ânions, como o cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), provoca um potencial inibitório pós-sináptico (PIP), associado ao influxo de íons negativos ou ao efluxo de cátions, o que contribui para a hiperpolarização ou estabilização da membrana em um potencial mais negativo (3). No SNC, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, enquanto o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal inibitório. O controle da concentração desses neurotransmissores na fenda sináptica depende da sua liberação (dependente do potencial de ação), podendo se difundir para longe da fenda sináptica, ser degradado via enzimas ou recaptados via proteínas transportadoras. Estas proteínas transportadoras geralmente operam por meio de cotransporte ou contratransporte de íons, utilizando a força do gradiente eletroquímico para capturar os neurotransmissores, frequentemente associadas ao cotransporte de sódio/cloreto ou ao contratransporte de potássio (3).

## Sinapse Química

Etapas da transmissão sináptica



**Figura 1. Representação de uma sinapse padrão.** O processo começa com a síntese e o armazenamento de neurotransmissores em vesículas no neurônio pré-sináptico (1). O potencial de ação percorre o neurônio pré-sináptico (2) e promove a abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem, permitindo o influxo de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (3). Esse influxo induz a fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica, levando à exocitose dos neurotransmissores na fenda sináptica (4). Os neurotransmissores se ligam aos receptores na membrana pós-sináptica, causando a abertura ou fechamento de canais iônicos (5), o que gera potenciais pós-sinápticos excitatórios ou inibitórios (6). Em seguida, os neurotransmissores são recaptados ou degradados por enzimas presentes na fenda e nos astrócitos (7), e a membrana vesicular é recuperada no neurônio pré-sináptico (8). Autoria própria (Biorender).

As sinapses em sua maioria compreendem esta via clássica de funcionamento, transmitindo informação do neurônio pré para o neurônio pós-sináptico, porém existe também uma comunicação retrógrada como no caso do sistema endocanabinoide. O sistema endocanabinoide desempenha um papel crucial na modulação da função sináptica por meio de um processo conhecido como sinalização retrógrada. A sinalização retrógrada envolve a liberação de endocanabinoides (eCBs) como a anandamida (AEA) dos neurônios pós-sinápticos em resposta ao aumento da atividade neuronal. Esses endocanabinoides então são transportados através da sinapse para se ligar aos receptores canabinoides localizados nos

terminais pré-sinápticos (CB1 e CB2) (4). Essa ligação leva à supressão da liberação de neurotransmissores, regulando efetivamente a transmissão sináptica. Podem mediar formas de plasticidade de curto e longo prazo em sinapses excitatórias e inibitórias. Ao modular a liberação de neurotransmissores, os endocanabinoides podem influenciar a força sináptica e a plasticidade, impactando a função geral dos circuitos neurais (4).

O sistema nitrínérgico de neurotransmissão é caracterizado pela sinalização mediada pelo óxido nítrico (NO), uma molécula gasosa sintetizada principalmente pela enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) nos neurônios. O NO atua como um mensageiro retrógrado em várias sinapses, difundindo-se livremente pela membrana celular para alcançar os terminais pré-sinápticos e outras células-alvo (5, 6). Ele regula a liberação de neurotransmissores e influencia processos como a plasticidade sináptica, incluindo a potenciação de longo prazo (LTP) e a depressão de longo prazo (LTD). Além disso, o NO ativa a guanilato ciclase solúvel, aumentando os níveis de GMP cíclico (cGMP), o que desencadeia uma cascata de sinalização intracelular crucial para a modulação de circuitos neurais (6, 7). Este sistema desempenha papéis importantes na neuroproteção, neurotoxicidade e regulação do fluxo sanguíneo cerebral, mostrando sua relevância tanto na fisiologia quanto na patologia do sistema nervoso.

A comunicação celular no SNC é um processo altamente complexo e dinâmico, fundamental para a integração e processamento de informações. A sinapse, como unidade funcional, desempenha um papel central na transmissão de sinais químicos por meio de neurotransmissores que ativam receptores pós-sinápticos, modulando respostas excitatórias ou inibitórias. Além disso, mecanismos alternativos, como a sinalização retrógrada do sistema endocanabinoide, destacam a flexibilidade e a sofisticação do controle sináptico, influenciando a plasticidade e a modulação dos circuitos neurais. Assim, a compreensão detalhada dessas interações contribui para elucidar não apenas os fundamentos do funcionamento neural, mas também potenciais alvos terapêuticos em enfermidades neurológicas e psiquiátricas.

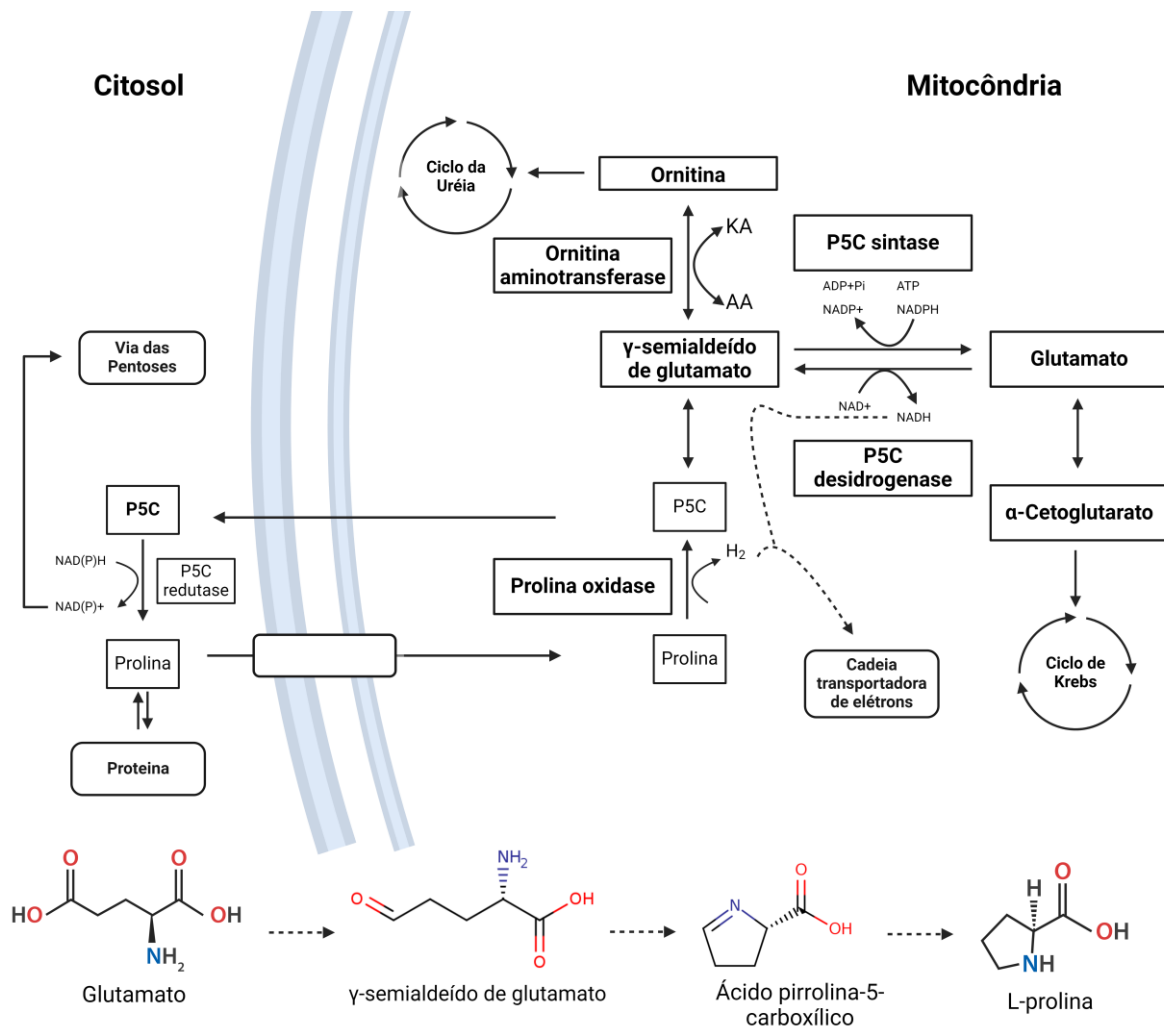
## **2.2. Metabolismo da L-prolina**

A L-prolina ( $C_5H_9NO_2$ ) é classificada como um aminoácido não essencial, distinto por possuir uma pirrolidina em sua estrutura, em vez de uma amina primária. Esta característica única confere à L-prolina uma cadeia lateral que se conecta a subunidade C terminal da cadeia lateral com a subunidade alfa-amino. Como um aminoácido derivado cíclico do glutamato, a

L-prolina desempenha um papel importante na constituição do colágeno, essencial para as articulações e a matriz extracelular. Além disso, sua presença é notável no SNC, onde desempenha funções estruturais e de sinalização celular (8).

A síntese da L-prolina ocorre tanto no interior quanto no exterior das mitocôndrias. Dentro da mitocôndria, o  $\alpha$ -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs, é transformado em glutamato. Este, por sua vez, é convertido em  $\gamma$ -semialdeído glutâmico pela ação da enzima 1-pirrolina-5-carboxilato sintase (P5C sintase). O  $\gamma$ -semialdeído glutâmico sofre uma ciclização espontânea formando o 1-pirrolina-5-carboxilato (P5C), que é posteriormente transportado para o citosol. No citosol, o P5C é convertido em L-prolina pela ação da enzima P5C redutase (**Figura 2**) (9).

Quanto à degradação da L-prolina, ela começa com a captação do aminoácido pelas mitocôndrias, onde é oxidado a P5C pela enzima P5C oxidase. O P5C é então convertido de volta a  $\gamma$ -semialdeído glutâmico, que é submetido a uma reação de desidrogenação pela enzima P5C desidrogenase, resultando novamente em glutamato. Este glutamato pode ser convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato, reintegrando-se ao ciclo de Krebs como um intermediário metabólico. Além disso, existe uma via alternativa de síntese da prolina no ciclo da ureia. Nessa via, a ornitina, presente no interior da mitocôndria, é convertida em  $\gamma$ -semialdeído glutâmico pela ação da enzima ornitina aminotransferase, retomando a via metabólica clássica para a formação de L-prolina (**Figura 2**) (9).



**Figura 2. Síntese e degradação da L-prolina.** As etapas de síntese e degradação da prolina possuem etapas que ocorrem dentro e fora da mitocôndria. P5C – ácido 1-pirrolina-5-carboxílico; CoQ – coenzima Q; CytC – citocromo C; KA –  $\alpha$ -cetoácido; AA – aminoácido (Próprio autor).

Distúrbios inatos relacionados ao metabolismo da L-prolina incluem formas de hiperprolinemia, uma doença autossômica recessiva caracterizada por deficiências na degradação da L-prolina em humanos. A hiperprolinemia pode ser dividida em dois tipos principais. O Tipo I é causado por uma disfunção na enzima prolina desidrogenase (PRODH), localizada predominantemente no fígado. Já o Tipo II resulta de uma deficiência na enzima ácido 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5C desidrogenase) (10). Ambas as formas da doença estão associadas a uma variedade de sintomas cognitivos e neurológicos, incluindo hiperatividade, amnésia, epilepsia e surdez. Além disso, há evidências que relacionam a hiperprolinemia com a esquizofrenia, indicando um papel para a L-prolina durante o neurodesenvolvimento (11).

Estudos em modelos animais (roedores) também têm demonstrado que alterações no metabolismo da L-prolina podem afetar a função cognitiva. Observações incluem déficits na memória de curto prazo, evidenciados em testes comportamentais como o labirinto em T. Igualmente, em tarefas de aprendizagem aversiva e no teste do labirinto aquático de Morris, foram identificados prejuízos na memória, sugerindo um impacto abrangente do metabolismo da L-prolina em várias funções cognitivas (12-14).

### **2.3. A via da L-prolina no encéfalo**

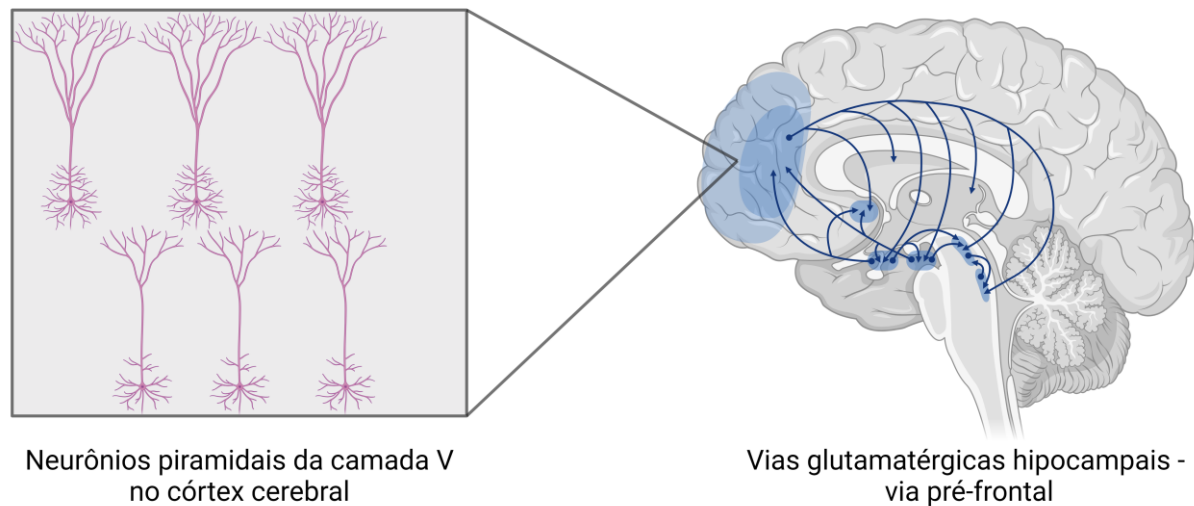
Os neurotransmissores são compostos endógenos essenciais para a comunicação neuronal. O SNC abriga uma diversidade de neurotransmissores, entre eles o L-glutamato e a L-glicina, amplamente reconhecidos na literatura científica (15, 16). Adicionalmente, há evidências históricas de que outros aminoácidos e seus metabólitos também modulam a transmissão sináptica no SNC (17-20).

A função específica de aminoácidos não-essenciais como a L-prolina no SNC ainda é pouco compreendida. Contudo, a L-prolina apresenta várias características que poderiam classificá-la como um neurotransmissor. Sua distribuição heterogênea no cérebro foi observada por Takemoto e colaboradores (2006), em regiões como córtex, hipocampo, amígdala e hipotálamo de ratos. Além disso, estudos com <sup>3</sup>H-prolina (prolina marcada com radioativo) mostram uma distribuição em diferentes regiões no cérebro quando injetada no córtex (21, 22). Em um estudo de 1988, foi sugerido que altas doses de L-prolina injetadas no hipocampo de camundongos poderiam causar lesões semelhantes às provocadas pela injeção de doses tóxicas de L-glutamato na mesma região, sugerindo que a L-prolina poderia induzir atividade neurodegenerativa ao despolarizar células (23).

Os níveis de L-prolina foram analisados no córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e cerebelo de camundongos C57BL/6, no trabalho de Pinto e colaboradores (2014) revelando concentrações mais elevadas desse aminoácido no hipocampo e no cerebelo em comparação ao soro (24). Além disso, foram observadas diferenças entre gênero: fêmeas apresentaram níveis mais altos de prolina no hipocampo, enquanto machos exibiram concentrações superiores no cerebelo. Uma análise fatorial exploratória agrupou a prolina com aminoácidos excitatórios, como glutamato e aspartato, indicando seu papel na neurotransmissão excitatória e sua influência moduladora específica em diferentes regiões encefálicas. Esses achados reforçam a relevância da prolina em áreas críticas para memória, aprendizado e coordenação motora. Complementando esses dados, estudos autorradiográficos de Nadler e colegas (1992)

demonstraram que a captação de prolina é mais intensa em regiões hipocâmpais com alta densidade de neurônios glutamatérgicos, como as zonas interna e externa da camada molecular do giro denteado e o estrato *lacunosum-moleculare* da região CA3 (25). Essa distribuição evidencia que a L-prolina está intimamente associada a subgrupos específicos de vias glutamatérgicas hipocâmpais, especialmente aquelas ligadas ao circuito pré-frontal, reforçando seu papel como um modulador crucial no equilíbrio da neurotransmissão excitatória (**Figura 3**).

### Distribuição Neuroanatômica da L-prolina



Neurônios piramidais da camada V no córtex cerebral

Vias glutamatérgicas hipocâmpais - via pré-frontal

**Figura 3. Distribuição neuroanatômica da L-Prolina no encéfalo.** À esquerda, representação dos neurônios piramidais da camada V no córtex cerebral, conhecidos por seu papel na sinalização excitatória. À direita, o diagrama destaca as vias glutamatérgicas que se originam no hipocampo e projetam em direção ao córtex pré-frontal, sugerindo o papel da L-Prolina na modulação das conexões entre essas regiões, especialmente em vias associadas à transmissão glutamatérgica (Autoria própria - Biorender).

Um estudo realizado por Snyder e colaboradores (1973) também fornece ideias importantes. Eles descobriram que a estimulação de fatias de córtex e medula espinal *ex vivo* com  $K^+$  resulta na liberação de prolina marcada com radioativo (detecção), um processo dependente de  $Ca^{2+}$ . Essa dependência do  $Ca^{2+}$  sugere um papel potencial da L-prolina como neurotransmissor (19). Em sinaptossomas de córtex, também foi observada a liberação de L-prolina dependente de  $Ca^{2+}$  (26).

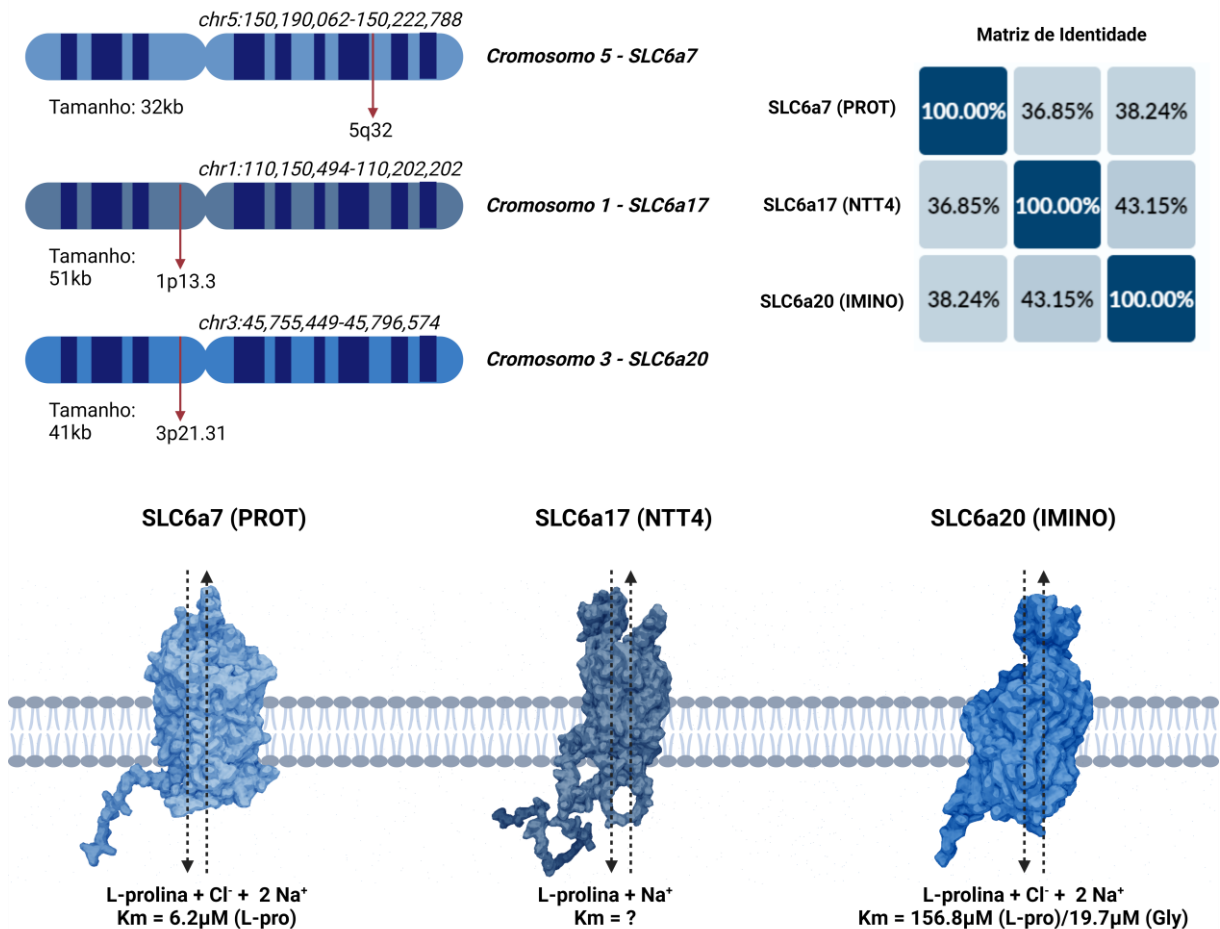
Embora a L-prolina não esteja associada a um receptor específico no SNC, estudos sugerem que ela exerce uma função neuromoduladora (27). Pesquisas indicam que, em altas concentrações, a L-prolina é capaz de ativar receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico (AMPA) e cainato (CA), com evidências de ativação de receptores NMDA sob condições fisiológicas em roedores (28-30).

A neurotransmissão inclui mecanismos para encerrar a sinalização, como a rápida recaptação dos neurotransmissores por transportadores dependentes de  $\text{Na}^+$ . Estudos identificaram um transportador de alta afinidade dependente de  $\text{Na}^+$  para a L-prolina (PROT) no SNC (17, 31, 32). Pesquisas recentes têm explorado o papel deste transportador em camundongos *knockout* para PROT, focando em seu comportamento (33) e no desenvolvimento de inibidores direcionados a distúrbios cognitivos, neurológicos e psiquiátricos (34-37).

Em resumo, a distribuição da L-prolina e de proteínas relacionadas à prolina destaca sua importância em diferentes regiões do cérebro. No entanto, há uma carência de estudos na literatura científica que abordem a sua distribuição neuroanatômica.

## **2.4. O transportador de prolina (PROT/SLC6A7)**

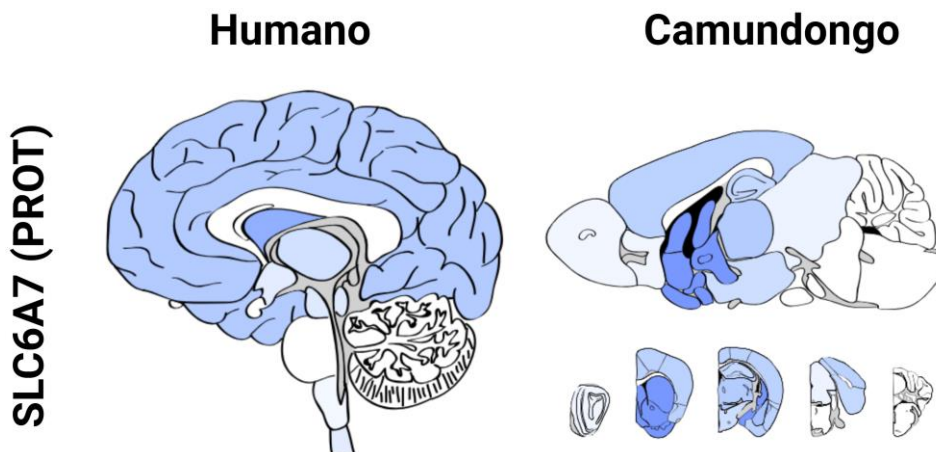
O *PROT/SLC6a7* é um transportador da grande família dos carreadores de soluto *Slc6*, está no mesmo grupo evolutivo do transportador de glicina do tipo 1 (*GlyT1/SLC6a9*) e do tipo 2 (*GlyT2/SLC6a5*) e do transportador de aminoácidos neutros e básicos (*ATB<sup>0+</sup>/SLC6a14*). Outros transportadores como o transportador de aminoácidos neutros (*NTT4/SLC6a17*) e o IMINO (*SLC6a20*), também transportam a L-prolina, porém o PROT é específico do SNC (**Figura 4**) (38).



**Figura 4. Localização genômica, características estruturais e afinidade funcional dos transportadores de L-prolina na família SLC6 SLC6a7 (PROT), SLC6a17 (NTT4) e SLC6a20 (IMINO).** Os genes estão localizados nos cromossomos 5 (SLC6a7), 1 (SLC6a17) e 3 (SLC6a20), com tamanhos de 32 kb, 51 kb e 41 kb, respectivamente. A matriz de identidade de sequência revela similaridades de 36,85% entre SLC6a7 e SLC6a17, 38,24% entre SLC6a7 e SLC6a20 e 43,15% entre SLC6a17 e SLC6a20. As estruturas tridimensionais dos transportadores, mostradas na membrana plasmática, ilustram características funcionais distintas: SLC6a7 transporta L-prolina com uma afinidade de  $K_m = 6,2 \mu\text{M}$  na presença de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ , enquanto SLC6a20 tem uma afinidade de  $K_m = 156,8 \mu\text{M}$  para L-prolina e  $K_m = 19,7 \mu\text{M}$  para glicina. A afinidade de SLC6a17 para L-prolina permanece indeterminada (Informações obtidas através dos bancos de dados Uniprot e GeneCards).

A expressão de PROT ainda não é totalmente elucidada, porém trabalhos apontam para regiões como o hipocampo, córtex, estriado, hipotálamo, amígdala, tálamo e núcleo subtalâmico (27, 39). Nessas regiões o PROT está presente em sua maioria nos terminais sinápticos, mas também em pequenas vesículas sinápticas e majoritariamente em vias glutamatérgicas (17, 25, 32, 39). De acordo com o *Human Protein Atlas*, o PROT é enriquecido em neurônios, e possui especificidade aumentada em tecido cerebral (40, 41). A

especificidade no encéfalo humano e de camundongos é baixa. Sua distribuição é ampla, sendo detectada em todas as regiões cerebrais de ambas as espécies. (Figura 5).



**Figura 5. Distribuição neuroanatômica do gene SLC6A7 em cérebros humanos e de camundongos.** Distribuição da proteína da família de transportadores de solutos, SLC6A7, no encéfalo de humanos (esquerda) e camundongos (direita). As figuras representam o padrão de expressão da proteína, com áreas coloridas indicando as regiões onde este gene foi detectado. O SLC6A7 é predominantemente expresso em regiões associadas a funções sinápticas e neuronais. A intensidade da coloração reflete a presença do gene, com tons mais escuros indicando níveis mais altos de expressão. Autoria própria (Biorender) Fonte: *Human Protein Atlas*.

Quanto à função de PROT, estudos apontam para uma regulação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e de proteínas quinase dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como no trabalho de Jayanthi e colaboradores (2000), onde foi reportado que o  $\text{Ca}^{2+}$  atua como um ativador agudo de *PROT*, sugerindo que não esteja apenas responsável pela liberação de neurotransmissores, mas também de sua rápida remoção da fenda sináptica (42). Por outro lado, observou-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  atua indiretamente e mais lentamente inibindo a atividade de PROT através de proteínas quinase dependentes de cálcio, talvez durante uma modulação de longo prazo da transmissão sináptica (42).

Estudos com camundongos *knockout* para PROT tem trazido novas evidências quanto a sua função. Shulz e colaboradores (2018) demonstraram que camundongos PROT-KO exibem redução da atividade locomotora, redução da motivação e prejuízo na extinção da memória, assim como alterações na bioquímica de sinapses glutamatérgicas principalmente no córtex e tálamo (33). Em consonância, outros trabalhos apontam que mutações em *PROT* e alterações na expressão de *Slc6a7* estão relacionadas com fenótipos de autismo, assim como

esquizofrenia (43-45), e microdeleções na região de expressão de *Slc6a7* estão associadas à prejuízos intelectuais em humanos (46).

Outra estratégia para o estudo da função de PROT é utilizá-lo como alvo farmacológico. O desenvolvimento de novos inibidores para esse transportador tem se mostrado promissor. Yu e colaboradores (2009) desenvolveram um novo composto capaz de inibir PROT sendo testada em células *HEK293* e *COS-1*. O interessante é que a inibição se mostrou específica para PROT e não possuía inibição significativa de GlyT1 ou transportador de dopamina (DAT) acima de 10  $\mu$ M (36). Outro inibidor, o composto 57, desenvolvido por Zipp e colaboradores (2014), inibiu PROT com uma IC<sub>50</sub> de 27 nM (37).

Recentemente nosso grupo demonstrou em dois trabalhos distintos que o composto LQFM215 foi capaz de inibir PROT protegendo o SNC em um modelo de isquemia cerebral focal, sem causar prejuízos na memória de camundongos (34). Em um modelo agudo de psicose, foi capaz de preservar a interação social de camundongos tratados com cetamina e melhorar parâmetros do teste de inibição de pré-pulso (IPP), teste padrão ouro para os modelos de esquizofrenia (35).

Em resumo, os dados apoiam para um papel da L-prolina como neuromodulador no SNC. Além disso, o padrão de expressão em células neuronais glutamatérgicas sugere que o PROT não representa um transportador ubíquo que tenha uma função geral, mas apoia um papel específico para a L-prolina e o seu transportador na neurotransmissão, particularmente em sinapses glutamatérgicas.

## **2.5. A neurotransmissão glutamatérgica**

Atualmente, os receptores de glutamato podem ser agrupados em dois grandes grupos, os receptores de glutamato metabotrópicos (*mGluRs*) que estão acoplados a proteínas G e os receptores de glutamato ionotrópicos (*iGluRs*) que são canais iônicos. Os *iGluRs* são subdivididos em AMPA (GluA1-4), NMDA (GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B) e cainato (GluK1-5), além das subunidades GluD1 e GluD2 ou também denominados receptores  $\delta$ . Os receptores AMPA são tetrâmeros, os NDMA são complexos heterométricos e os receptores de cainato são dímeros (47). Como mencionado anteriormente, algumas evidências corroboram com a hipótese de que a L-prolina é capaz de modular sinapses excitatórias, ativando diretamente os receptores ionotrópicos NMDA, AMPA e cainato em altas concentrações (29, 30, 48), assim como também altera a expressão desses receptores em animais *knockout* para PROT (33).

A transmissão sináptica facilitada pelos *iGluRs* ocorre de maneira veloz, dado que implica a movimentação de íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente. Esse processo tem um impacto direto nas propriedades eletroquímicas da membrana pós-sináptica. Por outro lado, os *mGluRs*, estão ligados a proteínas G, desencadeando respostas intracelulares por meio da ativação de segundos mensageiros. Como resultado desse mecanismo, observam-se respostas pós-sinápticas mais lentas em comparação com os receptores ionotrópicos (47).

O NMDAR sináptico, principal receptor glutamatérgico do SNC, desempenha um papel importante na potencialização a longo prazo (*LTP*). Esse processo, que requer a ativação da subunidade *GluN2A* (associada a vias de sobrevivência celular), aumenta a potência e a eficácia das sinapses após estímulos frequentes e intensos, facilitando a transmissão de sinais entre os neurônios. Esse fenômeno está estreitamente relacionado ao processo de aprendizado e à formação de memórias, enquanto a depressão a longo prazo (*LTD*) requer a ativação da subunidade *GluN2B* (associada a vias de morte celular), na qual as sinapses perdem eficácia após uma atividade neuronal de baixa frequência. Essa redução na eficiência sináptica também desempenha uma função vital no processo de aprendizagem e memória, pois possibilita a eliminação de associações antigas ou irrelevantes. Isso contribui para a flexibilidade e adaptação do cérebro a novos contextos e informações. Portanto o controle da ativação de NMDAR é determinante para manutenção da função neuronal e adaptabilidade cerebral (49, 50).

## **2.6. Demência, Neurodegeneração e Doença de Alzheimer**

A demência é definida como a perda adquirida e crônica de duas ou mais habilidades cognitivas, frequentemente causada por doenças neurodegenerativas ou lesões cerebrais. Essas habilidades incluem funções importantes como memória, atenção, linguagem, raciocínio lógico, planejamento e controle executivo. O impacto translacional dessa perda vai além do comprometimento funcional individual, afetando diretamente a capacidade do paciente de realizar atividades cotidianas, interagir socialmente e manter sua autonomia. Essa definição, amplamente utilizada na prática clínica por décadas, reflete não apenas a relevância das funções cognitivas na qualidade de vida, mas também orienta abordagens diagnósticas e terapêuticas para o manejo de condições neuropsiquiátricas e neurodegenerativas. O tipo de demência mais frequente no mundo é a Doença de Alzheimer (DA) (51). A apresentação clínica mais comum da Doença de Alzheimer é de início lento e perda de memória progressiva gradual, tipicamente com incapacidade de aprender novas informações e,

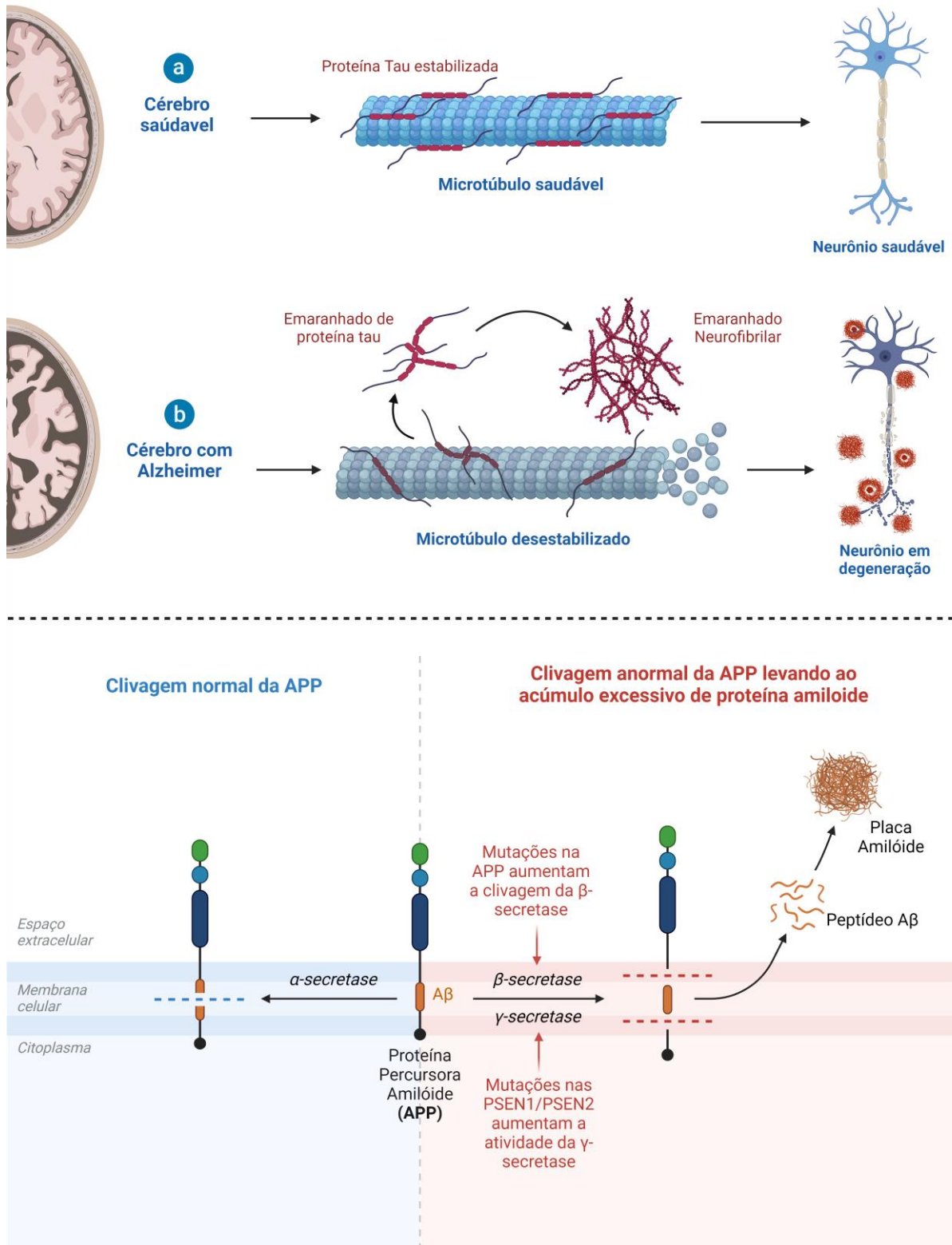
particularmente, informações autobiográficas, como eventos recentes na vida da pessoa, caracterizando essa doença como uma doença neurodegenerativa (51).

A neurodegeneração, ou mais especificamente os distúrbios neurodegenerativos, são condições complexas que afetam primariamente os neurônios do SNC, resultando na perda progressiva de tecido neural devido à morte neuronal. Intensos estudos têm sido realizados para entender doenças neurodegenerativas fatais, com a DA, sendo essa a mais comum (52). Essas doenças surgem de múltiplos fatores, incluindo dinâmicas anormais de proteínas, defeitos na degradação e agregação proteica, estresse oxidativo e disfunção no metabolismo energético mitocondrial (53).

A Doença de Alzheimer (DA), que representa aproximadamente 60-80% dos casos de demência, afeta cerca de 10% das pessoas acima de 65 anos, com projeções indicando que até 107 milhões de indivíduos poderão ser impactados até 2050 (54, 55). Histologicamente, a DA é caracterizada pelo acúmulo de placas senis formadas por depósitos extracelulares de  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), que resultam do processamento anormal da proteína precursora amiloide (APP). Essas placas contribuem para a disfunção sináptica, neurotoxicidade e inflamação no tecido cerebral. No ambiente intracelular, a doença é marcada pela presença de emaranhados neurofibrilares compostos de proteína TAU hiperfosforilada, que desestabilizam os microtúbulos, comprometendo o transporte axonal e promovendo a degeneração neuronal. Essas alterações moleculares estão associadas a processos inflamatórios, gliose reativa e ativação da microglia, além de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, que contribuem para a perda progressiva de sinapses e morte neuronal. Tais mudanças estruturais e funcionais culminam na atrofia cerebral, especialmente em regiões como o hipocampo e o córtex cerebral, resultando nos déficits cognitivos e comportamentais característicos da doença (**Figura 6**). A doença progride de deficiências iniciais de memória para danos corticais generalizados que impactam significativamente a vida diária (56-58).

No cérebro saudável, a proteína TAU estabiliza os microtúbulos, essenciais para o transporte axonal, garantindo a integridade estrutural e funcional dos neurônios. Na DA, a hiperfosforilação da TAU provoca a formação de emaranhados neurofibrilares, que desestabilizam os microtúbulos, levando à disfunção axonal e, eventualmente, à degeneração neuronal (59, 60). Paralelamente, a clivagem anormal da proteína precursora amiloide (APP) pela  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase resulta no acúmulo de peptídeos  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) no espaço extracelular, formando placas amiloides. Esse processo pode ser exacerbado por mutações na APP ou nos genes que codificam as presenilinas (PSEN1/PSEN2), que aumentam a atividade da  $\gamma$ -secretase, contribuindo para a deposição excessiva de  $A\beta$  (59, 60). Essas alterações

histopatológicas, combinadas, desencadeiam inflamação, gliose reativa e disfunção sináptica, culminando na progressiva neurodegeneração observada na DA (**Figura 6**).



**Figura 6. Alterações patológicas na doença de Alzheimer.** Na parte superior (a), observa-se um cérebro saudável, com a proteína tau estabilizando os microtúbulos e mantendo a integridade estrutural dos neurônios. Na parte inferior (b), um cérebro com Alzheimer exibe emaranhados neurofibrilares de

proteína tau e microtúbulos desestabilizados, resultando em degeneração neuronal. Abaixo, uma comparação entre a clivagem normal e anormal da proteína precursora amiloide (APP) demonstra como mutações nas enzimas  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase aumentam a formação do peptídeo A $\beta$ , levando ao acúmulo de placas amiloides, uma característica marcante da patologia da doença. Autoria própria (Biorender).

Um fenômeno comum em doenças neurodegenerativas é a excitotoxicidade, relacionada à hiperatividade sináptica do glutamato. Este fenômeno leva a um influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células, causando danos ao DNA, disfunção mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A excitotoxicidade também promove a degeneração dendrítica e ativação de vias apoptóticas, culminando na morte neuronal (61). A modulação da neurotransmissão glutamatérgica, portanto, é um alvo promissor na busca por novas terapias para a DA, visto que os tratamentos atuais não impedem a progressão da doença.

O diagnóstico da DA envolve uma avaliação abrangente que inclui um histórico médico detalhado para avaliar mudanças cognitivas, dificuldades funcionais e sintomas comportamentais, assim como testes neuropsicológicos para avaliar domínios cognitivos, como memória e função executiva (51). Técnicas de neuroimagem, como ressonância magnética (RM) ou tomografia computadorizada (TC), ajudam a identificar mudanças estruturais no cérebro indicativas de DA. Biomarcadores também podem ser considerados em casos atípicos ou quando a certeza diagnóstica é baixa (51).

O tratamento principal para a doença de Alzheimer (DA) inclui abordagens não farmacológicas e farmacológicas. As intervenções não farmacológicas concentram-se no engajamento cognitivo por meio de atividades como leitura, exercícios físicos como caminhada e socialização para promover o bem-estar geral (51). As opções farmacológicas para o manejo da DA são um desafio já que não interrompem o progresso da doença e envolvem inibidores da acetilcolinesterase, como donepezil, para demência discreta a grave, e memantina para casos moderados a graves, com a rivastigmina aprovada para a demência associada à doença de Parkinson (51). Novas perspectivas no tratamento da DA envolvem pesquisas contínuas em terapias modificadoras da doença, que visam as patologias de amiloide e tau, bem como a exploração de intervenções potenciais para abordar a neuroinflamação, disfunção sináptica e fatores vasculares que contribuem para o declínio cognitivo.

Os modelos murinos são amplamente utilizados para estudar a DA, especialmente devido à sua capacidade de replicar aspectos fundamentais da patologia humana. Entre os

mais populares estão os modelos transgênicos, como o *APP/PS1*, que combinam mutações na proteína precursora do amiloide (*APP*) e na presenilina-1 (*PS1*). Esses camundongos apresentam o acúmulo progressivo de placas de  $\beta$ -amiloide no cérebro, disfunção sináptica e déficits de memória, mimetizando características iniciais da DA (62). Outro modelo amplamente utilizado é o *3xTg-AD*, que incorpora mutações em *APP*, *PS1* e tau, permitindo o estudo simultâneo das placas amiloides e dos emaranhados neurofibrilares. Esses modelos são particularmente úteis para investigar os mecanismos patogênicos e testar potenciais terapias direcionadas ao  $\beta$ -amiloide e à tau (62).

Além dos modelos transgênicos, camundongos submetidos à injeção intracerebral de oligômeros de  $\beta$ -amiloide ou estreptozotocina têm sido amplamente usados como alternativas para simular aspectos específicos da DA (62, 63). A injeção de  $\beta$ -amiloide permite estudar os efeitos tóxicos agudos da proteína em agregação, como déficits cognitivos e disfunção sináptica. Já a injeção de estreptozotocina no sistema nervoso central induz alterações metabólicas associadas à resistência à insulina cerebral, um dos mecanismos implicados na DA esporádica (63). Esses modelos não genéticos são valiosos para investigar aspectos diferentes da doença e testar abordagens terapêuticas mais amplas, complementando os modelos transgênicos.

Recentemente, há um interesse crescente no desenvolvimento de estratégias para modulação da neurotransmissão glutamatérgica. Isso inclui a inibição de transportadores de glicina do tipo 1 (GlyT1), visando elucidar mecanismos de neuroproteção e adaptação cerebral em modelos de isquemia cerebral, como demonstrado por Pinto e colaboradores (2015) (64-66). Além disso, novos compostos como a Bitopertina e a Iclepertina (inibidores dos transportadores de glicina do tipo 1 – GlyT1) estão sendo explorados em modelos de doenças psiquiátricas (67-69).

### **3. Justificativa**

A comunicação celular no SNC é essencial para as funções cognitivas e motoras e é mediada por sinapses complexas, onde aminoácidos como a L-prolina desempenham um papel relevante. Esta dinâmica metabólica, aliada à sua presença significativa no SNC, sugere um papel importante da L-prolina na saúde cerebral e na modulação sináptica, principalmente em vias excitatórias.

Além de seu papel estrutural, a L-prolina pode atuar como modulador na transmissão sináptica. Evidências indicam que ela pode influenciar sinapses excitatórias, possivelmente interagindo com receptores de glutamato. O transportador de L-prolina (PROT/Slc6a7), um componente especializado da família dos carreadores de soluto Slc6, está associado a regulação dos níveis de L-prolina no cérebro. Sua expressão diversificada em regiões cerebrais e presença em terminais sinápticos glutamatérgicos ressaltam a importância de PROT na regulação dessa neurotransmissão.

Fundamental na função cerebral, o sistema glutamatérgico representa uma transmissão sináptica rápida e eficiente através de receptores canino, AMPA e NMDA. A L-prolina, em altas concentrações, pode influenciar a excitabilidade sináptica e a plasticidade neuronal por meio da interação com esses receptores. Este mecanismo potencialmente abre caminho para uma compreensão mais profunda das dinâmicas sinápticas e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especialmente em relação a distúrbios neurodegenerativos.

Dentre os distúrbios neurodegenerativos, a doença de Alzheimer se destaca pelo seu impacto devastador. Caracterizada por um declínio progressivo das funções neuronais, está frequentemente associada a alterações no metabolismo proteico e estresse oxidativo. Neste contexto, a modulação da L-prolina e a inibição de seu transportador surgem como alvos promissores de pesquisa. Entender como esses mecanismos afetam a neurodegeneração pode revelar novas abordagens terapêuticas, potencialmente alterando o curso de doenças como a de Alzheimer e outras condições neurodegenerativas.

## **4. Objetivo**

### **4.1. Objetivo geral**

Investigar o papel da L-prolina no SNC e o potencial efeito neuroprotetor da inibição farmacológica do transportador de L-prolina (PROT/SLC6A7) em um modelo experimental de Doença de Alzheimer.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Investigar o efeito da L-prolina no conteúdo de  $Ca^{2+}$  intracelular em sinaptossomas;

- Estudar o impacto da L-prolina no comportamento motor e exploratório em camundongos;
- Avaliar a distribuição do transportador de prolina PROT (Slc6a7) no cérebro;
- Avaliar o potencial do PROT como alvo farmacológico *in silico*;
- Examinar o efeito do inibidor do transportador de prolina (iPROT) no conteúdo de Ca<sup>2+</sup> intracelular em sinaptossomas;
- Avaliar o efeito comportamental do iPROT no comportamento motor e exploratório em camundongos;
- Investigar o potencial neuroprotetor do iPROT em modelo animal da DA;
- Estudar o efeito do iPROT na expressão de proteínas da neurotransmissão glutamatérgica e da via do BDNF;

## 5. Metodologia

### 5.1. Análises *in silico*

#### 5.1.1. Modelagem molecular, otimização e busca por sítio de ligação do PROT

Primeiramente consultamos a sequência FASTA do *PROT* através da busca do gene *Slc6a7* no banco de dados Uniprot (Q99884) (70). Submetemos a sequência FASTA no servidor de modelagem molecular *SwissModel*, e realizamos em um primeiro passo a busca por *templates*, onde utilizamos o critério de seleção por GMQE (*Global Model Quality Estimate*), porcentagem de identidade ( $\geq 25\%$ ) e método de resolução da estrutura (71). Após a busca pelos moldes, construímos o modelo e baixamos a estrutura 3D da proteína no formato .pdb.

A busca pelo sítio de ligação foi realizada no servidor *PrankWeb*, onde submetemos a estrutura otimizada e localizamos os bolsos de interação, bem como as coordenadas X, Y, Z e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação, essa plataforma realiza um ranqueamento dos sítios mais prováveis (72-74).

#### 5.1.2. Molecular Docking

A docagem molecular (*molecular docking*) foi realizada utilizando o software GOLD. A estrutura do PROT após a otimização foi preparada quanto ao estado de protonação (pH: 7.4), campo de força OPLS4, e remoção de moléculas de água, utilizando o software Maestro (75). O ligante iPROT e o LQFM215 foram desenhados com o auxílio da ferramenta Marvin e o ligante LX6171 foi baixado do banco de dados *PubChem* (CID: 15950717), ambos salvos no formato .sdf e preparados quanto ao estado de protonação, campo de força OPLS4 utilizando o plugin Epik do software Maestro (76). As estruturas da proteína e dos ligantes foram submetidos servidor DockThor, as dimensões da caixa de *docking* foram definidas em 20x20x20 e as coordenadas X, Y, Z foram definidas com base nas informações do *PrankWeb* (4,089; 4,802; -3,006; respectivamente), utilizando um tipo de *docking* flexível. Os resultados foram avaliados com base nos scores de energia de ligação fornecidas pelo servidor (54, 77, 78).

## **5.2. Análises bioquímicas e de biologia molecular**

### **5.2.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real**

A análise da expressão gênica do PROT foi realizada por PCR em tempo real com os seguintes genes selecionados para camundongos (**Tabela 1**). O RNA total foi preparado a partir dos tecidos córtex, cerebelo, hipotálamo, hipocampo, corpo estriado e tecido adiposo. Esses tecidos foram triturados em um recipiente com auxílio de um pistilo e utilizando nitrogênio líquido. O RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol (*Invitrogen Life Technologies*®) de acordo com os protocolos dos fabricantes. A qualidade e a quantidade do RNA foram avaliadas pela relação densidade óptica (DO) 260/280nm com espectrofotômetro Nanovue Plus (*GE Healthcare Life Sciences*®). A síntese de cDNA foi realizada com 2 µg de RNA total para First Strand cDNA Synthesis Kit (*Fisher Scientific*®) de acordo com as instruções do fabricante.

O cDNA foi submetido a qPCR em um sistema StepOnePlus Real-Time PCR (*Applied Biosystems*®) usando Maxima SYBR PCR 1× (*Fisher Scientific*®) e 600nM de cada primer com 1:100 de cDNA e água. As PCRs foram cicladas 50 vezes após a desnaturação inicial (95°C, 5 min) com anelamento e extensão a 60°C por 1min. A fluorescência foi detectada no final da extensão. Os contaminantes de produtos de PCR inespecíficos foram excluídos para aplicação de análise na curva de dissociação em todos os produtos ao final do ciclo. A

quantificação relativa da expressão gênica foi feita com o método 2- $\Delta\Delta$ CT, utilizando a expressão do gene  $\beta$ -actina (*Actb*) para normalizar os dados e o grupo de referência corresponde ao tecido adiposo (AT).

**Tabela 1: Pares de primers para PCR em tempo real.**

| Gene          | Sequência                                    | NCBI Refseq* |
|---------------|--|--------------|
| <i>Slc6a7</i> | <i>Forward</i> ACC TGG ATG TAG ACT TCG CAG   | NM_201353.1  |
|               | <i>Reverse</i> CGC CAG ACA TTT CCC AAG C     |              |
| <i>Actb</i>   | <i>Forward</i> GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG    | NM_007393.5  |
|               | <i>Reverse</i> CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T |              |

\*Refseq – referência da sequência

### 5.2.2. Western-blot

Depois da eutanasia, os animais tiveram as regiões de interesse dissecadas (córtex, cerebelo, hipotálamo, hipocampo, corpo estriado), e posteriormente processados em solução tampão de lise para análise de proteínas, separadamente em experimentos independentes. Foram preparados 40  $\mu$ g dos homogenatos de proteína de cada amostra com tampão de amostra NuPAGE LDS (*Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*) com 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol e incubados a 70°C por 10 min. As amostras foram transferidas para géis Bis-Tris NuPAGE 4–12% (*Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*) e submetidas à eletroforese conforme recomendado pelo fabricante, seguido de transferência para membranas de nitrocelulose (*Hybond ECL, Amersham, GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, EUA*). Foi utilizada coloração com *Ponceau S* (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA*) para monitorar a eficiência da transferência. Depois as membranas foram inibidas por 45 minutos com TBS (solução salina tamponada com tris, pH 7,4) *Tween 20* 1% e albumina de soro bovino (BSA) 3%, e então lavadas (79, 80). Após isso as membranas foram incubadas com seus anticorpos primários por 24h a 4°C. No dia seguinte as membranas foram lavadas novamente e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com os anticorpos secundários conjugados com *horseradish peroxidase* (HRP), *goat anti-rabbit IgG* (1:3000), e *goat anti-mouse IgG* (1:3000) (*Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e *donkey anti-goat IgG* (1:3000) (*Santa Cruz Biotechnology, Inc*). Depois da incubação as membranas foram

submetidas à detecção quimioluminescente com *ECL Plus* (Amersham, GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, EUA) conforme descrito pelo fabricante e visualizado no ImageQuant. A análise densitométrica foi realizada usando Scion Image Software Versão Beta 4.0.2 (Scion Corporation, National Institutes of Health, Frederick, MD, EUA). Os seguintes anticorpos primários foram usados: GlyT1 (*sc-16701*, IgG goat, 1:500); GlyT2 (*sc-30129*, IgG rabbit, 1:1000), BDNF (*sab-1405514*, IgG mouse, 1:1000), GlyR (*sc-20134*, IgG rabbit, 1:1000), TrkB (*sab-4300255*, IgG rabbit, 1:1000), GluN1 (*sc-1467*, igG goat, 1:1000), GluN2A (*sc-1468*, igG, goat, 1:1000), GluN2B (*sc-1469*, igG goat, 1:1000),  $\beta$ -actina (*pa1-183*, igG rabbit, 1:2000), CaMKII (*PA5-17095*, igG, rabbit 1:1000), p-CaMKII (*sc-32289*, mouse 1:1000); PROT (*AGT-013*, IgG rabbit, 1:400).

### **5.3. Análises *ex vivo***

#### **5.3.1. Sinaptossomas**

Os sinaptossomas são partículas isoladas a partir de tecidos cerebrais que representam terminais nervosos pré-sinápticos intactos e funcionalmente ativos. A técnica envolve a homogeneização suave do tecido cerebral, seguida por centrifugação em gradiente de densidade, geralmente utilizando soluções como Percoll ou sacarose. Essas partículas contêm componentes da membrana pré-sináptica, mitocôndrias associadas, vesículas sinápticas e enzimas metabólicas, preservando parcialmente suas funções fisiológicas. São usados para estudar a liberação de neurotransmissores, captação de substâncias, atividade enzimática e alterações metabólicas em condições fisiológicas ou patológicas (81). A liberação de neurotransmissores pode ser estimulada por despolarização com KCl ou agentes químicos, e sua quantificação geralmente utiliza métodos como HPLC, espectrofotometria ou ensaios fluorescentes (81).

Imediatamente após a eutanásia, o córtex e o hipocampo foram removidos e homogeneizados separadamente em solução gradiente contendo: sacarose 320 mM, ditiotreitol 0,25 mM, EDTA 1 mM. Em seguida, o homogeneizado foi exposto a uma centrifugação em baixa velocidade ( $1000 \times g \times 10$  min). Os sinaptossomas foram isolados do sobrenadante por centrifugação descontínua em gradiente de densidade Percoll. Terminais nervosos isolados foram ressuspensos em solução de Krebs-Ringer-HEPES (KRH) contendo:

NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, glicose 10 mM, HEPES 25 mM, com pH 7,4 e sem adição de CaCl<sub>2</sub>, em uma concentração de aproximadamente 10 mg/mL.

Para medir a concentração de Ca<sup>2+</sup> livre intrassinaptossomal separadamente, os sinaptossomas foram pré-incubados com 5 µM/L de sonda Fura-2 pentakis (acetoximetil) Éster (FURA2-AM) por 30 min a 37 °C. Em seguida, o sinaptossoma foi centrifugado (3000 × g × 60s), ressuspensão em KRH sem CaCl<sub>2</sub> e reincubado durante 30 min. Após lavagem com KRH sem CaCl<sub>2</sub>, os sinaptossomas foram imediatamente utilizados para quantificação de Ca<sup>2+</sup> livre intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). A fluorescência foi registrada com comprimento de onda de excitação de 340/380 nm e emissão de 510 nm. CaCl<sub>2</sub> (1 mM/L, concentração final) foi adicionado em suspensão sinaptossômica antes da leitura e 33 mM de KCl foram adicionados para evocar o influxo de cálcio. Finalmente, adicionamos 10% de SDS para obter R<sub>max</sub> e tris-EGTA (3 mol/L Tris, 400 mM/L EGTA, pH 8,6) para obter R<sub>min</sub>.

## **5.4. Análises *in vivo***

### **5.4.1. Animais**

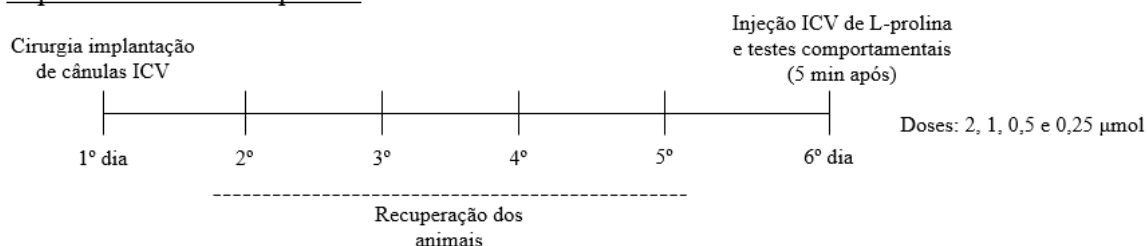
Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, machos, com idade de 8 a 12 semanas, pesando aproximadamente 25-35g. Os animais foram adquiridos no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG: 042/19), e do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG: 200/2017 e 248/2019). Foram mantidos nos biotérios de Neurofarmacologia e Neuroquímica - Neurolab da UFG e Laboratório de Neurofarmacologia – Neurofar da UFMG, com livre acesso a água e a ração e ciclo claro escuro de 12h/12h.

### **5.4.2. Compostos e tratamentos**

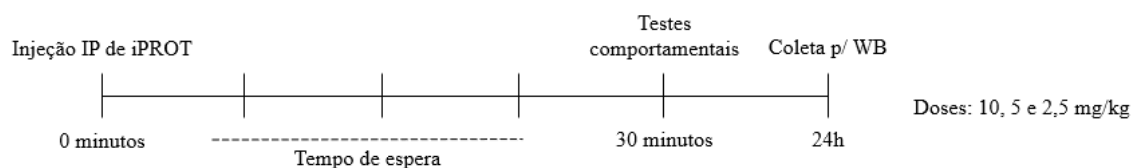
Os compostos utilizados foram a L-prolina (Sigma Aldrich), iPROT (inibidor do transportador de prolina – LQFM/FF), *Human beta Amyloid (1-42) PTD Recombinant Protein* (Invitrogen). Nos experimentos de injeção intracerebroventricular (ICV) de L-prolina, os animais receberam as doses 2, 1, 0.5 e 0.25µM de L-prolina em um volume de 1µL em um fluxo de injeção de 0,5µL/min, imediatamente antes dos testes comportamentais. Os animais do grupo controle receberam apenas solução salina. Nos experimentos de tratamento com o

iPROT por via intraperitoneal, os animais receberam as doses 10, 5 e 2.5mg/kg 30min antes dos testes comportamentais, solubilizados em DMSO 10% em solução salina. Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo. O pré-tratamento dos animais com o iPROT no modelo da A $\beta$  foi realizado nas doses de 5 ou 10mg/kg diariamente por 5 dias antes da indução do modelo. A A $\beta$  foi injetada no hipocampo (IHP) na concentração de 400 pM em um volume de 1 $\mu$ L em um fluxo de injeção de 0,5 $\mu$ L/min. O delineamento dos experimentos segue o esquema abaixo (**Figura 7**):

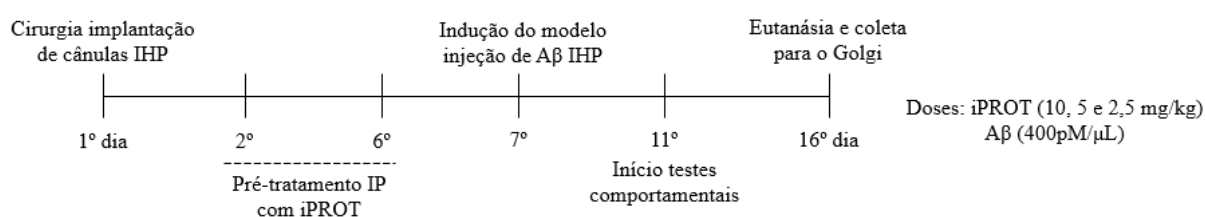
#### Experimentos com a L-prolina



#### Experimentos com o iPROT



#### Pré-tratamento com iPROT no modelo de A $\beta$

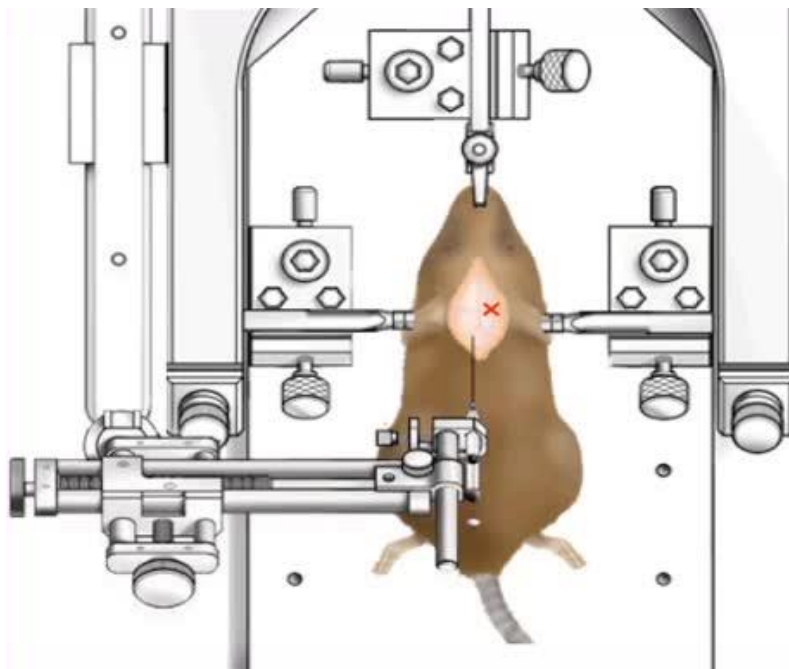


**Figura 7. Delineamento experimental.** Esquema representativo dos delineamentos dos experimentos *in vivo* realizados.

#### 5.4.3. Cirurgia de estereotaxia

A cirurgia de estereotaxia foi realizada para implantação de cânulas com propósito de injetar L-prolina ICV e induzir o modelo de A $\beta$  através do hipocampo. Os camundongos foram anestesiados por via IP com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Após a

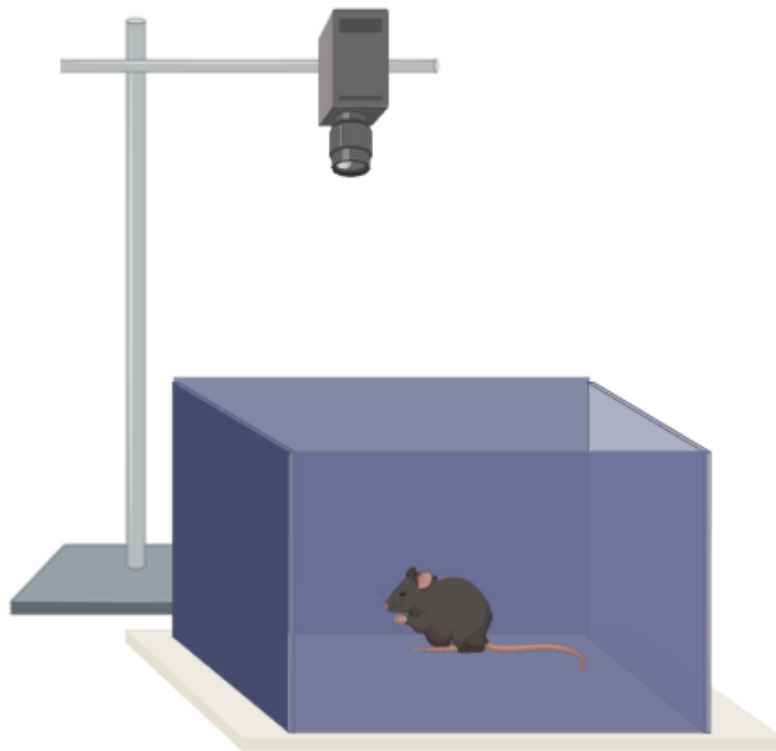
tricotomia da região da cabeça, o animal foi encaixado em posição adequada no aparelho estereotáxico para se fazer a retirada do escalpo e uma incisão sagital na linha média do crânio (**Figura 8**). O bregma foi exposto e o crânio foi perfurado com auxílio de uma broca sobre o ventrículo lateral direito usando as seguintes coordenadas: 0,2 mm rostral ao bregma, 1,0 mm lateral à sutura sagital e 2,5 mm abaixo da superfície do cérebro para ventrículo. Para hipocampo 1,9 mm caudal ao bregma, 1,5 mm lateral à sutura sagital e 1,0 mm ventral ao crânio. Uma cânula de acesso foi implantada nesta região e dois parafusos também foram inseridos na superfície da calota para fixar o capacete de acrílico ao final da cirurgia. Os animais foram então retirados do estereotáxico e foi realizada a sutura da região da cabeça e depois foram levados para a caixa para se recuperarem do procedimento anestésico e cirúrgico. Para a injeção da L-prolina ou do peptídeo A $\beta$  todas as microinjeções foram realizadas pela administração lenta do protótipo ou da solução veículo com auxílio de uma bomba de infusão por um período de 2 minutos, sendo que a agulha permaneceu no local por mais 2 minutos para evitar o refluxo do composto.



**Figura 8. Representação da cirurgia de estereotaxia para acessar regiões de interesse.** Adaptado de *Neuroscience. Rodent Stereotaxic Surgery. JoVE, Cambridge, MA, (2023)*.

#### 5.4.4. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado em um aparato quadrado (45 x 45 x 45 cm) com paredes e piso de acrílico cinza, uniformemente iluminados por luz branca (**Figura 9**) o qual avalia parâmetros de memória espacial e de locomoção (82). Cada animal foi colocado no centro do aparato e foi permitida a exploração livre por 10 minutos. A movimentação espontânea dos camundongos foi registrada automaticamente por uma câmera e, posteriormente, foi analisada usando o *software Any-maze 7.16*. Os dados coletados incluíram distância total percorrida, tempos mobilidade e imobilidade, cruzamentos, tempo de permanência no centro, *rearings* e *groomings* (*manualmente*). O aparato foi limpo com etanol 70% entre as sessões de cada animal. As análises foram realizadas considerando a média  $\pm$  EPM, teste de *one-way* ANOVA e pós teste *Bonferroni*.

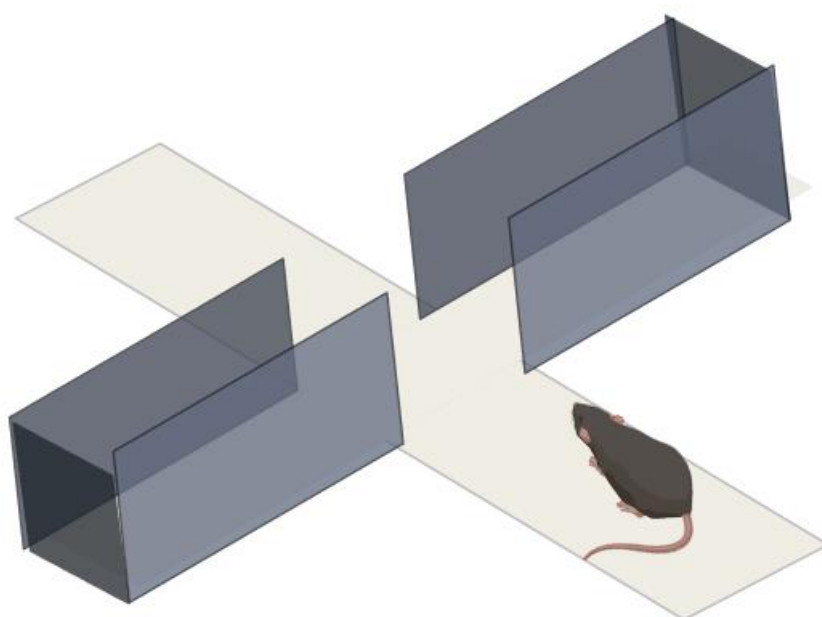


**Figura 9. Representação do aparato do campo aberto.** Medidas de atividade locomotora e comportamentos exploratórios bem como indicativos de ansiedade podem ser analisados. Autoria própria (Biorender).

#### 5.4.5. Teste do labirinto em cruz-elevado

O labirinto em cruz elevado é um aparato constituído de dois braços abertos e dois braços fechados, elevados do chão, com paredes e piso de acrílico, uniformemente iluminados

por luz branca com propósito de avaliar comportamento do tipo ansioso (83) (**Figura 10**). Cada animal foi colocado no centro do aparato e foi permitida a exploração livre por 10 minutos. A movimentação espontânea dos camundongos foi registrada automaticamente por uma câmera e posteriormente foi analisada usando o software *Any-maze 7.16*. Os dados coletados incluíram tempo de permanência nos braços fechados e tempo de permanência nos braços abertos. O aparato foi limpo com etanol 70% entre as sessões de cada animal. As análises foram realizadas considerando a média  $\pm$  EPM, teste de *one-way* ANOVA e pós teste *Bonferroni*.



**Figura 10. Representação do aparato de cruz elevado.** Parâmetros de comportamento do tipo ansioso podem ser analisados. Autoria própria (Biorender).

#### 5.4.6. Teste de reconhecimento de novo objeto (*NORT*)

O teste de reconhecimento de novo objeto (*NORT*) é realizado em um aparato de acrílico (45 x 45 x 45 cm) com paredes e piso de acrílico cinza, uniformemente iluminados por luz branca com o propósito de avaliar a memória e aprendizado em relação ao reconhecimento de um objeto novo (84) (**Figura 11**). O teste consiste em um período de 4 dias. Nas seguintes etapas: 1º dia: habituação – os animais são colocados por 5 min apenas para explorar livremente o aparato; 2º dia: treino I – os animais são colocados na presença de

dois objetos iguais por 10 min; 3º dia: treino II – os animais são colocados novamente na presença de dois objetos iguais por 10 min; 4º dia: teste – um dos objetos é substituído por um objeto novo e os animais são colocados novamente, desta vez por 8 min. Nos dias do treino e teste são analisados os tempos de exploração dos objetos (contato pelas patas ou cheiro), sendo que o teste é calculado o índice de reconhecimento de acordo com a fórmula abaixo. O aparato foi limpo com etanol 70% entre as sessões de cada animal. As análises foram realizadas considerando a média ± EPM, teste de *one-way* ANOVA e pós teste *Bonferroni*.

$$\text{Índice de Reconhecimento} = \frac{\text{Tempo de exploração do objeto novo}}{\text{Tempo de exploração total}}$$



**Figura 11. Representação do aparato do teste reconhecimento de novos objetos (NORT).** Parâmetros de memória como consolidação e aquisição podem ser mensurados. Autoria própria (Biorender).

## 5.5. Análises morfológicas

### 5.5.1. Coloração de Golgi

As espinhas dendríticas da região CA1 do hipocampo dos animais foram visualizadas e quantificadas pela marcação de Golgi. Para a realização desta técnica os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e submetidos à perfusão transcardíaca com PBS 1X e PFA 4%. Os cérebros foram removidos e após ficarem 24 horas em PFA 4%, foram transferidos para solução de Golgi e permaneceram por 10 dias nesta solução, sob proteção da luz. Após impregnação foram transferidos para solução de sacarose 30% por pelo menos 48 horas, para assim serem cortados em fatias coronais de 100  $\mu\text{m}$  no criostato imediatamente após retiradas da sacarose, sendo dispostas em lâminas gelatinizadas 1%. Posteriormente, as lâminas foram imersas em uma bateria de soluções contendo: água destilada por 10 minutos, hidróxido de amônio por 10 minutos, água destilada por 10 minutos, tiosulfato de sódio por 10 minutos, álcoois 70, 95 e 100% por um minuto cada e por último xilol por 40 minutos. Então as lâminas foram montadas com meio de montagem DPX (*Sigma Life Science*), após a secagem, foram visualizadas em um microscópio óptico (*Leica*) com a objetiva de 100X para visualização das espinhas dendríticas. Para a análise foram selecionadas 10 imagens de dendritos no hipocampo, e foi selecionado um segmento de 25  $\mu\text{m}$  em um dendrito da imagem, e todas as espinhas dendríticas dentro desse segmento foram quantificadas utilizando o software *ImageJ* 1.53 e o plugin *cell counter*.

## **5.6. Estatística**

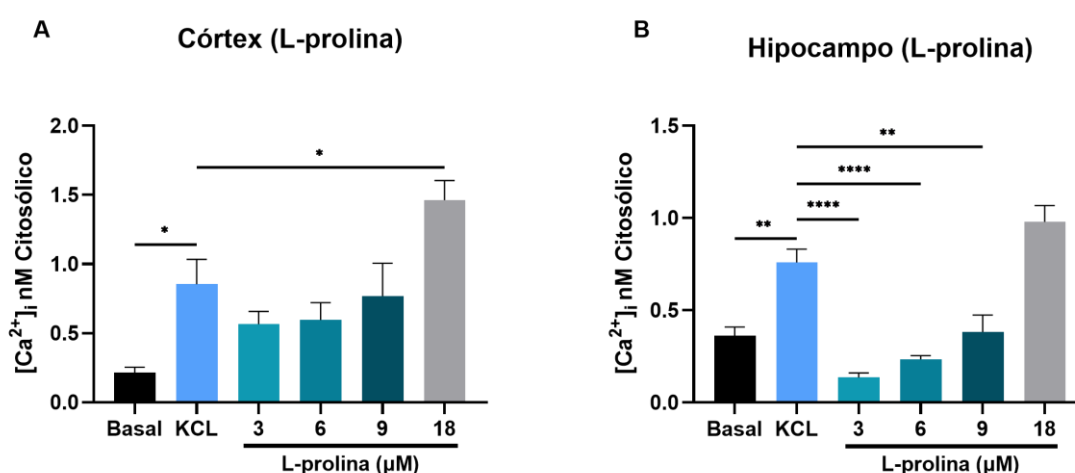
Todos os experimentos realizados foram realizados de maneira independente. Para os testes moleculares de PCR e de bioquímica (western-blot) utilizado ANOVA de uma ou duas vias e pós-teste de Bonferroni, considerando média  $\pm$ EPM e significância de  $p < 0,05$ . Para os testes de comportamento animal foi utilizado ANOVA de uma via e pós-teste Bonferroni considerando média  $\pm$ EPM e significância de  $p < 0,05$ . As análises foram feitas com o auxílio do software *GraphPad Prism* 9.0.2.

## **6. Resultados**

### **6.1. O papel da prolina no SNC**

### 6.1.1. L-prolina afeta o conteúdo de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular em sinaptossomas corticais e hipocampais

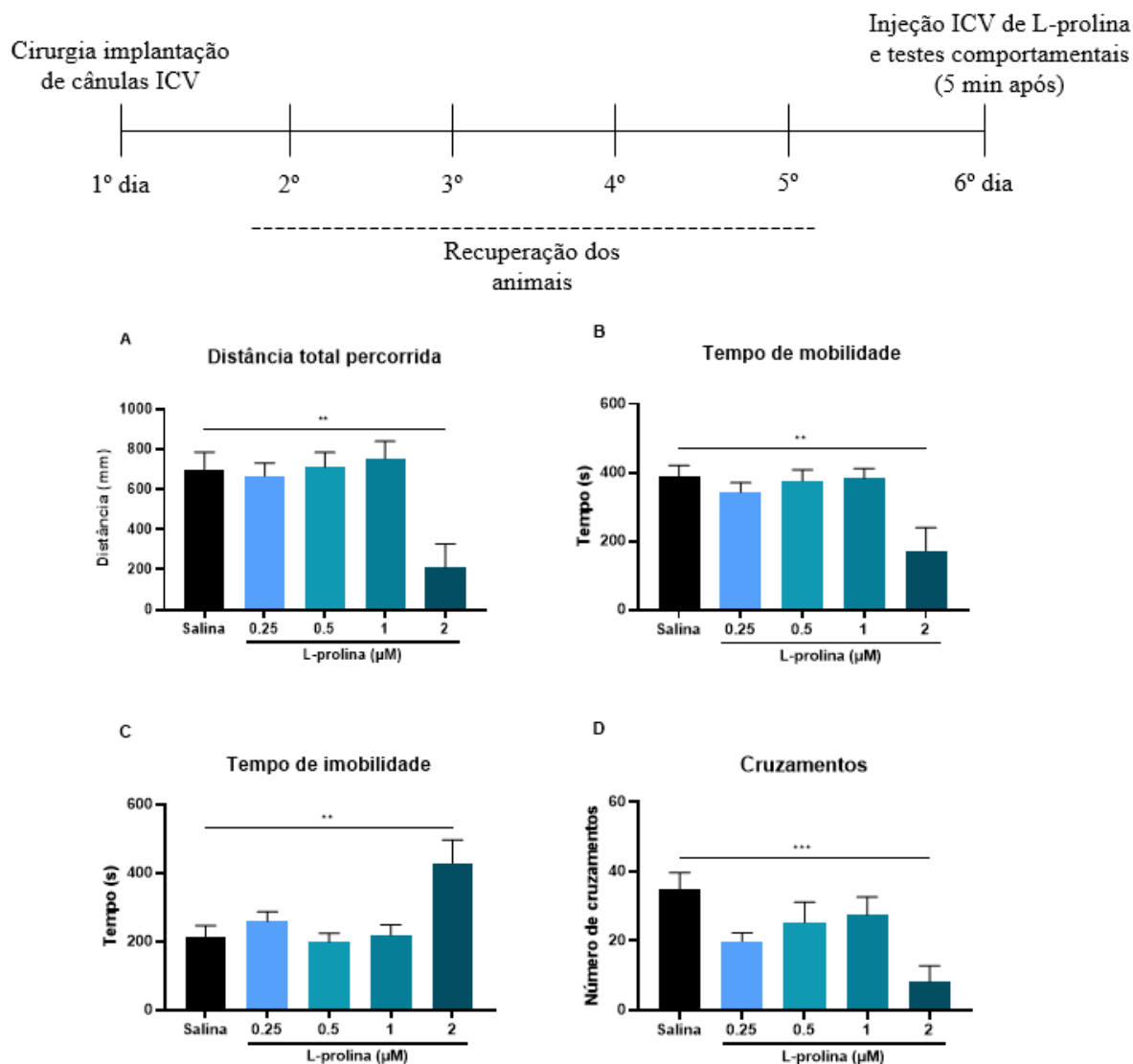
Ao analisar o conteúdo de cálcio intracelular separadamente, observou-se que na maior dose de 18  $\mu\text{M}$  ( $1,46 \pm 0,14$ ), houve aumento significativo no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 12A**). No hipocampo, houve uma redução significativa do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas doses menores de 3  $\mu\text{M}$  ( $0,13 \pm 0,02$ ), 6  $\mu\text{M}$  ( $0,23 \pm 0,01$ ) e 9  $\mu\text{M}$  ( $0,38 \pm 0,09$ ) em relação ao estímulo com KCl. (**Figura 12B**).



**Figure 12.** Análise do efeito da L-prolina em sinaptossomas corticais e hipocampais de camundongos C57BL/6 quanto ao conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A-B. Conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta no córtex e no hipocampo. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, one-way ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ( $n = 3-5$ ).

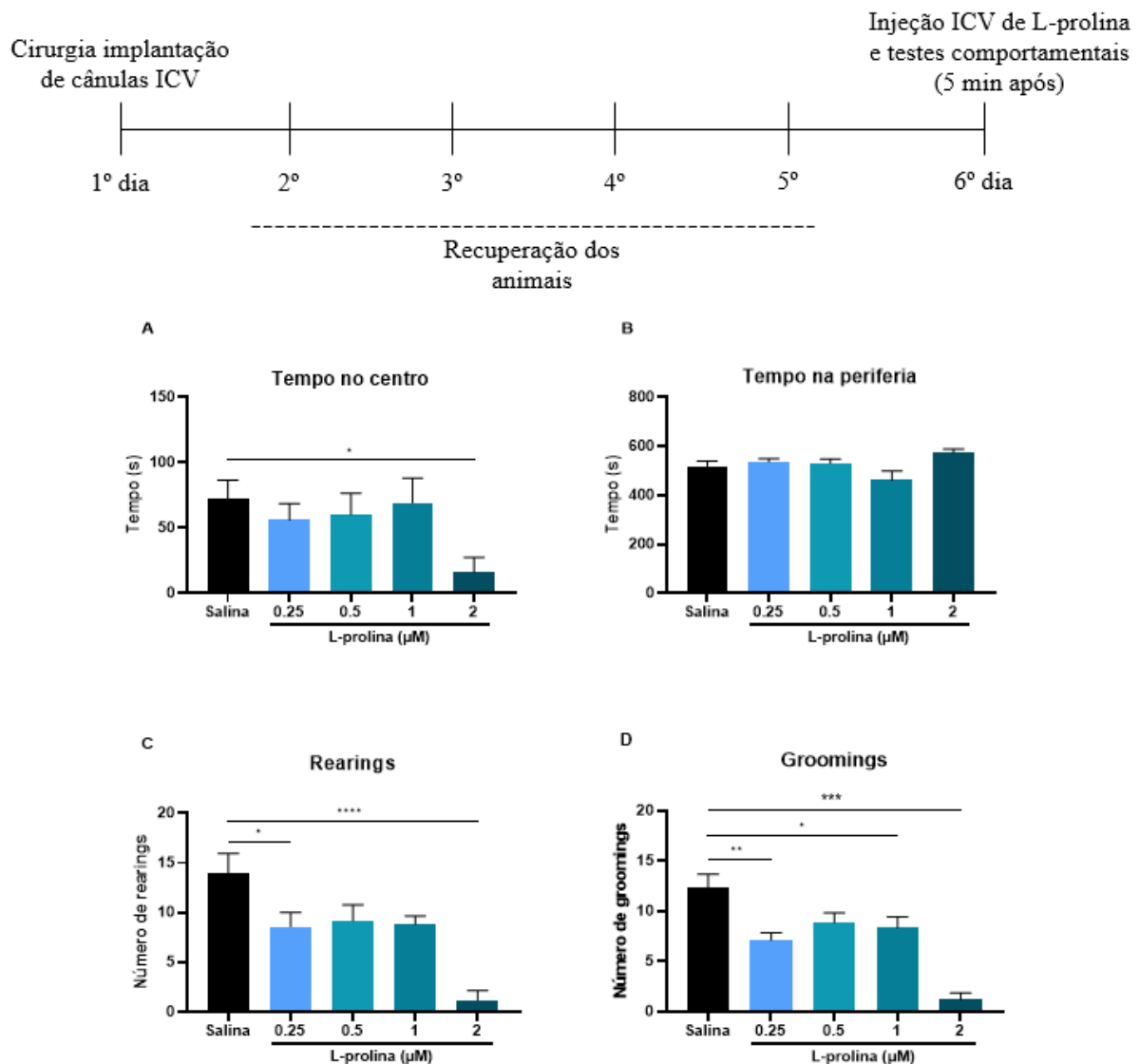
### 6.1.2. L-prolina altera perfil motor/exploratório de camundongos e não causa comportamento do tipo ansioso

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar o perfil motor dos animais após a injeção ICV. de L-prolina. Observou-se que, a maior concentração testada, 2  $\mu\text{M}$ , foi capaz de reduzir significativamente a distância total percorrida ( $210,0 \pm 117,1$ ) (**Figura 13A**), o tempo de mobilidade ( $171,7 \pm 67,61$ ) (**Figura 13B**), e, conseqüentemente, houve um aumento no tempo de imobilidade ( $428,3 \pm 67,61$ ) (**Figura 13C**). O número de cruzamentos entre os quadrantes do aparato também foi alterado, reduzindo-se na maior concentração ( $8,20 \pm 4,52$ ) (**Figura 13D**). Conclui-se que a L-prolina, na maior concentração, é capaz de reduzir a mobilidade dos animais em um teste de movimentação espontânea como o campo aberto.



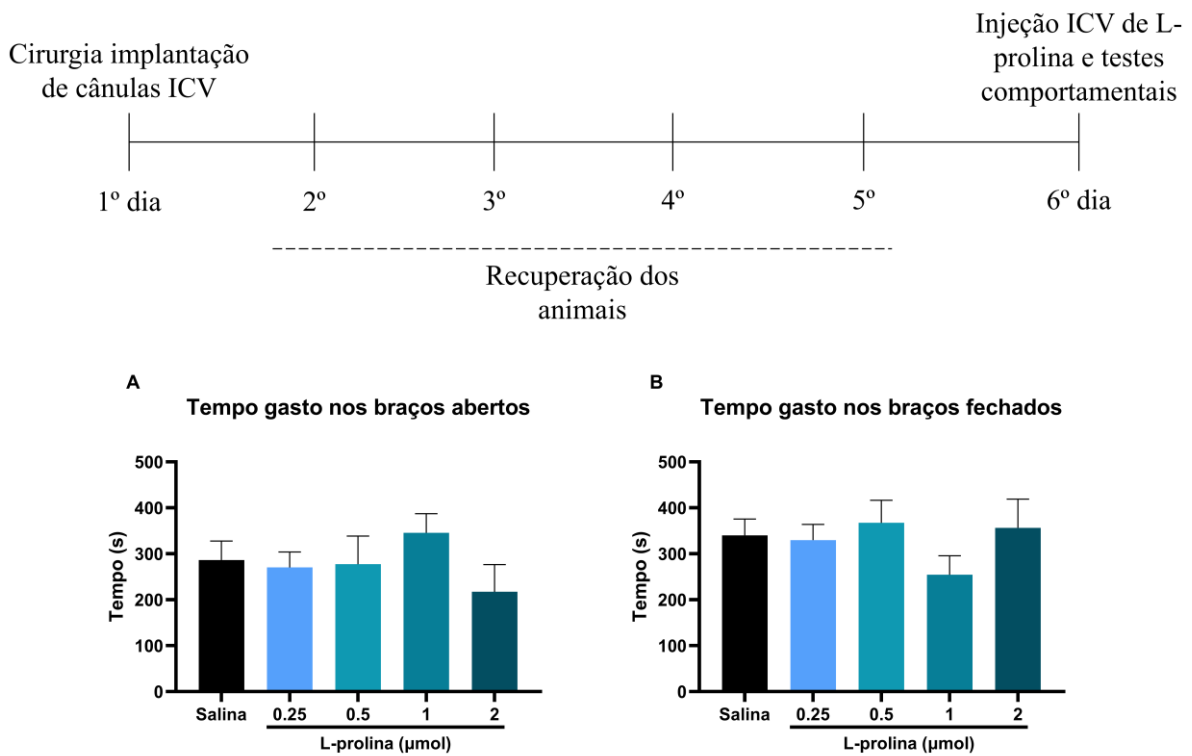
**Figura 13.** Análise do efeito comportamental da L-prolina ICV em camundongos C57BL/6 no teste do campo aberto. A-D. Parâmetros motores no teste do campo aberto, evidenciando uma redução no padrão motor dos animais. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, one-way ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  (n=9-10).

Constatou-se também que a L-prolina, na maior concentração, é capaz de reduzir o tempo de permanência no centro do aparato ( $16,23 \pm 11,31$ ) (**Figura 14A**), bem como diminuiu o número de *rearings* - comportamento inato exploratório dos animais - ( $1,16 \pm 0,98$ ) (**Figura 14C**) e reduziu o número de *groomings* – comportamento de autolimpeza inato – ( $1,20 \pm 0,66$ ) (**Figura 14D**). Não houve alteração no tempo de permanência na periferia do aparato (**Figura 14B**).



**Figura 14. Análise do efeito comportamental da L-prolina ICV em camundongos C57BL/6 no teste do campo aberto. A-D.** Parâmetros exploratórios e inatos no teste do campo aberto, evidenciando uma redução do comportamento exploratório inato dos animais. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, one-way ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  (n=9-10).

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado para elucidar possíveis alterações comportamentais do tipo ansioso. Foi observado que, nos animais que receberam a maior concentração de L-prolina, não houve uma redução no tempo gasto nos braços abertos (**Figura 15A**); não apresentando diferença significativa em comparação aos grupos controle. Da mesma forma, no tempo gasto nos braços fechados (**Figura 15B**), não se observaram diferenças significativas entre os grupos.

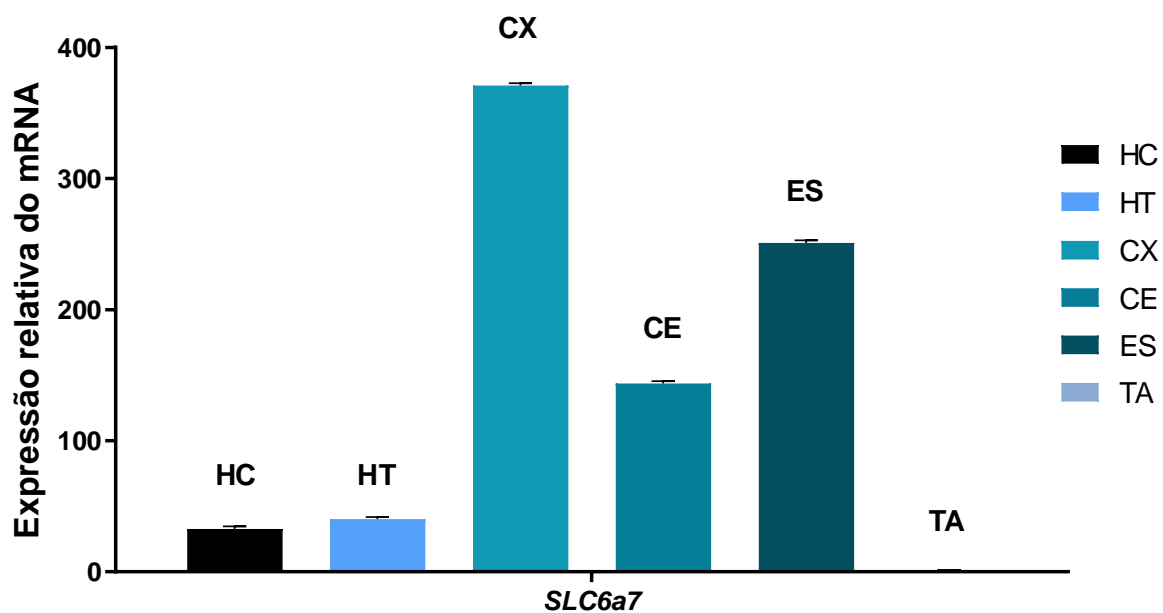


**Figura 15. Análise do efeito comportamental da L-prolina ICV em camundongos C57BL/6 no teste do labirinto em cruz elevado.** A-B. Parâmetros exploratórios no teste do labirinto em cruz elevado, evidenciam nenhum comportamento do tipo ansioso. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, one-way ANOVA com pós teste Bonferroni, (n=9-10).

## 6.2. O papel do transportador de prolina (SLC6A7) no SNC

### 6.2.1. PROT (Slc6a7) é expresso no encéfalo e possui ampla distribuição

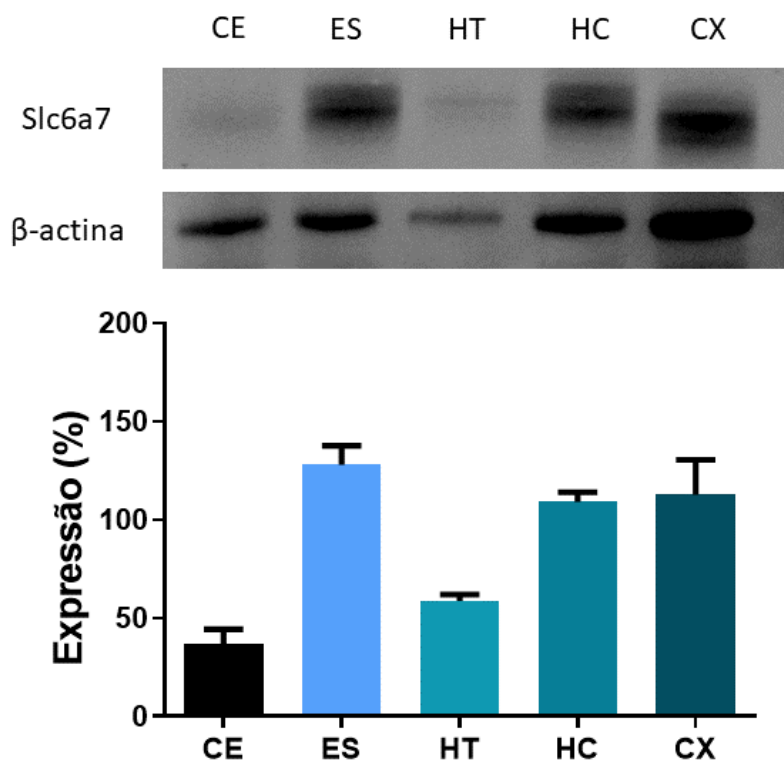
A análise da expressão gênica dos três transportadores de L-prolina visa determinar a predominância de cada transportador nas regiões encefálicas analisadas (38, 85-87). No tecido adiposo não foi encontrada nenhuma expressão detectável dos genes e, portanto, foi utilizado como grupo de referência. A análise da expressão gênica demonstra que o transportador Slc6a7 foi altamente expresso no córtex ( $370,9 \pm 1,8$ ), seguido pelo estriado ( $250,8 \pm 1,9$ ) e cerebelo ( $143,5 \pm 1,8$ ) (**Figura 16**).



**Figura 16. Análise de expressão relativa do transportador de prolina (SLC6a7/PROT) no encéfalo de camundongos C57BL/6 por rtPCR.** As análises estatísticas foram determinadas com two-way ANOVA seguido do teste post hoc de Bonferroni com n=3. Todos os genes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tecido adiposo. Gene controle:  $\beta$ -actina; Grupo de Referência: Tecido Adiposo; HC: hipocampo; HT: hipotálamo; CX: córtex; CE: cerebelo; ES: estriado; TA: tecido adiposo.

### 6.2.2. PROT (*Slc6a7*) é específico do encéfalo em diferentes regiões

Após avaliar a expressão gênica dos transportadores de L-prolina, verificamos a expressão da proteína (PROT) em diferentes regiões do cérebro. Evidenciamos que as regiões do estriado ( $128,2 \pm 9,6$ ) córtex ( $112,8 \pm 17,8$ ) e hipocampo ( $109,2 \pm 4,8$ ) são as regiões onde o PROT está mais expresso (**Figura 17**).



**Figura 17. Análise da expressão de PROT em diferentes regiões encefálicas.** As análises estatísticas foram determinadas com one-way ANOVA ( $\pm$ EPM) seguido do teste post hoc de Bonferroni com  $n=4$  ( $p<0,05$ ). Proteína controle:  $\beta$ -actina; CE: cerebelo; ES: estriado; HT: hipotálamo; HC: hipocampo e CX: córtex.

### 6.2.3. PROT é um alvo farmacológico dos inibidores iPROT, LQFM215 e LX6171

Através do servidor *SwissModel*, realizamos a modelagem de PROT a partir da submissão da sequência FASTA (UniProt: Q99884) da proteína. Inicialmente, realizamos uma busca por *templates* (moldes), baseando a escolha do melhor *template* no valor de GMQE (*Global Model Quality Estimate*), que é uma métrica de avaliação global da estrutura empregada pelo servidor (quanto mais próximo de 1, melhor), na porcentagem de identidade ( $\geq 25\%$ ) e no método de resolução do *template*, que pode ser cristalografia de raios X ( $\leq 3\text{\AA}$ ), RMN ou *AlphaFold* (algoritmo de aprendizado de máquina). O *template* escolhido para a modelagem de PROT possuía um GMQE de 0,86, uma identidade de 97,9% e foi resolvido pelo *AlphaFold v2*. Após a construção do modelo, baixamos a estrutura 3D no formato .pdb e utilizamos o software PyMOL v2 para a representação da estrutura (**Figura 18A**).

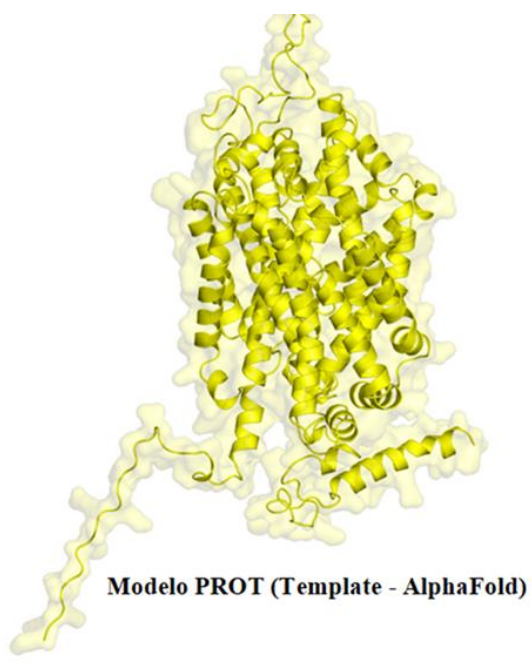
Posteriormente, buscamos o sítio ativo da proteína por meio do servidor PrankWeb, que utiliza um algoritmo de aprendizado de máquina (P2Rank) para identificar locais na

superfície de estruturas 3D de proteínas capazes de se ligar a pequenos compostos. Identificamos o sítio de ligação nas coordenadas X: 4,0892; Y: 4,8023 e Z: -3,0064.

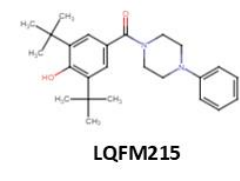
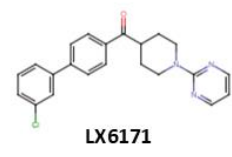
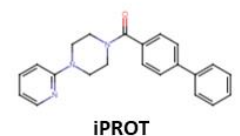
Para as análises de *docking* molecular, utilizamos o servidor DockThor. O inibidor iPROT protótipo desenvolvido por Zipp e colegas (2014) (37) e o LQFM215 sintetizado pelo Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal – UFG, foram desenhados com o auxílio do software Marvin, e o inibidor LX6171 foi obtido do PubChem (15950717). O LX6171 é um inibidor conhecido dos transportadores de L-prolina que chegou em fase 3 de ensaios clínicos em pacientes com Alzheimer foi utilizado como controle (88). Preparamos a proteína e os ligantes com o *software* Maestro, aplicamos o campo de força OPLS4 e protonamos as estruturas de acordo com o pH fisiológico de 7,4, removendo as moléculas de água. Submetemos os complexos ao *docking* utilizando uma abordagem flexível, de acordo com as coordenadas X, Y e Z do sítio de ligação.

Os resultados mostraram que ambos os ligantes interagiram com PROT de maneira semelhante, com scores de energia de ligação de -8.271 kcal/mol para o iPROT, -8.471 kcal/mol para o LX6171, e -7.854 kcal/mol para o LQFM215, indicando um encaixe discretamente melhor para o LX6171. Já o LQFM215 obteve um valor de *docking* mais distante dos outros inibidores, possuindo uma afinidade mais fraca com o transportador (**Figura 18C-E**). O iPROT formou uma interação cátion- $\pi$  com um de seus anéis aromáticos e o resíduo Asp66 na sua porção amino-terminal (3,1Å) garantindo boa estabilidade na interação com a proteína (**Figura 18C**). Já o LX6171 apresentou interação  $\pi$ - $\pi$  com sua subunidade bifênica e o resíduo Trp61, e interações hidrofóbicas com os resíduos Pro364, Gly363, Ile136, Trp61 e Leu57 (**Figura 18D**). Por fim o LQFM215 apresentou uma ligação de hidrogênio com o resíduo Glu290, e interações hidrofóbicas com os resíduos Pro364 e Val451 (**Figura 18E**).

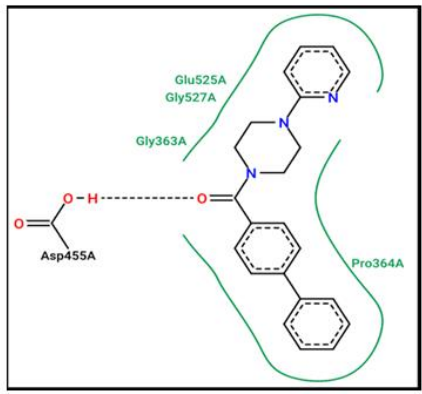
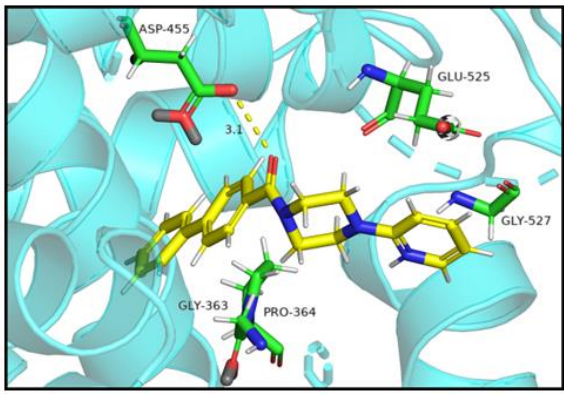
A



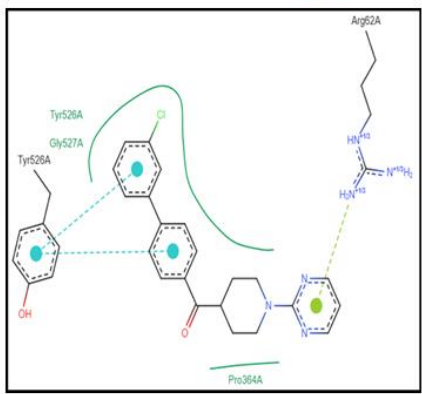
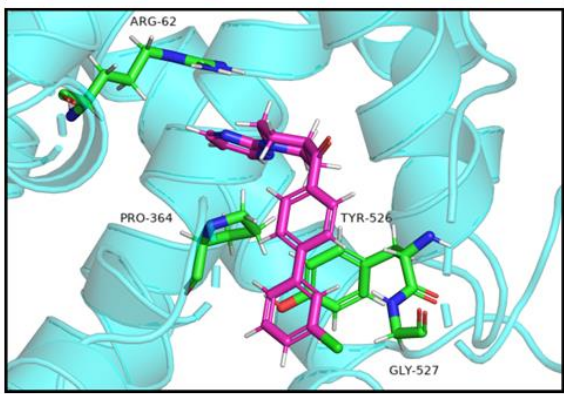
B



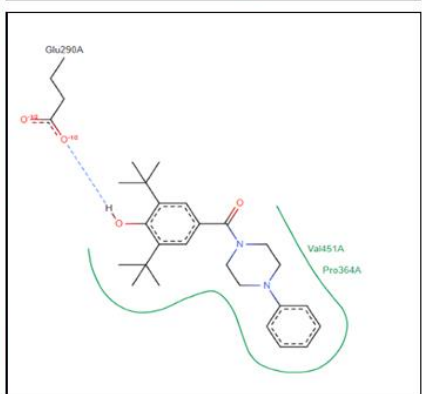
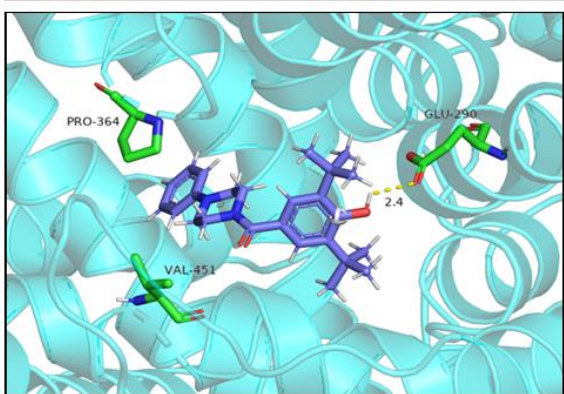
C



D



E

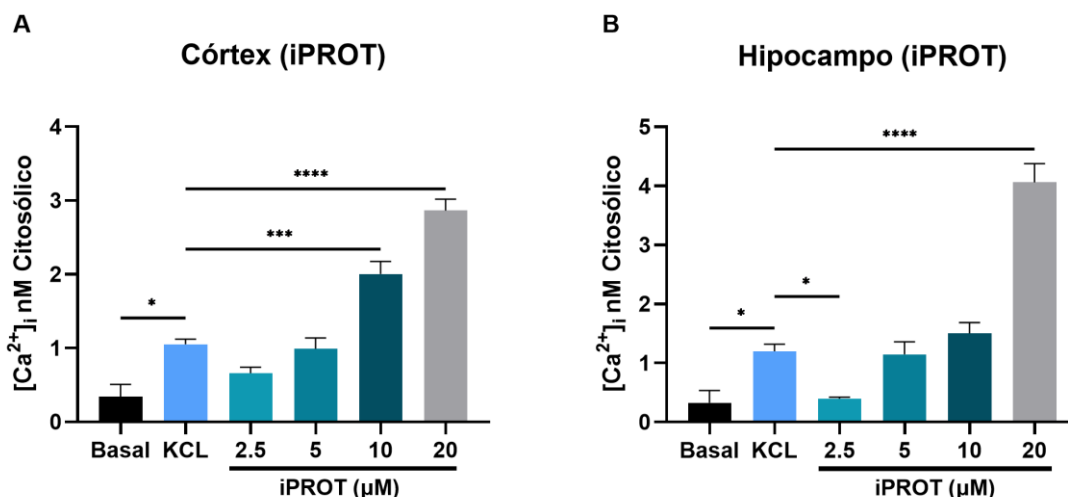


**Figura 18. Estrutura e *docking* molecular do PROT com o iPROT, LX6171 e o LQFM215.** **A.** Estrutura de PROT por modelagem por homologia *template* do *AlphaFold* foi utilizado. **B.** Estruturas moleculares dos inibidores. **C.** Interação do iPROT (amarelo) com o PROT, ligação de hidrogênio (pontilhado preto) e interações hidrofóbicas (linha verde). **D.** Interação de LX6171 (magenta) com PROT, interações pi-pi (pontilhado azul), pi-cátion (pontilhado verde), interações hidrofóbicas (linha verde). **E.** Interação de LQFM215 (azul) com PROT, ligação de hidrogênio (pontilhado azul), interações hidrofóbicas (linha verde).

#### 6.2.4. iPROT afeta o conteúdo de cálcio intracelular em sinaptossomas corticais e hipocampus semelhante a L-prolina

Analisando o efeito do inibidor do transportador de prolina (iPROT) em sinaptossomas corticais e hipocampus, observou-se que nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$ , houve aumento significativo ( $2,00 \pm 0,17$  e  $2,86 \pm 0,15$ , respectivamente). No hipocampo, na menor concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , houve redução significativa ( $0,39 \pm 0,02$ ), e nas concentrações subsequentes, observou-se tendência de aumento, sendo o aumento considerável e significativo na maior dose de 20  $\mu\text{M}$  ( $4,06 \pm 0,31$ ) (**Figura 19A-B**).

Esses dados, em conjunto, fornecem hipóteses sobre como a inibição do iPROT interfere na dinâmica da neurotransmissão glutamatérgica.

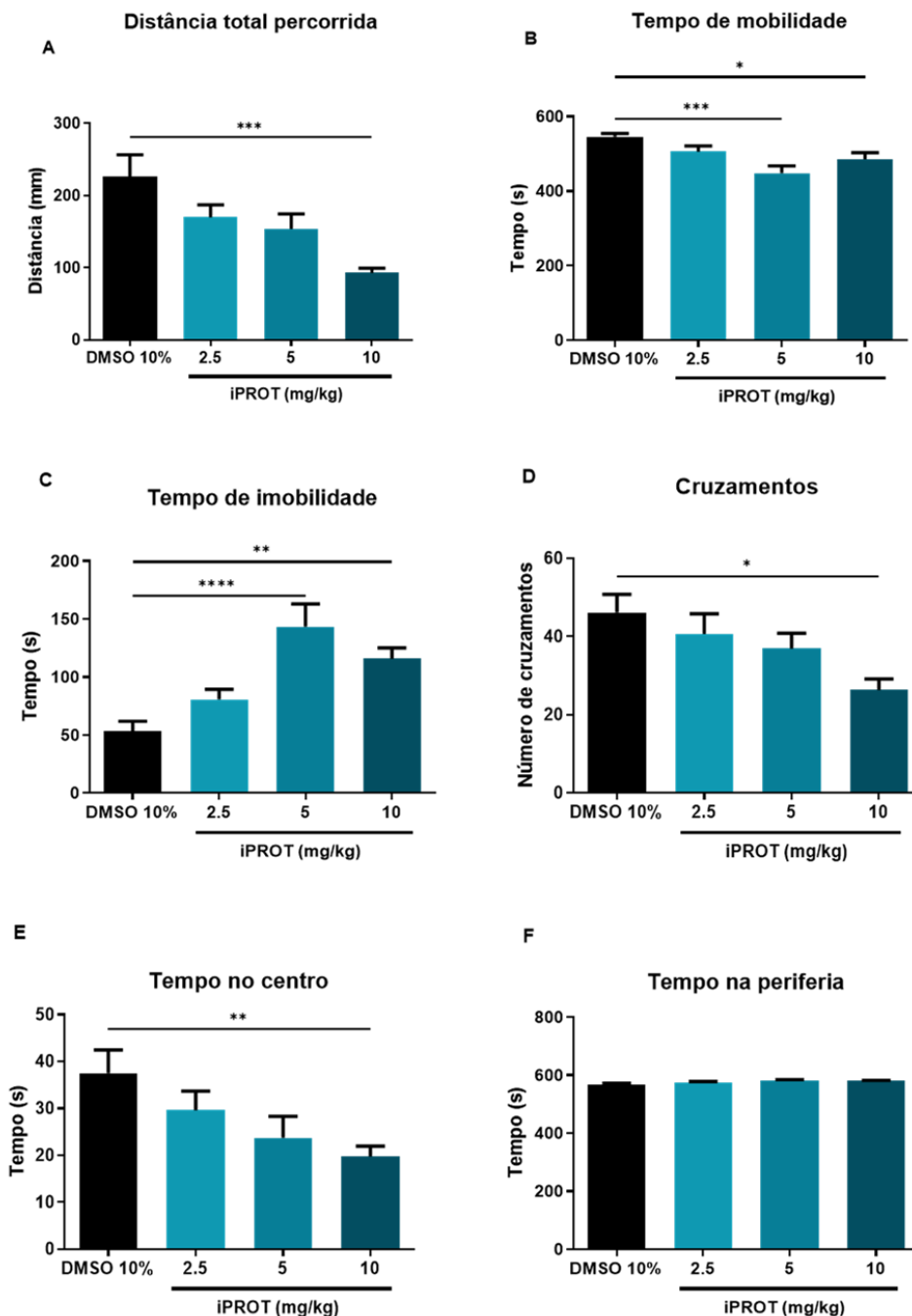


**Figura 19. Análise do efeito do iPROT em sinaptossomas corticais e hipocampus de camundongos C57BL/6 quanto ao conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.** A-B. Conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta no córtex e no hipocampo. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, *one-way* ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,01$  \*\*\*\* $p < 0,001$  (n=3-5).

### 6.2.5. iPROT altera perfil motor/exploratório de camundongos e não causa comportamento do tipo ansioso

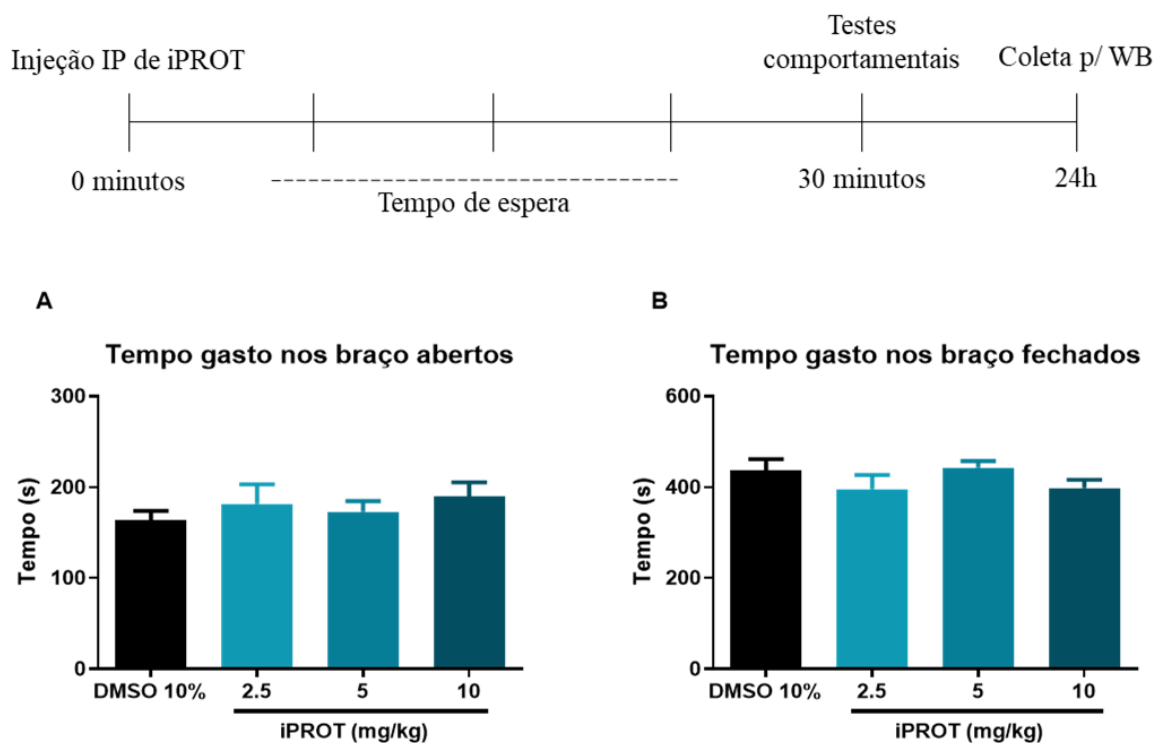
Investigamos, diferentemente da ação central da L-prolina, se a inibição do PROT teria efeitos semelhantes, porém de maneira indireta, através de um efeito modulatório da proteína. Utilizamos o teste do campo aberto para avaliar novamente o padrão motor e exploratório dos animais, após a injeção intraperitoneal do iPROT em diferentes doses 2,5, 5 e 10 mg/kg. Observamos redução na distância total percorrida na maior dose testada de 10 mg/kg ( $92,84 \pm 6,58$ ), bem como uma redução no tempo de mobilidade nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg ( $448,2 \pm 19,57$  e  $485,8 \pm 17,25$ , respectivamente) (**Figura 20A-B**). Consequentemente, o tempo de imobilidade aumentou nas doses de 5 mg/kg ( $143,4 \pm 19,69$ ) e 10 mg/kg ( $115,9 \pm 9,29$ ) (**Figura 20C**). O número de cruzamentos também foi reduzido na maior dose ( $26,29 \pm 2,89$ ) (**Figura 20D**).

Da mesma forma, o tempo de permanência no centro do aparato reduziu-se na maior dose ( $19,73 \pm 2,19$ ) (**Figura 20E**), no entanto, o tempo de permanência na periferia do aparato permaneceu sem alterações significativas (**Figura 20F**).



**Figura 20. Análise do efeito comportamental do iPROT em camundongos C57BL/6 no teste do campo aberto.** A-D. Parâmetros motores no teste do campo aberto, evidenciam redução no padrão motor dos animais. E-F. Parâmetros exploratórios no teste do campo aberto, evidenciam redução do comportamento exploratório dos animais. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, *one-way* ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  (n=9-10).

Verificamos em seguida no teste do labirinto em cruz elevado se o tratamento com o iPROT causaria algum comportamento do tipo ansioso, porém assim como no efeito central da L-prolina não vimos alterações, justamente por impactar apenas na mobilidade dos animais (**Figura 21**).



**Figura 21. Análise do efeito comportamental do iPROT em camundongos C57BL/6 no teste do labirinto em cruz elevado. A-B.** Parâmetros exploratórios no teste do labirinto em cruz elevado, evidenciam nenhum comportamento do tipo ansioso. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, *one-way* ANOVA com pós teste Bonferroni, (n=9-10).

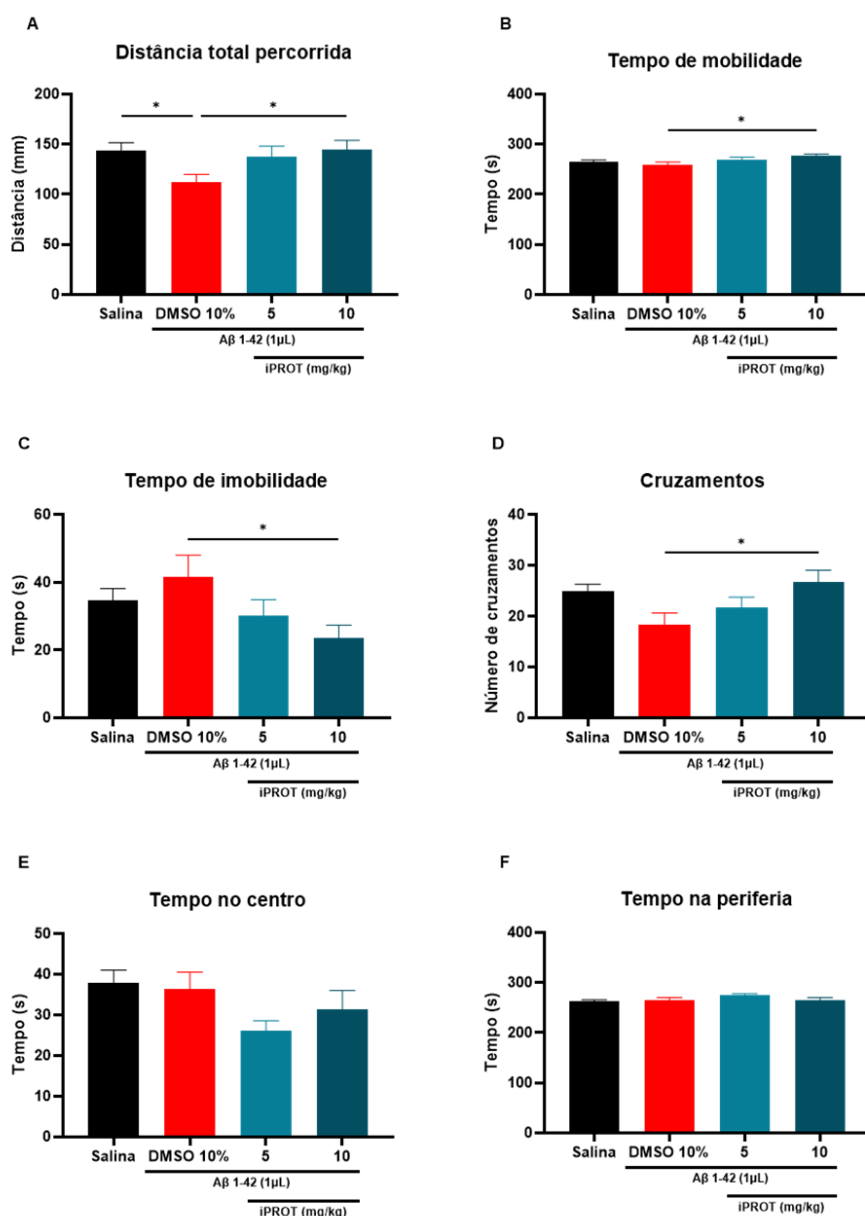
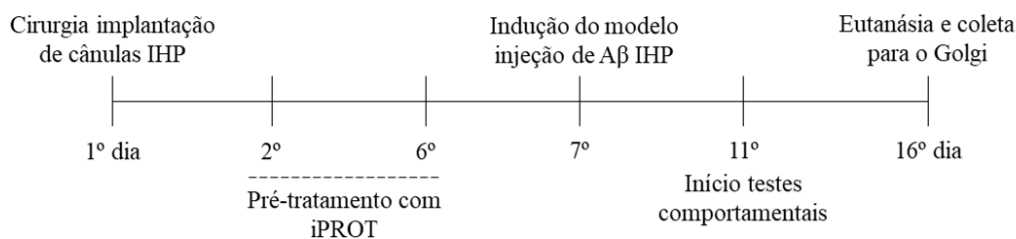
### 6.3. O transportador de prolina (SLC6A7) como alvo terapêutico

#### 6.3.1. iPROT possui potencial neuroprotetor em modelo animal de Doença de Alzheimer

A partir da caracterização comportamental do iPROT, investigamos seu potencial neuroprotetor por meio do pré-tratamento por 5 dias nas doses de 5 e 10 mg/kg em um modelo animal de Doença de Alzheimer induzido por injeção intrahipocampal (IHP) de A $\beta$ . Inicialmente, avaliamos parâmetros de movimentação espontânea dos animais a partir do dia de habituação do experimento, utilizando o teste do campo aberto. Observou-se que, diferentemente do comportamento basal do iPROT, os animais submetidos previamente ao modelo de A $\beta$  apresentaram aumento nos parâmetros de mobilidade. No grupo modelo,

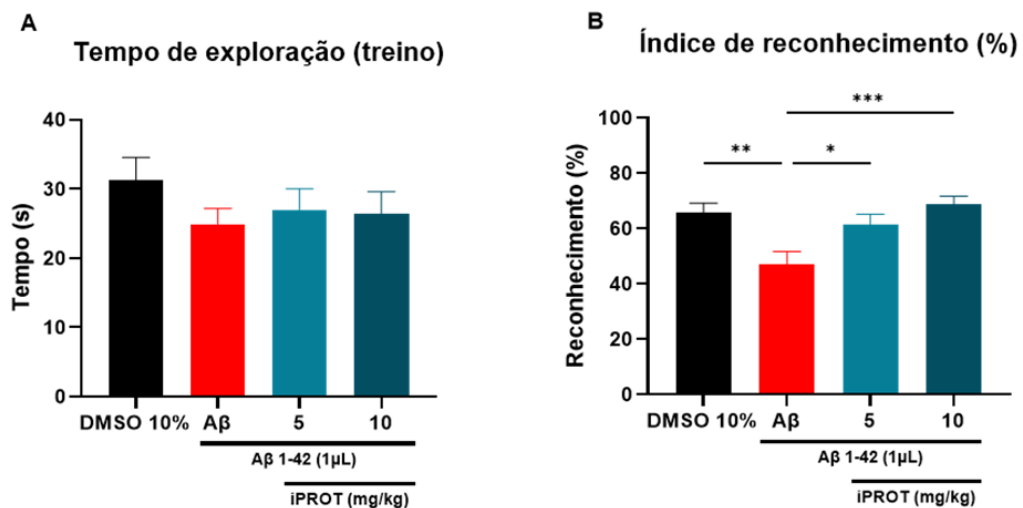
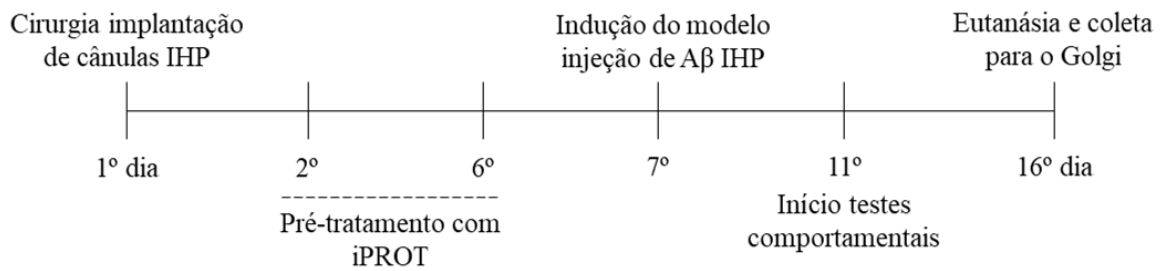
comparado ao grupo tratado com salina, houve redução na distância total percorrida ( $112,3 \pm 7,62$ ) (**Figura 22A**), enquanto na maior dose testada de iPROT (10 mg/kg), ocorreu aumento significativo na distância percorrida ( $144,3 \pm 9,72$ ) (**Figura 22A**), indicando que os animais tratados com o iPROT percorreram distância maior em comparação aos animais sem tratamento.

Conseqüentemente, também foi observado aumento no tempo de mobilidade na maior dose de iPROT ( $276,6 \pm 3,89$ ) (**Figura 22B**), bem como redução no tempo de imobilidade ( $23,43 \pm 3,89$ ) (**Figura 22C**). O número de cruzamentos entre os quadrantes do aparato aumentou na maior dose de iPROT ( $26,63 \pm 2,42$ ) (**Figura 22D**). Quanto ao padrão exploratório, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de tempo de permanência no centro ou na periferia (**Figura 22E-F**).



**Figura 22. Análise do efeito do pré-tratamento com iPROT em camundongos C57BL/6 submetidos a IHP de A $\beta$  no teste do campo aberto. A-D. Parâmetros motores no teste do campo aberto, evidenciam aumento no padrão motor dos animais em relação ao dano causado pela A $\beta$ . E-F. Parâmetros exploratórios no teste do campo aberto, sem diferenças significativas. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, *one-way* ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  ( $n = 9-10$ ).**

O modelo de neurodegeneração induzido por injeção intrahipocampal (IHP) de A $\beta$  em camundongos é um modelo que mimetiza os sinais clínicos e danos causados pela toxicidade observada na Doença de Alzheimer (DA) como o déficit de memória. Por esse motivo, realizamos a avaliação de memória através do teste de reconhecimento de novo objeto para investigar o potencial neuroprotetor do iPROT. Observamos que o pré-tratamento com iPROT não alterou o tempo de exploração na etapa de treinamento, garantindo que nem o modelo de neurodegeneração nem o tratamento impactaram na exploração inata dos animais por objetos em um aparato (**Figura 23A**). Por outro lado, na etapa de teste, constatou-se que os animais apenas com o dano causado por A $\beta$  exploraram menos o objeto novo ( $47,24 \pm 4,35$ ) (**Figura 23B**), o que é congruente com as expectativas desse modelo, uma vez que causa prejuízos cognitivos nos animais. O tratamento com iPROT nas duas doses testadas, 5 e 10 mg/kg ( $61,27 \pm 3,92$  e  $68,65 \pm 3,02$ , respectivamente), foi capaz de recuperar e até aumentar o tempo de exploração do objeto novo na maior dose.

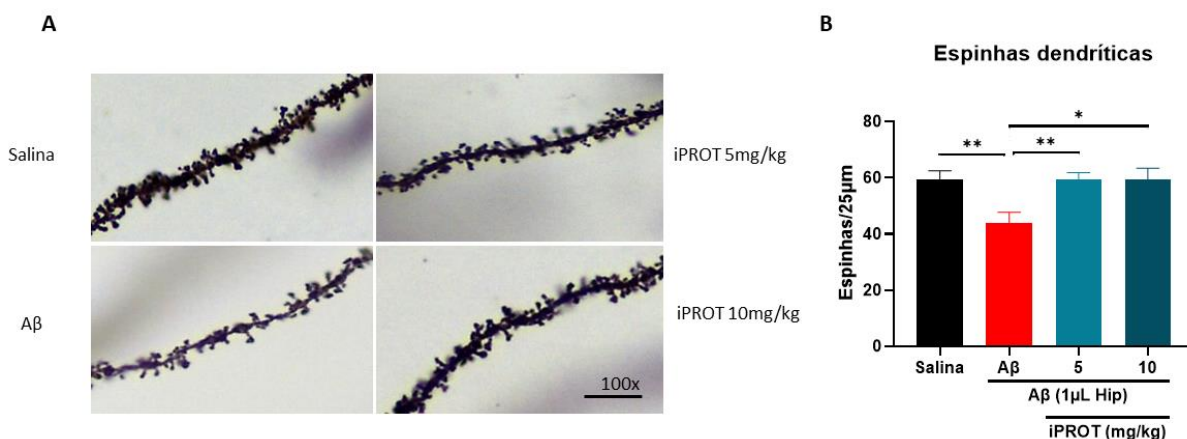


**Figura 23. Análise do efeito do pré-tratamento com iPROT em camundongos C57BL/6 submetidos a IHP de A $\beta$  no teste de reconhecimento de novo objeto.** A. Tempo de exploração dos objetos na etapa do treino, não houve diferença significativa entre os grupos. B. Índice de reconhecimento na etapa do teste, animais tratados com o iPROT apresentam melhora na memória. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, *one-way* ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  (n=10-15).

### 6.3.2. iPROT preserva a memória e os brotamentos dendríticos de animais submetidos ao modelo de DA

As espinhas dendríticas ou brotamentos dendríticos são pequenas extensões em forma de cogumelo ou espinha que se projetam a partir dos dendritos dos neurônios, desempenham papel central na comunicação sináptica ocorrendo na maioria das sinapses excitatórias no encéfalo. A presença de espinhas dendríticas aumenta a superfície disponível para a formação de sinapses, o que é essencial para a plasticidade sináptica, um fenômeno que sustenta a aprendizagem e a memória, ou seja, a formação, eliminação ou modificação das espinhas dendríticas está associada à capacidade do encéfalo de se adaptar.

Por meio da técnica de coloração de Golgi verificamos se o pré-tratamento com o iPROT seria capaz de preservar as espinhas dendríticas no modelo de neurodegeneração por A $\beta$ , pois sabemos que no fenômeno de neurodegeneração ocorre diminuição nesses brotamentos (**Figura 24A**). Ao analisar, observamos que o tratamento nas duas doses foi capaz de preservar e proteger o sistema do dano causado por A $\beta$ , na dose de 5mg/kg ( $59,30 \pm 2,56$ ) e 10mg/kg ( $59,60 \pm 3,91$ ), em comparação com o grupo sem o tratamento, que possuía redução significativa do número de brotamentos em relação ao grupo controle ( $43,89 \pm 3,87$ ) (**Figura 22B**).

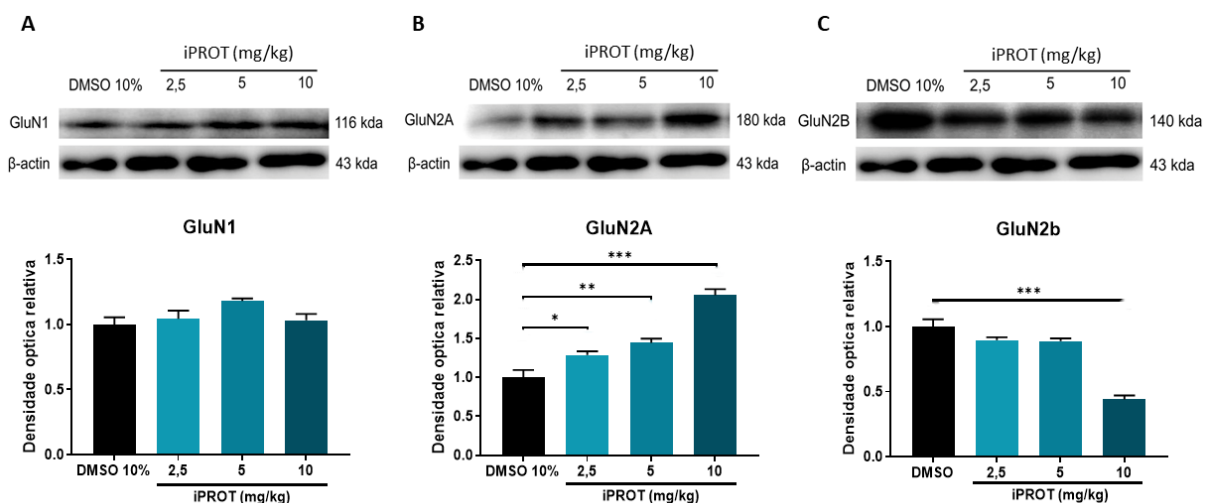


**Figura 24. Análise do efeito do pré-tratamento com iPROT em camundongos C57BL/6 submetidos a IHP de A $\beta$  sob as espinhas dendríticas hipocâmpais (CA1).** **A.** Imagens representativas das espinhas dendríticas de neurônios da região CA1 do hipocampo. **B.** Quantificação do número de espinhas dendríticas. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, *one-way* ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  ( $n = 10$ ).

### 6.3.3. iPROT altera expressão de proteínas da neurotransmissão glutamatérgica e da via do BDNF

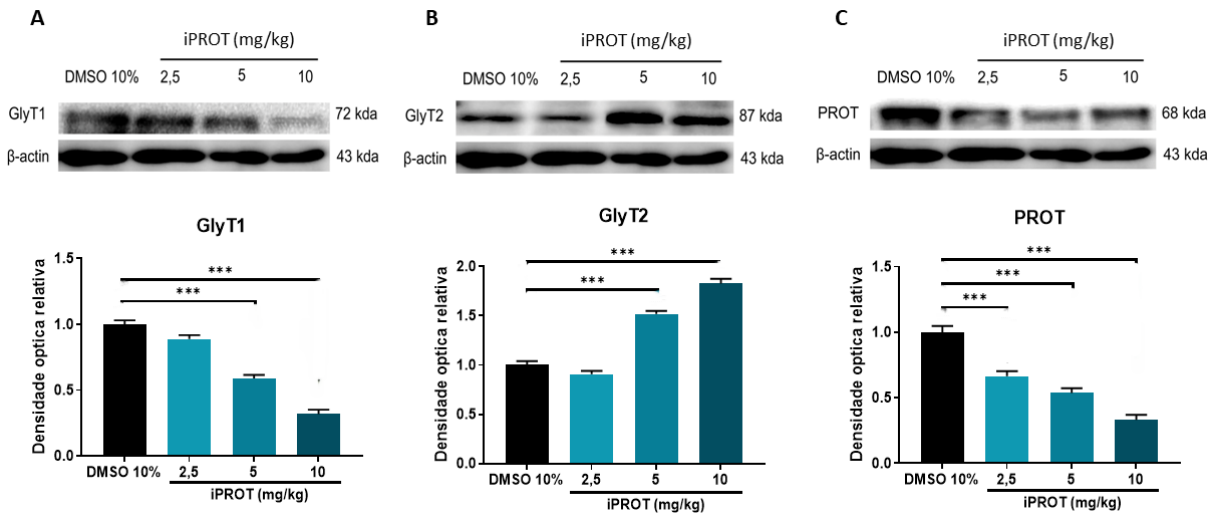
No intuito de desvendar o mecanismo por trás dos efeitos encontrados a partir da inibição de PROT e do fenômeno de neuroproteção, avaliamos a expressão de algumas proteínas chave na neurotransmissão glutamatérgica e da via do BDNF, fator importante quando se trata de neuroproteção e memória. Realizamos esta análise após 24h da administração IP do iPROT, nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg.

Primeiramente avaliamos a expressão das subunidades do receptor de NMDA. Constatamos que o tratamento com iPROT nas diferentes doses não alterou o conteúdo de GluN1 (**Figura 25A**), porém na subunidade GluN2A, foi capaz em todas as doses de aumentar sua expressão, 2,5mg/kg ( $1,28 \pm 0,04$ ), 5mg/kg ( $1,44 \pm 0,05$ ) e 10mg/kg ( $2,05 \pm 0,07$ ) em relação ao controle (**Figura 25B**). Já a subunidade GluN2B, apenas na dose de 10mg/kg ( $0,44 \pm 0,02$ ) teve sua expressão reduzida em relação ao controle (**Figura 25C**).



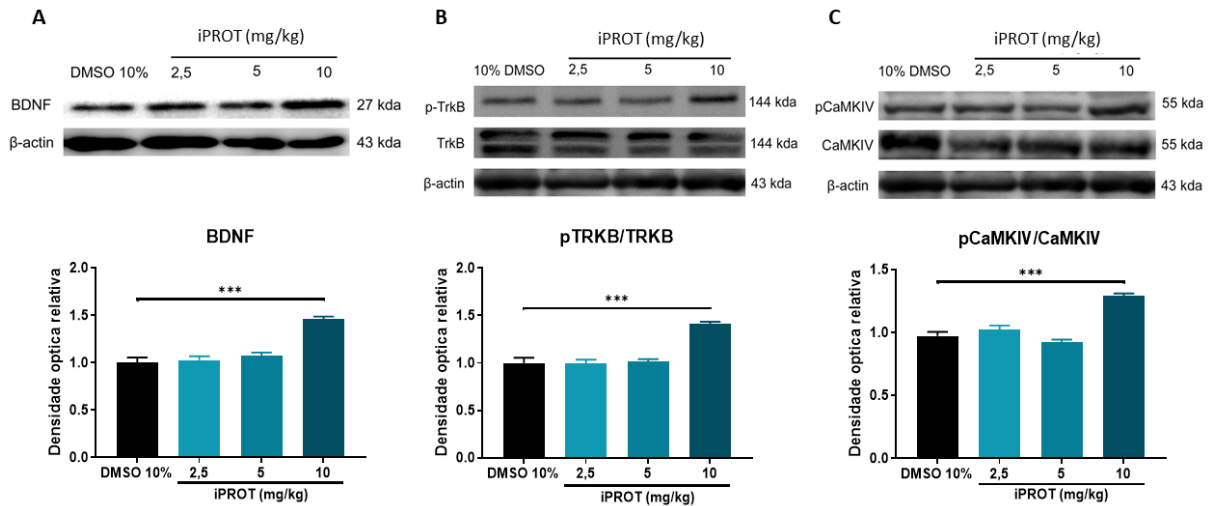
**Figura 25. Efeito de iPROT (24h) na expressão das subunidades do receptor de NMDA em hipocampo de camundongos C57BL/6.** **A.** Expressão relativa de GluN1. **B.** Expressão relativa de GluN2A. **C.** Expressão relativa de GluN2B. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, *one-way* ANOVA com pós teste Bonferroni, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ( $n = 4$ ).

Em seguida investigamos se a inibição de PROT impacta na expressão dos transportadores de glicina do tipo 1 (GlyT1) e do tipo 2 (GlyT2). Observamos que ao inibir PROT não só reduzimos a expressão deste transportador em todas as doses ( $0,66 \pm 0,03$ ;  $0,53 \pm 0,03$  e  $0,33 \pm 0,03$  respectivamente) (**Figura 26C**), mas também reduzimos a expressão de GlyT1 nas doses de 5mg/kg ( $0,58 \pm 0,02$ ) e 10mg/kg ( $0,31 \pm 0,03$ ) (**Figura 26A**). De maneira oposta a inibição de PROT levou ao aumento de GlyT2 nas doses de 5 mg/kg ( $1,52 \pm 0,02$ ) e 10mg/kg ( $1,82 \pm 0,04$ ) (**Figura 26B**).



**Figura 26. Efeito de iPROT (24h) na expressão de diferentes transportadores, GlyT1, GlyT2 e PROT em hipocampo de camundongos C57BL/6.** A. Expressão relativa de GlyT1. B. Expressão relativa de GlyT2. C. Expressão relativa de PROT. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, *one-way* ANOVA com pós teste Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$  (n=4).

Verificamos também se o mecanismo de neuroproteção observado no pré-tratamento com o iPROT estava relacionado com a via intracelular de BDNF e se a atividade de PROT está realmente vinculada às proteínas cálcio-calmodulina kinase (CaMK). Somente na maior dose vimos aumento na expressão de BDNF ( $1,46 \pm 0,02$ ) (**Figura 27A**) e da atividade do seu receptor o TrkB ( $1,41 \pm 0,02$ ) (**Figura 27B**). A CaMKIV ( $1,28 \pm 0,02$ ) (**Figura 27C**) por sua vez teve sua atividade aumentada somente na maior dose também.



**Figura 27. Efeito de iPROT (24h) na expressão de proteínas da via do BDNF em hipocampo de camundongos C57BL/6.** A. Expressão relativa do BDNF. B. Atividade relativa do TrkB. C. Atividade relativa da CaMKIV. Os valores estão representados por média  $\pm$  EPM, one-way ANOVA com pós teste Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$  ( $n=4$ ).

## 5. Discussão

No presente estudo, investigamos o papel da L-prolina no SNC, enfocando especialmente o papel do transportador de prolina PROT/Slc6a7 na modulação da neurotransmissão glutamatérgica. Além disso, examinamos como a inibição deste transportador pode contribuir para a neuroproteção contra a neurodegeneração induzida pela proteína beta-amiloide, abrindo perspectivas para a identificação de novos alvos terapêuticos e protótipos para Doença de Alzheimer.

Historicamente, o papel da L-prolina no SNC tem sido objeto de amplo debate. Sua função potencial como neurotransmissor e sua distribuição em diversas regiões encefálicas sugerem um papel especializado deste aminoácido (17-20, 22), caracterizado por ações excitatórias no sistema (29, 30). Em nossas análises iniciais, utilizando sinaptossomas corticais e hipocampais, observamos que em concentrações elevadas, induz aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular (**Figura 12**).

Em um estudo de Borg e colaboradores (1979) com culturas de neuroblastoma (neuronal e glial), foi observado que em concentrações de 1mM, a L-prolina aumentou a captação de  $Ca^{2+}$  nestas células (89). Com base nesses dados, infere-se que a L-prolina, em altas concentrações, pode competir com o glutamato sináptico ou atuar como moduladora,

resultando na excitação de neurônios pós-sinápticos e no aumento do influxo de cálcio intracelular.

Nos experimentos que realizamos com a administração intracerebroventricular (ICV) de L-prolina, observamos que doses baixas do aminoácido (0,5-1 $\mu$ M) induziram um estímulo modesto no sistema. Isso sugere que, em baixas concentrações, a L-prolina pode não ser suficiente para suplantiar o efeito excitatório predominante do glutamato, atuando mais como um agonista parcial. Essa inferência é suportada pelas evidências que indicam a atuação da L-prolina em sinapses excitatórias, funcionando como um agonista parcial de receptores NMDA, AMPA e cainato (29, 30, 48). Em contrapartida, estudos de Hamasu e colaboradores (2009, 2010) demonstraram que a injeção ICV de L-prolina (0,5, 1 e 2 $\mu$ M) resulta em efeitos sedativos e hipnóticos em pintainhos neonatos submetidos a estresse agudo (90, 91). Em nossos experimentos, observamos que em concentrações mais altas (2  $\mu$ M), houve uma diminuição nos padrões motores, como a distância total percorrida, número de cruzamentos e tempo de mobilidade no teste do campo aberto. Além disso, constatamos uma redução nos comportamentos exploratórios, como *rearing* e tempo de permanência no centro do aparato, bem como no número de *groomings* (**Figuras 13 e 14**). Importante ressaltar que o tratamento com L-prolina não induziu efeitos ansiogênicos nos animais, conforme avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado, que não mostrou diferenças significativas entre os grupos tratados e os controles (**Figura 15**).

A consideração de que a L-prolina pode funcionar como um transmissor levanta questões pertinentes, especialmente a ausência de um receptor específico para L-prolina no SNC. Contudo, existem transportadores que regulam seu equilíbrio no encéfalo. Pesquisas anteriores, como as de Cohen & Nadler (1997), Fremeau (1992) e Renick (1999), identificaram transportadores de prolina de alta afinidade no cérebro (17, 25, 32). Há pelo menos três transportadores de L-prolina, sendo que o transportador da família do gene *Slc6a7* (PROT) apresenta expressão mais restrita ao encefálo. Nossos resultados de PCR corroboram esses achados, mostrando a presença da expressão gênica *Slc6a7/PROT* no encéfalo, com uma expressão predominante, especialmente nas regiões do estriado, córtex e cerebelo (**Figura 16**). Adicionalmente, realizamos análise de *western-blot* para investigar a expressão da proteína PROT nessas regiões encefálicas, observando uma expressão elevada no estriado, córtex e hipocampo (**Figura 17**). Estes achados estão alinhados com o estudo de Schulz e colaboradores (2018), que também demonstraram a expressão de PROT nessas regiões (33).

A distribuição de PROT no SNC parece estar vinculada a regiões ricas em sinapses excitatórias, como o córtex e, particularmente, o hipocampo. Estudos de imuno-histoquímica

revelam que o PROT é expresso em subpopulações de neurônios em terminais pré-sinápticos, regulando o fluxo de L-prolina e sua liberação em terminais glutamatérgicos, assim como em pequenas vesículas sinápticas (32, 92). Portanto, o PROT emerge como um alvo molecular promissor para o desenvolvimento de novos compostos que possam modular a neurotransmissão glutamatérgica.

A pesquisa sobre a inibição do transportador de prolina PROT é relativamente recente, e a compreensão da dinâmica funcional deste transportador ainda está em desenvolvimento na literatura científica. Portanto, conduzimos experimentos com um inibidor de PROT (iPROT) para investigar seu papel no SNC. Nossos resultados de bioinformática estrutural indicam que o iPROT interage eficientemente com o PROT, exibindo uma interação estável e um score de energia livre favorável, compatível com um inibidor existente, o LX6171, outro inibidor o LQFM215 também interage com o PROT, porém de maneira mais fraca em relação aos outros (**Figura 18**). Outros inibidores, como o LX6171, foram desenvolvidos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, conforme demonstrado por Zipp e colaboradores (2014) (37), embora não tenham avançado para testes pré-clínicos ou clínicos. Da mesma forma, o LP403812 mostrou bons efeitos de inibição em cultura celular, mas também não progrediu além disso (36). Pesquisas recentes do nosso grupo com o inibidor de PROT, LQFM215, demonstraram resultados positivos em modelos murinos de isquemia cerebral e esquizofrenia (34, 35), o que é relevante dado que um desequilíbrio no conteúdo de L-prolina no SNC está associado a fenótipos de autismo e esquizofrenia (43-46).

Ao avaliar os efeitos da inibição de PROT, constatamos que o iPROT, mesmo em baixas concentrações, regula a disponibilidade de prolina na sinapse, embora não seja capaz de competir efetivamente com o glutamato. Os efeitos centrais de iPROT, nas concentrações mais altas (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) resultaram em aumento do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sugerindo que a função de PROT está ligada à sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como a ação da L-prolina (**Figura 19A-B**) (19, 42).

Em experimentos com animais C57BL/6 tratados com iPROT, observamos redução na atividade locomotora, evidenciada pela diminuição da distância total percorrida, do tempo de mobilidade e do número de cruzamentos, especialmente nas doses mais altas de 5 e 10 mg/kg. Também notamos alterações nos padrões exploratórios, como o tempo de permanência no centro (**Figura 20**). Importante ressaltar que o tratamento com iPROT não induziu efeitos ansiogênicos, como confirmado pelo teste do labirinto em cruz elevado, que não mostrou diferenças significativas entre os grupos (**Figura 21**). Esses resultados estão alinhados com estudos da literatura, como o de Schulz e colaboradores (2018), que demonstraram em

camundongos PROT-KO redução na atividade locomotora no teste do campo aberto, sem traduzir-se em comportamento depressivo ou ansioso, conforme avaliado em testes de nado forçado, suspensão pela cauda e labirinto zero (33). Pesquisas adicionais do nosso grupo com o LQFM215 mostraram que, além de inibir a atividade de PROT na captação de prolina em sinaptossomas, o tratamento com a maior dose de LQFM215 (10 mg/kg) também reduziu o padrão motor e exploratório dos animais, sem induzir comportamentos ansiosos ou depressivos, conforme avaliado nos testes de labirinto em cruz elevado e nado forçado (34, 35).

Em estudos anteriores, nosso grupo observou que tanto o pré-tratamento quanto o tratamento com um inibidor de PROT (LQFM215) ofereceram neuroproteção contra danos isquêmicos e reduziram sinais clínicos negativos em um modelo de psicose induzido por cetamina (34, 35). Neste estudo atual, testamos a capacidade do iPROT de conferir neuroproteção e promover melhora cognitiva em um modelo murino de neurodegeneração induzido por injeção intrahipocampal de proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Considerando a complexidade da neurodegeneração, que afeta primariamente os neurônios do SNC e resulta na perda progressiva de tecido neural devido à morte neuronal, com destaque para a prevalência da Doença de Alzheimer (52-54), novas abordagens terapêuticas são essenciais.

Definimos neuroproteção como a prevenção da morte celular neuronal, atuando sobre os processos que levam à disfunção e morte celular (93). Curiosamente ao analisar o padrão motor e comportamentos exploratórios de animais tratados com o iPROT no modelo de  $A\beta$ , observamos que a inibição foi capaz de aumentar (preservar) a mobilidade dos animais tratados em relação aos animais submetidos ao modelo sem tratamento, aumentando a distância total percorrida, o tempo de mobilidade e o número de cruzamentos, sem alterar padrões exploratórios como os tempos de permanência no centro e na periferia (**Figura 22**). Nosso experimento com pré-tratamento de 5 dias usando iPROT no modelo de  $A\beta$  demonstrou melhora no reconhecimento de novo objeto, um teste que avalia memória espacial, aprendizado e preferência pelo novo. Os animais pré-tratados com iPROT (5 e 10 mg/kg) mostraram melhor desempenho nesse teste comparado ao grupo controle (**Figura 23**). Além disso, o pré-tratamento preservou a perda de espinhas dendríticas na região CA1 do hipocampo, em ambas as doses testadas (**Figura 24**). As espinhas dendríticas são estruturas críticas para a comunicação sináptica e estão envolvidas na formação e extinção de memórias, processos conhecidos como potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD), os quais dependem em grande parte do aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (94). O iPROT,

ao preservar as espinhas dendríticas, apoia a manutenção das sinapses e, conseqüentemente, não prejudica a formação e extinção de memórias.

Investigamos também as vias relacionadas ao mecanismo de neuroproteção associado à inibição de PROT. Observamos aumento na expressão da subunidade do receptor NMDA GluN2A em todas as doses testadas (2,5, 5 e 10mg/kg), relacionado à neuroproteção e sobrevivência neuronal (64, 95-98), enquanto que a maior dose (10 mg/kg) reduziu a expressão da subunidade GluN2B, associada à neurotoxicidade e morte celular (97, 99, 100). A subunidade GluN1 não mostrou alteração em sua expressão (**Figura 25**). Estes resultados indicam que a inibição de PROT, além de seu papel nas sinapses excitatórias e na atuação em receptores NMDA, parece conferir propriedades neuroprotetoras.

Avaliamos também a expressão do transportador PROT, notando que sua inibição reduziu a expressão deste transportador em todas as doses testadas. Curiosamente, a inibição de PROT também afetou a expressão do transportador de glicina do tipo 1 (GlyT1), o que sugere que o iPROT pode não ser exclusivo para o PROT, afetando também outros transportadores da mesma família. Apesar disso, a inibição de GlyT1 está relacionada a mecanismos de neuroproteção (54, 64, 101). Em contrapartida, observamos aumento na expressão relativa do transportador de glicina do tipo 2 (GlyT2) nas doses de 5 e 10 mg/kg, possivelmente como um mecanismo compensatório devido à redução do GlyT1 (**Figura 26**).

Finalmente, investigamos a relação entre a expressão de BDNF e a atividade do seu receptor TrkB com o mecanismo de neuroproteção. A inibição de PROT resultou em um aumento da expressão de BDNF apenas na dose mais alta, assim como aumento na atividade de TrkB (**Figura 27A-B**). A via BDNF-TrkB está associada a vários mecanismos de neurogênese, plasticidade sináptica, crescimento dendrítico e estabilização da arborização dendrítica, além de processos de memória, aprendizado e sobrevivência neuronal (102-105).

Como identificado anteriormente, a atividade da L-prolina e de PROT está associada à sinalização de  $Ca^{2+}$  (19), bem como às proteínas quinase dependentes de  $Ca^{2+}$ , como as calmodulinas (CaMKII e CaMKIV) (42). Estas quinases são essenciais para o funcionamento encefálico, incluindo plasticidade sináptica, transmissão neuronal, desenvolvimento de circuitos e cognição. Em particular, as quinases CaMKII e CaMKIV são as mais estudadas em relação à função neuronal (106). Observamos que a inibição de PROT na concentração mais alta resultou em aumento da atividade de CaMKIV (**Figura 27C**), integrando-se assim ao mecanismo de neuroproteção investigado. Em contraste, o estudo de Schulz e colaboradores (2018) identificou redução da atividade de CaMKII em animais PROT-KO, destacando a importância dessas duas proteínas nas vias de neuroproteção e sobrevivência neuronal (33).

## 6. Conclusão

Neste estudo, exploramos o papel multifacetado da L-prolina no SNC, com foco particular no transportador de prolina PROT/Slc6a7 e seus efeitos na modulação da neurotransmissão glutamatérgica e neuroproteção em camundongos. Demonstramos que a L-prolina aumenta significativamente os níveis de cálcio intracelular em sinaptossomas. Esse fenômeno pode indicar uma interação competitiva da L-prolina com receptores glutamatérgicos, relevante para entender mecanismos de neurotransmissão e a neuroproteção no SNC. Além disso, nosso estudo proporcionou novas observações sobre os efeitos comportamentais da L-prolina em modelos animais. Observamos que doses maiores de L-prolina reduzem significativamente a mobilidade e os comportamentos exploratórios em camundongos, sem induzir efeitos ansiogênicos. Esses achados reforçam a complexidade dos efeitos neuromoduladores da L-prolina, que variam de acordo com a dose e o contexto.

A investigação sobre a expressão e distribuição do transportador PROT no encéfalo revelou que este é amplamente expresso em várias regiões cerebrais, incluindo o córtex, estriado e hipocampo. Esta ampla distribuição enfatiza o papel potencial do PROT na regulação da disponibilidade de L-prolina e, por extensão, na modulação da neurotransmissão glutamatérgica em regiões cerebrais. Adicionalmente, examinamos o potencial neuroprotetor do iPROT, um inibidor de PROT, em um modelo animal de neurodegeneração induzido por A $\beta$ . O pré-tratamento com iPROT resultou em melhorias significativas na cognição e na preservação de estruturas críticas para a comunicação sináptica, como as espinhas dendríticas. Esses resultados sugerem que a inibição de PROT pode ser uma estratégia terapêutica promissora para condições neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer.

Por fim, a análise dos efeitos do iPROT na expressão de proteínas-chave relacionadas à neurotransmissão glutamatérgica e à via do BDNF forneceu evidências adicionais de que a modulação de PROT pode influenciar diretamente vias neuroprotetoras e de plasticidade sináptica no encéfalo. Em resumo, este estudo amplia significativamente nossa compreensão do papel da L-prolina e do transportador PROT no SNC, oferecendo novas perspectivas sobre a modulação da neurotransmissão glutamatérgica e potenciais abordagens terapêuticas para doenças neurodegenerativas.

## 7. Referências

1. Wang B, Dudko OK. A theory of synaptic transmission. *Elife*. 2021;10.
2. Sudhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*. 2013;80(3):675-90.
3. Hall JE. Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica: Elsevier Health Sciences; 2021.
4. Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, Hashimoto Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 2012;76(1):70-81.
5. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(10):766-75.
6. Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*. 2008;27(11):2783-802.
7. Steinert JR, Robinson SW, Tong H, Hausteiner MD, Kopp-Scheinpflug C, Forsythe ID. Nitric oxide is an activity-dependent regulator of target neuron intrinsic excitability. *Neuron*. 2011;71(2):291-305.
8. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*: Artmed Editora; 2022.
9. Wyse AT, Netto CA. Behavioral and neurochemical effects of proline. *Metab Brain Dis*. 2011;26(3):159-72.
10. Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, Endo F. Inborn errors of proline metabolism. *J Nutr*. 2008;138(10):2016S-20S.
11. Clelland CL, Read LL, Baraldi AN, Bart CP, Pappas CA, Panek LJ, et al. Evidence for association of hyperprolinemia with schizophrenia and a measure of clinical outcome. *Schizophr Res*. 2011;131(1-3):139-45.
12. Bavaresco CS, Streck EL, Netto CA, Wyse AT. Chronic hyperprolinemia provokes a memory deficit in the Morris water maze task. *Metab Brain Dis*. 2005;20(1):73-80.
13. Baxter CF, Baldwin RA, Davis JL, Flood JF. High proline levels in the brains of mice as related to specific learning deficits. *Pharmacol Biochem Behav*. 1985;22(6):1053-9.
14. Davis JL, Pico RM, Flood JF. Differences in learning between hyperprolinemic mice and their congenic controls. *Behav Neural Biol*. 1987;48(1):128-37.
15. Sheffler ZM, Reddy V, Pillarisetty LS. *Physiology, Neurotransmitters*. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.
16. Rizo J. Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Sci*. 2018;27(8):1364-91.
17. Freneau RT, Jr., Caron MG, Blakely RD. Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transporter expressed in putative glutamatergic pathways of rat brain. *Neuron*. 1992;8(5):915-26.
18. Gogos JA, Santha M, Takacs Z, Beck KD, Luine V, Lucas LR, et al. The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nat Genet*. 1999;21(4):434-9.
19. Snyder SH, Young AB, Bennett JP, Mulder AH. Synaptic biochemistry of amino acids. *Fed Proc*. 1973;32(10):2039-47.
20. Yoneda Y, Roberts E. A new synaptosomal biosynthetic pathway of proline from ornithine and its negative feedback inhibition by proline. *Brain Res*. 1982;239(2):479-88.
21. Felix D, Kunzle H. Ionophoretic and autoradiographic studies on the role of proline in nervous transmission. *Pflugers Arch*. 1974;350(2):135-44.
22. Takemoto Y, Semba R. Immunohistochemical evidence for the localization of neurons containing the putative transmitter L-proline in rat brain. *Brain Res*. 2006;1073-1074:311-5.

23. Nadler JV, Wang A, Hakim A. Toxicity of L-proline toward rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1988;456(1):168-72.
24. Pinto MC, de Paiva MJ, Oliveira-Lima OC, Menezes HC, Cardeal Zde L, Gomez MV, et al. Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography-mass spectrometry method. *J Chem Neuroanat.* 2014;55:24-37.
25. Nadler JV, Bray SD, Evenson DA. Autoradiographic localization of proline uptake in excitatory hippocampal pathways. *Hippocampus.* 1992;2(3):269-78.
26. Nickolson VJ. "On" and "off" responses of K<sup>+</sup>-induced synaptosomal proline release: involvement of the sodium pump. *J Neurochem.* 1982;38(1):289-92.
27. Shafqat S, Velaz-Faircloth M, Henzi VA, Whitney KD, Yang-Feng TL, Seldin MF, et al. Human brain-specific L-proline transporter: molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of the gene in human and mouse genomes. *Mol Pharmacol.* 1995;48(2):219-29.
28. Cohen SM, Nadler JV. Proline-induced potentiation of glutamate transmission. *Brain Res.* 1997;761(2):271-82.
29. Henzi V, Reichling DB, Helm SW, MacDermott AB. L-proline activates glutamate and glycine receptors in cultured rat dorsal horn neurons. *Mol Pharmacol.* 1992;41(4):793-801.
30. Martin D, Ault B, Nadler JV. NMDA receptor-mediated depolarizing action of proline on CA1 pyramidal cells. *Eur J Pharmacol.* 1992;219(1):59-66.
31. Cohen SM, Nadler JV. Sodium-dependent proline and glutamate uptake by hippocampal synaptosomes during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997;100(2):230-3.
32. Renick SE, Kleven DT, Chan J, Stenius K, Milner TA, Pickel VM, et al. The mammalian brain high-affinity L-proline transporter is enriched preferentially in synaptic vesicles in a subpopulation of excitatory nerve terminals in rat forebrain. *J Neurosci.* 1999;19(1):21-33.
33. Schulz D, Morschel J, Schuster S, Eulenburg V, Gomeza J. Inactivation of the Mouse L-Proline Transporter PROT Alters Glutamatergic Synapse Biochemistry and Perturbs Behaviors Required to Respond to Environmental Changes. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:279.
34. Carvalho GA, Chiareli RA, Marques BL, Parreira RC, de Souza Gil E, de Carvalho FS, et al. L-proline transporter inhibitor (LQFM215) promotes neuroprotection in ischemic stroke. *Pharmacol Rep.* 2023;75(2):276-92.
35. Carvalho GA, Chiareli RA, Pedrazzi JFC, Silva-Amaral D, da Rocha ALB, Oliveira-Lima OC, et al. Novel Proline Transporter Inhibitor (LQFM215) Presents Antipsychotic Effect in Ketamine Model of Schizophrenia. *Neurochem Res.* 2023.
36. Yu XC, Zhang W, Oldham A, Buxton E, Patel S, Nghi N, et al. Discovery and characterization of potent small molecule inhibitors of the high affinity proline transporter. *Neurosci Lett.* 2009;451(3):212-6.
37. Zipp GG, Barbosa J, Green MA, Terranova KM, Fink C, Yu XC, et al. Novel inhibitors of the high-affinity L-proline transporter as potential therapeutic agents for the treatment of cognitive disorders. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(16):3886-90.
38. Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):197-219.
39. Velaz-Faircloth M, Guadano-Ferraz A, Henzi VA, Fremeau RT, Jr. Mammalian brain-specific L-proline transporter. Neuronal localization of mRNA and enrichment of transporter protein in synaptic plasma membranes. *J Biol Chem.* 1995;270(26):15755-61.
40. Ponten F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas--a tool for pathology. *J Pathol.* 2008;216(4):387-93.

41. Sjostedt E, Zhong W, Fagerberg L, Karlsson M, Mitsios N, Adori C, et al. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science*. 2020;367(6482).
42. Jayanthi LD, Wilson JJ, Montalvo J, DeFelice LJ. Differential regulation of mammalian brain-specific proline transporter by calcium and calcium-dependent protein kinases. *Br J Pharmacol*. 2000;129(3):465-70.
43. Hedges DJ, Hamilton-Nelson KL, Sacharow SJ, Nations L, Beecham GW, Kozhekbaeva ZM, et al. Evidence of novel fine-scale structural variation at autism spectrum disorder candidate loci. *Mol Autism*. 2012;3:2.
44. Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*. 2011;474(7351):380-4.
45. Wen Z, Nguyen HN, Guo Z, Lalli MA, Wang X, Su Y, et al. Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. *Nature*. 2014;515(7527):414-8.
46. Vincent M, Collet C, Verloes A, Lambert L, Herlin C, Blanchet C, et al. Large deletions encompassing the TCOF1 and CAMK2A genes are responsible for Treacher Collins syndrome with intellectual disability. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(1):52-6.
47. Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, Furukawa H, Menniti FS, Sobolevsky AI, et al. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol Rev*. 2021;73(4):298-487.
48. Ault B, Wang CM, Yawn BC. L-proline depolarizes rat spinal motoneurons by an excitatory amino acid antagonist-sensitive mechanism. *British journal of pharmacology*. 1987;92(2):319.
49. Ge Y, Wang YT. GluN2B-containing NMDARs in the mammalian brain: pharmacology, physiology, and pathology. *Front Mol Neurosci*. 2023;16:1190324.
50. Li QQ, Chen J, Hu P, Jia M, Sun JH, Feng HY, et al. Enhancing GluN2A-type NMDA receptors impairs long-term synaptic plasticity and learning and memory. *Mol Psychiatry*. 2022;27(8):3468-78.
51. Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA*. 2019;322(16):1589-99.
52. Agrawal M, Biswas A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Front Mol Biosci*. 2015;2:54.
53. Sheikh S, Safia, Haque E, Mir SS. Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *J Neurodegener Dis*. 2013;2013:563481.
54. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2020.
55. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*. 2013;9(1):63-75 e2.
56. Joe E, Ringman JM. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention. *BMJ*. 2019;367:l6217.
57. Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016;388(10043):505-17.
58. Zhao QF, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, et al. The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2016;190:264-71.
59. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-6.
60. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):595-608.
61. Verma M, Lizama BN, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Transl Neurodegener*. 2022;11(1):3.

62. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409-21.
63. Falco AD, Cukierman DS, Hauser-Davis RA, Rey NA. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Química Nova*. 2016;39:63-80.
64. Pinto MC, Lima IV, da Costa FL, Rosa DV, Mendes-Goulart VA, Resende RR, et al. Glycine transporters type 1 inhibitor promotes brain preconditioning against NMDA-induced excitotoxicity. *Neuropharmacology*. 2015;89:274-81.
65. Pinto MC, Mourao FA, Binda NS, Leite HR, Gomez MV, Massensini AR, et al. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning. *Neurochem Int*. 2012;61(5):713-20.
66. Pinto MC, Simao F, da Costa FL, Rosa DV, de Paiva MJ, Resende RR, et al. Sarcosine preconditioning induces ischemic tolerance against global cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2014;271:160-9.
67. Deiana S, Hauber W, Munster A, Sommer S, Ferger B, Marti A, et al. Pro-cognitive effects of the GlyT1 inhibitor Bitopertin in rodents. *Eur J Pharmacol*. 2022;935:175306.
68. Umbricht D, Alberati D, Martin-Facklam M, Borroni E, Youssef EA, Ostland M, et al. Effect of bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, on negative symptoms of schizophrenia: a randomized, double-blind, proof-of-concept study. *JAMA Psychiatry*. 2014;71(6):637-46.
69. Wunderlich G, Blahova Z, Garcia M, Jessen F. Efficacy and safety of the novel GlyT1 inhibitor BI 425809 in Alzheimer's dementia: a randomized controlled trial. *Alzheimers Res Ther*. 2023;15(1):24.
70. UniProt C. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D523-D31.
71. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W296-W303.
72. Krivak R, Hoksza D. P2Rank: machine learning based tool for rapid and accurate prediction of ligand binding sites from protein structure. *J Cheminform*. 2018;10(1):39.
73. Jakubec D, Skoda P, Krivak R, Novotny M, Hoksza D. PrankWeb 3: accelerated ligand-binding site predictions for experimental and modelled protein structures. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(W1):W593-W7.
74. Jendele L, Krivak R, Skoda P, Novotny M, Hoksza D. PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W345-W9.
75. Shivakumar D, Williams J, Wu Y, Damm W, Shelley J, Sherman W. Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *J Chem Theory Comput*. 2010;6(5):1509-19.
76. Shelley JC, Chollet A, Frye LL, Greenwood JR, Timlin MR, Uchimaya M. Epik: a software program for pK( a ) prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J Comput Aided Mol Des*. 2007;21(12):681-91.
77. Guedes IA, Barreto AMS, Marinho D, Krempser E, Kuenemann MA, Sperandio O, et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. *Sci Rep*. 2021;11(1):3198.
78. Guedes IA, da Silva MMP, Galheigo M, Krempser E, de Magalhães CS, Barbosa HJC, et al. DockThor-VS: A Free Platform for Receptor-Ligand Virtual Screening. *Journal of Molecular Biology*. 2024:168548.
79. Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017;14(11):1037-53.

80. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.
81. Ahmad F, Liu P. Synaptosome as a tool in Alzheimer's disease research. *Brain Res*. 2020;1746:147009.
82. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. The open field test. Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests. 2009:1-20.
83. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21(6):801-10.
84. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*. 2017(126).
85. Broer S, Gether U. The solute carrier 6 family of transporters. *Br J Pharmacol*. 2012;167(2):256-78.
86. Hagglund MG, Hellsten SV, Bagchi S, Ljungdahl A, Nilsson VC, Winnergren S, et al. Characterization of the transporter B0AT3 (Slc6a17) in the rodent central nervous system. *BMC Neurosci*. 2013;14:54.
87. Takanaga H, Mackenzie B, Suzuki Y, Hediger MA. Identification of mammalian proline transporter SIT1 (SLC6A20) with characteristics of classical system imino. *J Biol Chem*. 2005;280(10):8974-84.
88. Brown P, Wagner T, Frazier K, Walke D, Wilson A, Heydorn W, et al., editors. LX6171: A novel potential treatment for cognitive disorders. 60th Annual Meeting, Am Acad Neurol, Chicago; 2008.
89. Borg J, Mark J, Mandel P. Effects of amino acids on calcium uptake by glial and neuroblastoma cells. *J Neurobiol*. 1979;10(1):31-40.
90. Hamasu K, Haraguchi T, Kabuki Y, Adachi N, Tomonaga S, Sato H, et al. L-proline is a sedative regulator of acute stress in the brain of neonatal chicks. *Amino Acids*. 2009;37(2):377-82.
91. Hamasu K, Shigemi K, Tsuneyoshi Y, Yamane H, Sato H, Denbow DM, 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*. 2010;38(1):57-64.
92. Crump FT, Fremeau RT, Craig AM. Localization of the brain-specific high-affinity l-proline transporter in cultured hippocampal neurons: molecular heterogeneity of synaptic terminals. *Mol Cell Neurosci*. 1999;13(1):25-39.
93. Farooqui AA. *Neuroinflammation, Resolution, and Neuroprotection in the Brain*: Academic Press; 2021.
94. Segal M. Dendritic spines: Morphological building blocks of memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;138:3-9.
95. Anastasio NC, Xia Y, O'Connor ZR, Johnson KM. Differential role of N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in mediating phencyclidine-induced perinatal neuronal apoptosis and behavioral deficits. *Neuroscience*. 2009;163(4):1181-91.
96. DeRidder MN, Simon MJ, Siman R, Auberson YP, Raghupathi R, Meaney DF. Traumatic mechanical injury to the hippocampus in vitro causes regional caspase-3 and calpain activation that is influenced by NMDA receptor subunit composition. *Neurobiol Dis*. 2006;22(1):165-76.
97. Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2007;27(11):2846-57.

98. Hu R, Chen J, Lujan B, Lei R, Zhang M, Wang Z, et al. Glycine triggers a non-ionotropic activity of GluN2A-containing NMDA receptors to confer neuroprotection. *Sci Rep.* 2016;6:34459.
99. Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY, et al. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke.* 2008;39(11):3042-8.
100. Ning K, Pei L, Liao M, Liu B, Zhang Y, Jiang W, et al. Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *J Neurosci.* 2004;24(16):4052-60.
101. Huang B, Xie Q, Lu X, Qian T, Li S, Zhu R, et al. GlyT1 Inhibitor NFPS Exerts Neuroprotection via GlyR Alpha1 Subunit in the Rat Model of Transient Focal Cerebral Ischaemia and Reperfusion. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(5):1952-62.
102. Chen T, Wu Y, Wang Y, Zhu J, Chu H, Kong L, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Increases Synaptic Protein Levels via the MAPK/Erk Signaling Pathway and Nrf2/Trx Axis Following the Transplantation of Neural Stem Cells in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res.* 2017;42(11):3073-83.
103. Leal G, Bramham CR, Duarte CB. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitam Horm.* 2017;104:153-95.
104. Orefice LL, Waterhouse EG, Partridge JG, Lalchandani RR, Vicini S, Xu B. Distinct roles for somatically and dendritically synthesized brain-derived neurotrophic factor in morphogenesis of dendritic spines. *J Neurosci.* 2013;33(28):11618-32.
105. Wu CH, Chen CC, Hung TH, Chuang YC, Chao M, Shyue SK, et al. Activation of TrkB/Akt signaling by a TrkB receptor agonist improves long-term histological and functional outcomes in experimental intracerebral hemorrhage. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):53.
106. Salaciak K, Koszalka A, Zmudzka E, Pytka K. The Calcium/Calmodulin-Dependent Kinases II and IV as Therapeutic Targets in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9).

## **8. Anexos**



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



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Estudo de novos compostos sintéticos para descoberta de novas drogas nootrópicas e neuroprotetoras**", registrada com o protocolo nº **042/19**, sob a responsabilidade de **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), em reunião de 04/11/2019.

- Finalidade: ( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 04/11/2019 a 305/11/2024
- Espécie/linhagem/raça: camundongos das linhagens Swiss, C57BL/6, APP/PS1, 3Xtg e VAchT
- Nº de animais autorizados: 910 animais
- Peso/Idade: 25-50 gramas/6-12 semanas
- Sexo: machos
- Origem (fornecedor): Os animais C57bl6 serão fornecidos pelo biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP da Universidade Federal de Goiás.  
Os animais *knock out* da linhagem VAchT foram doados pelo Prof. Dr. Marco Antônio Máximo Prado do Robarts Research Institute.  
Os animais transgênicos da linhagem 3xTg-AD foram doados pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Oliveira Pinheiro da Universidade Federal de Minas Gerais.  
Os animais transgênicos da linhagem APP/PS1 foram doados pelo Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto da Universidade de São Paulo.



Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFPG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.  
Email: [ceua.ufg@gmail.com](mailto:ceua.ufg@gmail.com)



## L-proline transporter inhibitor (LQFM215) promotes neuroprotection in ischemic stroke

Gustavo Almeida Carvalho<sup>1</sup> · Raphaela Almeida Chiareli<sup>1</sup> · Bruno Lemes Marques<sup>1</sup> · Ricardo Cambraia Parreira<sup>1</sup> · Eric de Souza Gil<sup>2</sup> · Flávio Silva de Carvalho<sup>2</sup> · André Luís Batista da Rocha<sup>2</sup> · Rafaela Ribeiro Silva<sup>3</sup> · François Noël<sup>3</sup> · Boniek Gontijo Vaz<sup>4</sup> · Luciano Morais Lião<sup>4</sup> · Shabir Ahmad<sup>5</sup> · Hugo Verli<sup>5</sup> · Ricardo Menegatti<sup>2</sup> · Mauro Cunha Xavier Pinto<sup>1,6</sup>

Received: 1 October 2022 / Revised: 12 January 2023 / Accepted: 13 January 2023 / Published online: 31 January 2023  
© The Author(s) under exclusive licence to Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences 2023

### Abstract

**Background** L-proline transporter (PROT/SLC6A7) is closely associated with glutamatergic neurotransmission, where L-proline modulates the NMDA receptor (NMDAR) function. NMDAR-mediated excitotoxicity is a primary cause of neuronal death following stroke, which is triggered by the uncontrolled release of glutamate during the ischemic process. After ischemic stroke, L-proline levels show a reduction in the plasma, but high circulating levels of this molecule indicate good functional recovery. This work aimed to produce new PROT inhibitors and explore their effects on ischemic stroke.

**Methods** Initially, we built a three-dimensional model of the PROT protein and run a molecular docking with the newly designed compounds (LQFM215, LQFM216, and LQFM217). Then, we synthesized new PROT inhibitors by molecular hybridization, and proline uptake was measured in *ex vivo* and *in vivo* models. The behavioral characterization of the treated mice was performed by the open-field test, elevated plus-maze, Y-maze, and forced swimming test. We used the permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) model to study the ischemic stroke damage and analyzed the motor impairment with limb clasping or cylinder tests.

**Results** LQFM215 inhibited proline uptake in hippocampal synaptosomes, and the LQFM215 treatment reduced proline levels in the mouse hippocampus. LQFM215 reduced the locomotor and exploratory activity in mice and did not show any anxiety-related or working memory impairments. In the MCAO model, LQFM215 pre-treatment and treatment reduced the infarcted area and reduced motor impairments in the cylinder test and limb clasping.

**Conclusions** This dataset suggests that the new compounds inhibit cerebral L-proline uptake and that LQFM215 promotes neuroprotection and neuro-repair in the acute ischemic stroke model.

✉ Mauro Cunha Xavier Pinto  
pintomcx@ufg.br

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>4</sup> Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

<sup>5</sup> Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>6</sup> Departamento de Farmacologia, Laboratório de Neuroquímica e Neurofarmacologia, Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Esperança, S/N, UFG, Prédio ICB II, Sala 114, Goiânia, GO 74690-900, Brazil

Springer



## Novel Proline Transporter Inhibitor (LQFM215) Presents Antipsychotic Effect in Ketamine Model of Schizophrenia

Gustavo Almeida Carvalho<sup>1</sup> · Raphaela Almeida Chiareli<sup>1</sup> · João Francisco Cordeiro Pedrazzi<sup>2</sup> · Danyelle Silva-Amaral<sup>2</sup> · André Luís Batista da Rocha<sup>3</sup> · Onésia Cristina Oliveira-Lima<sup>1</sup> · Luciano Morais Lião<sup>3</sup> · Elaine Maria de Souza-Fagundes<sup>4</sup> · Stefan Schildknecht<sup>5</sup> · Marcel Leist<sup>6</sup> · Elaine Aparecida Del-Bel<sup>2</sup> · Renato Santiago Gomez<sup>7</sup> · Alexander Birbrair<sup>8</sup> · Ricardo Menegatti<sup>3</sup> · Mauro Cunha Xavier Pinto<sup>1</sup>

Received: 2 July 2023 / Revised: 13 August 2023 / Accepted: 17 August 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

### Abstract

The glutamatergic hypothesis of schizophrenia suggests a correlation between NMDA receptor hypofunction and negative psychotic symptoms. It has been observed that the expression of the proline transporter (PROT) in the central nervous system (CNS) is associated with glutamatergic neurotransmission, as L-proline has the capacity to activate and modulate AMPA and NMDA receptors. In this study, we aimed to investigate whether inhibition of proline transporters could enhance glutamatergic neurotransmission and potentially exhibit antipsychotic effects in an experimental schizophrenia model. Using molecular dynamics analysis *in silico*, we validated an innovative PROT inhibitor, LQFM215. We quantified the cytotoxicity of LQFM215 in the Lund human mesencephalic cell line (LUHMES). Subsequently, we employed the ketamine-induced psychosis model to evaluate the antipsychotic potential of the inhibitor, employing behavioral tests including open-field, three-chamber interaction, and prepulse inhibition (PPI). Our results demonstrate that LQFM215, at pharmacologically active concentrations, exhibited negligible neurotoxicity when astrocytes were co-cultured with neurons. In the ketamine-induced psychosis model, LQFM215 effectively reduced hyperlocomotion and enhanced social interaction in a three-chamber social approach task across all administered doses. Moreover, the compound successfully prevented the ketamine-induced disruption of sensorimotor gating in the PPI test at all tested doses. Overall, these findings suggest that PROT inhibition could serve as a potential therapeutic target for managing symptoms of schizophrenia model.

**Keywords** Schizophrenia · Glutamatergic neurotransmission · Drug discovery · Target validation · SLC family transporters · SLC6A7

### Abbreviations

AMPA  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid  
AU Arbitrary units

CEUA Animal Ethics Committee  
CNS Central nervous system  
DMEM/F12 Dulbecco's modified Eagle's medium/  
Ham's nutrient mixture F-12

✉ Mauro Cunha Xavier Pinto  
pintomcx@gmail.com

<sup>1</sup> Laboratório de Neuroquímica e Neurofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, S/N, UFG, Prédio ICB II, Sala 114, Goiânia, GO 74690-900, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

<sup>4</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>5</sup> Faculty of Life Sciences, Albstadt-Sigmaringen University, 72488 Sigmaringen, Germany

<sup>6</sup> In Vitro Toxicology and Biomedicine, Doerenkamp-Zbinden Foundation, University of Konstanz, Konstanz, Germany

<sup>7</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>8</sup> Department of Dermatology, Medical Sciences Center, University of Wisconsin-Madison, Rm 4385, 1300 University Avenue, Madison, WI 53706, USA

Published online: 09 September 2023

Springer

## *In silico* evidence of bitopertin's broad interactions within the SLC6 transporter family

Gustavo Almeida de Carvalho<sup>1,✉</sup>, Paul Magogo Tambwe<sup>1</sup>, Lucas Rodrigues Couto Nascimento<sup>1</sup>, Bruna Kelly Pedrosa Campos<sup>1</sup>, Raphaela Almeida Chiareli<sup>1</sup>, Guilhermino Pereira Nunes Junior<sup>1</sup>, Ricardo Menegatti<sup>2</sup>, Renato Santiago Gomez<sup>3</sup> and Mauro Cunha Xavier Pinto<sup>1,\*,✉</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, CEP 74690-900, Goiânia-GO, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Rua 240, Setor Leste Universitário, 74605170 - Goiânia, GO, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte-MG, Brazil

\*Correspondence: Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, Laboratório de Neuroquímica e Neurofarmacologia, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, S/N, UFG, Prédio ICB II, Sala 114. Goiânia-GO, 74690-900, Brazil. E-mail: [pintomcx@gmail.com](mailto:pintomcx@gmail.com)

### Abstract

The Glycine Transporter Type 1 (GlyT1) significantly impacts central nervous system functions, influencing glycinergic and glutamatergic neurotransmission. Bitopertin, the first GlyT1 inhibitor in clinical trials, was developed for schizophrenia treatment but showed limited efficacy. Despite this, bitopertin's repositioning could advance treating various pathologies. This study aims to understand bitopertin's mechanism of action using computational methods, exploring off-target effects, and providing a comprehensive pharmacological profile. Similarity Ensemble Approach (SEA) and SwissTargetPrediction initially predicted targets, followed by molecular modeling on SWISS-MODEL and GalaxyWeb servers. Binding sites were identified using PrankWeb, and molecular docking was performed with DockThor and GOLD software. Molecular dynamics analyses were conducted on the Visual Dynamics platform. Reverse screening on SEA and SwissTargetPrediction identified GlyT1 (SLC6A9), GlyT2 (SLC6A5), PROT (SLC6A7), and DAT (SLC6A3) as potential bitopertin targets. Homology modeling on SwissModel generated high-resolution models, optimized further on GalaxyWeb. PrankWeb identified similar binding sites in GlyT1, GlyT2, PROT, and DAT, indicating potential interaction. Docking studies suggested bitopertin's interaction with GlyT1 and proximity to GlyT2 and PROT. Molecular dynamics confirmed docking results, highlighting bitopertin's target stability beyond GlyT1. The study concludes that bitopertin potentially interacts with multiple SLC6 family targets, indicating a broader pharmacological property.

**Keywords:** SLC6 transporter family; GlyT1; transporter inhibitors; molecular docking and chemoinformatics

### Introduction

The Solute Carrier Family 6 (SLC6) transporters is integral to synaptic neurotransmission regulation, encompassing a diverse range of sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporters [1]. This family includes transporters for monoamines (such as dopamine, serotonin, norepinephrine), amino acids (notably glycine and  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)), and osmolytes (like taurine and creatine) [2]. Characterized by their symport mechanism, these transporters utilize the cotransport of sodium and chloride ions to actively transport neurotransmitters against their concentration gradients. The functional efficacy of SLC6 transporters is critical in maintaining neurotransmitter homeostasis, which influences neuronal signaling, synaptic plasticity, and overall brain functionality [1, 2]. Dysregulation of these transporters is implicated in various neurological and psychiatric disorders, including depression, anxiety, Alzheimer's disease, and schizophrenia, positioning them as prime targets for neuropharmacological interventions.

Within this family of transporters, the Glycine Transporter Type 1 (GlyT1), also referred to as SLC6A9, is of particular importance [2]. Predominantly located at the synaptic cleft,

GlyT1 is responsible for the reuptake of glycine, serving a crucial role in neurotransmission by regulating the availability of glycine to post-synaptic glycine receptors (GlyR) and modulating NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor activity [3]. This modulation is essential for cognitive processes, including learning and memory, highlighting the potential of GlyT1 activity modulation as a therapeutic strategy for disorders characterized by excitatory–inhibitory imbalances.

The distribution of GlyTs is determined by the roles of L-glycine in either inhibitory or excitatory neurotransmission. GlyT1 mRNA expression is notably high in glial cells within regions such as the hypothalamus, thalamus, diencephalon, retina, olfactory bulb, and cortex. Additionally, GlyT1 is prominently expressed near glutamatergic terminals, including the neocortex and hippocampus. Conversely, GlyT2 is predominantly expressed in the spinal cord, brainstem, and cerebellum, areas linked with inhibitory neurotransmission. It is especially pronounced in the dorsal and ventral horns of the spinal cord, the nuclei of cranial nerves, and the auditory system [4].

The stoichiometry of GlyT1 and GlyT2 indicates functional distinctions: GlyT1 uses two sodium ions to transport

Received: January 12, 2024. Editorial Acceptance: April 16, 2024

© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of the Royal Pharmaceutical Society. All rights reserved. For commercial re-use, please contact [reprints@oup.com](mailto:reprints@oup.com) for reprints and translation rights for reprints. All other permissions can be obtained through our RightsLink service via the Permissions link on the article page on our site—for further information please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com).