UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Efeitos comportamentais distintos induzidos por dois
moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA_A
contendo a subunidade α_5 : avaliação de diferenças sexuais**

Aluna: Adriana de Jesus de Souza

Orientador: Felipe Villela Gomes

Ribeirão Preto

2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

ADRIANA DE JESUS DE SOUZA

**Efeitos comportamentais distintos induzidos por dois moduladores
alostéricos positivos dos receptores GABA_A contendo a
subunidade α_5 : avaliação de diferenças sexuais**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para
obtenção do grau de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Felipe Villela Gomes

Ribeirão Preto

2021

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade de aloj o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP(BDTD)

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER
MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA,
DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Souza, Adriana Jesus

Efeitos comportamentais distintos induzidos por dois moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA_A contendo a subunidade $\alpha 5$: avaliação de diferenças sexuais/ Adriana de Jesus de Souza; orientador: Felipe Villela Gomes – Ribeirão Preto, 2021.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2021.

1. Moduladores alostéricos positivos. 2. GABA_A- $\alpha 5$ 3. Esquizofrenia 4. Ansiedade 5.

Depressão

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SOUZA, Adriana Jesus

Título: Efeitos comportamentais distintos induzidos por dois moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA_A contendo a subunidade α_5 : avaliação de diferenças sexuais

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do grau de Mestre
em Ciências. Área de concentração:
Farmacologia.

Aprovado em: ____ / ____ / 2021

Banca examinadora

Prof. Dr.: Felipe Villela Gomes: FMRP – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra.: Christie Ramos Andrade Leite Panissi- FFCLRP- USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Cilene Lino de Oliveira- UFSC

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a Geraldo
Eustaquio Almeida, por sempre
me incentivar a ir além e sempre
torcer por mim”

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Almina Maria de Jesus por sempre me apoiar. Você é mãe, pai e família pra mim. Minha admiração por você é inexplicável. Se um dia eu me tornar metade do que você é, estarei completamente realizada.

A minha irmã, Adriele de Jesus de Souza pelo amor incondicional. Sou grata ao universo por ter me permitido dividir uma vida -e um útero- com você. Sem seu apoio jamais conseguiria.

Aos meus grandes amigos, Francisco de Jesus e Nicolas de Jesus por todo o amor e carinho incondicional. Obrigada por cuidarem de mim.

Ao meu padrasto, Geraldo Eustaquio Almeida por sempre me incentivar e mostrar a importância da educação na minha vida. Você ainda vive em cada lembrança feliz.

Ao meu pai, Valdemar Pereira de Souza, meus tios Lilia Maria, Manoel Albado, minha avó Ermerita Maria e meu grande amigo Dino de Jesus, por todo o carinho e apoio e por nunca me deixarem esquecer minhas raízes.

Aos meus amigos de Brasília, Luís Guilherme Carvalho, Amanda Sanfilippo, Luiza Mesquita, Gabriela Jaccoud, Helena Ipê, Letícia Carvalho. Obrigada por continuarem sempre presentes na minha vida. Vocês são essenciais na minha caminhada.

Aos amigos de Ribeirão Preto, Thamyris Santos-Silva, Caio Lopes e Rayanne Poletti. Obrigada pela rede de apoio e carinho que formamos aqui. Sem vocês seria impossível.

A minha família em Ribeirão, Vitor de Almeida Aurélio, Luciana Aurélio, Pedro Aurélio e Livia Aurélio. Obrigada por sempre me acolherem com tanto carinho e por todos os momentos felizes que vocês me proporcionam.

Ao meu orientador Felipe Villela Gomes, pela confiança em me aceitar como sua primeira aluna de mestrado. Obrigada pela paciência, apoio, oportunidades e ensinamentos. Por tornar essa caminhada mais leve e bem humorada. Por me mostrar que tudo pode ser resolvido com calma e sabedoria. Te admiro e te levo como exemplo.

Aos meus professores da Universidade de Brasília, Márcia Renata Mortari, Fábio Viegas Caixeta, Thomas William e Christina Vinson por terem sido grandes inspirações que me levaram a seguir este caminho.

Aos meus amigos de laboratório Isadora Cortez, Nicole Rodrigues, Thamyris Santos-Silva, Débora Akemi, Andreza Cavichioli e Matheus Braga pela imensa ajuda, conselhos, paciência e discussões científicas durante esse tempo.

Ao professor Dr. Francisco Guimarães pelas oportunidades, ensinamentos, acolhimento e por ter aberto as portas do seu laboratório dando fundamental apoio para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Fernando Padovan, pela colaboração inicial e por ter cedido gentilmente o espaço do seu laboratório para que eu trabalhasse e aos demais membros do seu laboratório, Rayanne Poletti e Lívea Godoy por me acolherem.

Ao professor Dr. James Cook pela colaboração e aos demais membros envolvidos Guanguan Li, Yenus Mian e Dishary Sharmin do Departamento de Bioquímica da Universidade de Wisconsin, EUA.

Aos professores Dr. Leonardo Resstel, Dra. Elaine Del-Bell, Dra. Sâmia Joca por me permitirem realizar parte do meu trabalho em seus laboratórios. A professora Dra. Alline Campos pelo auxílio como assessora. A professora Dra. Sabrina Lisboa e a Dra.

Heloísa Vilela pelos conselhos e discussões científicas durante meu exame de qualificação.

A João Pedrazzi, Luana Domingues e Amanda Sales pela disponibilidade, atenção, auxílio e colaboração no decorrer deste trabalho.

Ao apoio dos técnicos de laboratório por auxiliarem com suas habilidades. Aos funcionários dos biotérios do Departamento de Farmacologia da FMRP, pelo cuidado e respeito que dedicam aos animais do biotério. A todos os funcionários do Depto. de Farmacologia pela competência, disponibilidade e atenção.

Aos membros da banca, Christie Ramos Andrade Leite Panissi e Cilene Lino de Oliveira pela disponibilidade, atenção, auxílio e colaboração na finalização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) pelo apoio financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio.

“Enquanto a vida vale,
seja luz desse dia cinzento”
(Emicida)

RESUMO

SOUZA, A. J. Efeitos comportamentais distintos induzidos por dois moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA_A contendo a subunidade α_5 : avaliação de diferenças sexuais. 2021. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2021.

Várias evidências apontam para uma alteração no balanço excitatório-inibitório em diferentes transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão, a ansiedade e a esquizofrenia. Essas alterações parecem ser decorrentes da perda funcional de interneurônios GABAérgicos expressando parvalbumina (PV) e, consequentemente, em uma disfunção no balanço excitatório-inibitório com uma atividade aumentada de neurônios glutamatérgicos piramidais. Sugere-se que drogas capazes de atenuar as alterações no balanço excitatório-inibitório possam ser eficazes no tratamento de transtornos psiquiátricos. Os moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA_A contendo a subunidade α_5 (GABA_A- α_5) têm recebido cada vez mais atenção, uma vez que este receptor está presente nos neurônios glutamatérgicos piramidais, com distribuição relativamente alta e restrita no hipocampo, podendo modular a atividade potencialmente aumentada desses neurônios em condições caracterizadas por alterações no balanço excitatório-inibitório. A nossa hipótese é que o GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH₃, dois moduladores alostérico positivos dos receptores GABA_A- α_5 , produzem efeitos comportamentais em testes preditivos para o efeito de psicofármacos. Assim, nós avaliamos as propriedades antipsicóticas, ansiolíticas, e antidepressivas do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH₃, bem como seus efeitos sobre a extinção do medo condicionado. Também foi avaliado se os efeitos dessas drogas envolvem diferenças sexuais. Para isso, camundongos C57 machos e fêmeas foram submetidos a testes comportamentais para avaliação das propriedades ansiolíticas

como o labirinto em cruz elevado (LCE), antidepressivas como o teste do nado forçado (FST) e da supressão alimentar pela novidade (NSF), sobre a resposta emocional condicionada contextual e propriedades antipsicóticas avaliando o efeito desses compostos sobre o prejuízo no teste de inibição pelo pré-pulso (PPI) e na hiperlocomoção induzida pelo antagonista dos receptores NMDA MK-801. Também foi avaliado se esses compostos alteram a atividade locomotora e a coordenação motora (rotarod) e produzem efeitos reforçadores positivos (preferência condicionada ao lugar). Foi observado um aumento na exploração nos braços abertos no LCE (efeito tipo-ansiolítico), uma diminuição na latência para comer no NSF e uma diminuição do tempo de imobilidade no FST 30 minutos e 24 horas após administração (efeito tipo-antidepressivo) em machos e fêmeas tratados com GL-II-73. Além disso, houve uma atenuação no prejuízo no teste de PPI e na hiperlocomoção induzidos pelo MK-801 apenas em machos (efeito tipo-antipsicótico). No entanto, o GL-II-73 aumentou a atividade locomotora e induziu prejuízos no PPI em machos e retardou o processo de aprendizagem de extinção da memória aversiva em machos e fêmeas. Por outro lado, o SH-053-2'F-R-CH3, em machos, aumentou a exploração nos braços abertos no LCE (efeito tipo-ansiolítico) e facilitou a extinção da memória aversiva. Em fêmeas o SH-053-2'F-R-CH3 atenuou a hiperlocomoção e preveniu os prejuízos no PPI causados pelo MK-801 (efeito tipo-antipsicótico). Nenhum dos compostos produziu efeitos reforçadores positivos e alterações na coordenação motora. Nossos resultados sugerem que a modulação alostérica positiva de receptores GABA_A- α_5 pode representar uma nova abordagem terapêutica para transtornos psiquiátricos, incluindo efeitos do tipo antidepressivos, ansiolíticos e antipsicóticos, embora diferenças sexuais possam existir.

Palavras-chave: GL-II-73, SH-053-2'F-R-CH3, GABA_A, balanço excitatório-inibitório, ansiedade, depressão, esquizofrenia.

ABSTRACT

SOUZA, A. J. Distinct sex-dependent behavioral responses induced by two positive allosteric modulators of alpha 5 subunit-containing GABA_A receptors. 2021. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2021.

Dysregulation of the GABAergic neurotransmission in the brain, which may lead to an abnormal excitatory-inhibitory balance, has been long implicated in depression, anxiety, and schizophrenia. Alpha 5 subunit-containing GABA_A receptors (α_5 -GABA_AR), expressed mainly in pyramidal neurons in the hippocampus, have been proposed as a potential target to treat these psychiatric disorders and, due to its selective expression, without inducing the typical side effects of benzodiazepines. Here, we evaluated the changes induced by GL-II-73 and SH-053-2'F-R-CH₃, two positive allosteric modulators of α_5 -GABA_AR in behavioral tests used to screen psychoactive drugs. The effects of acute GL-II-73 and SH-053-2'F-R-CH₃ (1, 5, and 10 mg/kg) administration were tested in male and female C57BL6 mice exposed to the elevated plus-maze (EPM, "anxiety"), forced swim test (FST) and novelty-suppressed feeding (NSF, "depression"), MK-801-induced hyperlocomotion and prepulse inhibition (PPI) disruption ("schizophrenia"), conditioned fear, conditioned place-preference (CPP, "rewarding effects"), rotarod ("motor coordination") and open-field ("locomotor activity"). In males and females, GL-II-73 increased the exploration of the open arms of the EPM (an anxiolytic-like effect), decreased the immobility in the FST 30 min and 24 h after its administration (suggestive of a rapid and long-lasting antidepressant-like effect) and reduced the latency to bite the food pellet in the NSF. GL-II-73 also attenuated MK-801-induced hyperlocomotion and PPI deficits (an antipsychotic-like

effect) in males but not females. However, GL-II-73 *per se* increased locomotor activity and impaired fear memory extinction in males and females and impaired PPI in males. On the other hand, SH-053-2'F-R-CH3 induced anxiolytic-like effects in the EPM and facilitated fear extinction in male without inducing changes in the FST, PPI, and locomotor activity. SH-053-2'F-R-CH3 also attenuated MK-801-induced hyperlocomotion and PPI deficits in females but not in males. Neither of these drugs induced rewarding effects and motor coordination impairment. These findings support continued preclinical research regarding the usefulness of GL-II-73 and SH-053-2'F-R-CH3 as antipsychotic, antidepressant and anxiolytic, in a sex-dependent manner.

Key-words: GL-II-73, SH-053-2'F-R-CH3, GABA_A receptors, excitatory-inhibitory balance, depression, anxiety, schizophrenia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição das subunidades α do receptor GABA _A no cérebro de camundongos adultos	22
Figura 2- Desenho experimental para avaliar os efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 no teste de medo condicionado ao contexto	38
Figura 3- Desenho experimental para avaliar os efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre o prejuízo no PPI e na hiperlocomoção induzidos pelo MK-801 no teste de medo condicionado ao contexto	37
Figure 4- Desenho experimental para avaliar os efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 no teste preferência condicionada ao lugar (CPP)	38
Figura 5- Efeitos do GL-II-73 no LCE	42
Figura 6- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 GL-II-73 no LCE	43
Figura 7- Efeitos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3 no teste de nado forçado 30 minutos após a administração desses compostos	44
Figura 8- Efeitos do GL-II-73 no teste de nado forçado 24 e 72 horas após sua administração	45
Figura 9- Efeitos do GL-II-73 no teste de supressão alimentar pela novidade	46
Figura 10- Efeitos do GL-II-73 sobre a resposta emocional condicionada contextual em machos	48
Figura 11- Efeitos do GL-II-73 sobre a resposta emocional condicionada contextual fêmeas	50
Figura 12- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a resposta emocional condicionada contextual em machos	52
Figura 13- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a resposta emocional condicionada contextual em fêmeas	53

Figura 14- Efeitos do GL-II-73 no teste de PPI	54
Figura 15- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 no teste de PPI	55
Figura 16- Efeitos do GL-II-73 sobre o prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801	57
Figura 17- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 sobre o prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801	58
Figura 18- Efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre a atividade locomotora 30 minutos após a administração	60
Figura 19- Efeitos do GL-II-73 sobre a atividade locomotora 24 e 72 horas após sua administração	61
Figure 20- Efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre a hiperlocomoção induzida pelo MK-801	63
Figure 21- Efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 no teste preferência condicionada ao lugar	64
Figure 22- Efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 no teste de rotarod	65

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	19
1.1. NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS	19
1.2. RECEPTOR GABA _A	21
1.3. DROGAS QUE INTERAGEM COM RECEPTORES GABA _A CONTENDO A SUBUNIDADE A ₅	24
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. OBJETIVOS GERAIS	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. ANIMAIS	30
3.2. DROGAS	30
3.3. TESTES COMPORTAMENTAIS PREDITIVOS PARA O EFEITO DE PSICOFÁRMACOS ...	31
3.3.1. <i>Labirinto em cruz elevado (LCE)</i>	31
3.3.2. <i>Teste do nado forçado</i>	31
3.3.3. <i>Supressão da alimentação pela novidade</i>	32
3.3.4. <i>Medo condicionado ao contexto</i>	33
3.3.5. <i>Teste de inibição pelo pré-pulso</i>	33
3.3.6. <i>Teste de atividade locomotora no campo aberto</i>	34
3.3.7. <i>Preferência condicionada ao lugar</i>	35
3.3.8. <i>Rotarod</i>	36
3.4. EXPERIMENTOS	36
3.4.1. <i>Experimento 1: Avaliação das propriedades ansiolíticas e antidepressivas do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3</i>	37

3.4.2.	<i>Experimento 2: Avaliação dos efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre a expressão e extinção da memória emocional condicionada contextual</i>	37
3.4.3.	<i>Experimento 3: Avaliação das propriedades antipsicóticas do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3</i>	38
3.4.4.	<i>Experimento 4: Avaliação dos efeitos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a coordenação motora e se produz efeitos reforçadores positivos em um protocolo de preferência condicionada ao lugar</i>	39
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4.	RESULTADOS:	41
4.1.	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANSIOLÍTICAS E ANTIDEPRESSIVAS DO GL-II-73 E DO SH-053-2'F-R-CH3.....	41
4.1.1.	<i>Labirinto em cruz elevado</i>	41
4.1.2.	<i>Nado Forçado</i>	44
4.1.3.	<i>Supressão da alimentação pela novidade</i>	45
4.2.	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GL-II-73 E DO SH-053-2'F-R-CH3 SOBRE A EXPRESSÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA EMOCIONAL CONDICIONADA CONTEXTUAL.....	46
4.2.1.	<i>Medo condicionado</i>	46
4.3.	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIPSICÓTICAS DO GL-II-73 E DO SH-053-2'F-R-CH3.....	53
4.3.1.	<i>PPI</i>	53
4.3.2.	<i>Prejuízo no PPI induzido pelo MK-801</i>	56
4.3.3.	<i>Atividade locomotora em campo aberto</i>	59
4.3.4.	<i>Hiperlocomção induzida por MK-801</i>	61

4.4. EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GL-II-73 E DO SH-053-2'F-R-CH3 SOBRE A COORDENAÇÃO MOTORA E SE PRODUZ EFEITOS REFORÇADORES POSITIVOS EM UM PROTOCOLO DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR	63
4.4.1. <i>Preferência condicionada ao lugar</i>	63
4.4.2. <i>Rotarod</i>	64
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

I. INTRODUÇÃO

1.1. Neurotransmissão GABAérgica e transtornos psiquiátricos

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório presente no sistema nervoso central (RUDOLPH; MÖHLER, 2014) exercendo seus efeitos através da ativação de duas classes distintas de receptores, os receptores ionotrópicos GABA_A e os metabotrópicos GABA_B (SIGEL; ERNST, 2018). Interneurônios GABAérgicos estão presentes em diferentes regiões cerebrais, representando entre 20 e 40% de todos os neurônios dependendo da região do cérebro (DONEGAN; BOLEY; YAMAGUCHI; TONEY *et al.*, 2019; FRITSCHY; MOHLER, 1995), e são conhecidos por modular a neurotransmissão excitatória de vários sistemas neuronais (MCKERNAN; WHITING, 1996). A atividade de neurônios glutamatérgicos piramidais é usualmente modulada por diferentes subtipos de interneurônios GABAérgicos que expressam neuropeptídeos diferentes, como a somatostatina (SST), o peptídeo vasoativo intestinal (VIP; do inglês *vasoactive intestinal peptide*), ou a proteína de ligação ao cálcio parvalbumina (PV) (JACOB, 2019). Por exemplo, interneurônios GABAérgicos PV-positivos fazem sinapse com o corpo celular e/ou os segmentos iniciais dos axônios de neurônios glutamatérgicos piramidais, modulando a atividade dessas células através de uma rede celular capaz de sincronizar o estado excitatório de grande número de neurônios piramidais (BENHAM; ENGIN; RUDOLPH, 2014). Essa modulação resulta em um balanço excitatório-inibitório que parece ser crucial para o controle temporal preciso sobre a informação que flui através desses neurônios e a sincronização da atividade de alguns circuitos neurais (GRACE; GOMES, 2019).

Alterações no balanço excitatório-inibitório são descritas em diferentes transtornos psiquiátricos, incluindo os transtornos de ansiedade, a depressão e a esquizofrenia (PREVOT; LI; COOK; SIBILLE, 2019). Evidências *post-mortem* sugerem níveis reduzidos da enzima glutamato descarboxilase 67 (GAD67), responsável pela síntese de GABA, na esquizofrenia (CURLEY; ARION; VOLK; ASAFU-ADJEI *et al.*, 2011), apontando para uma possível redução na neurotransmissão inibitória no cérebro de pacientes com esse transtorno (JACOB, 2019). Além disso, pacientes com esquizofrenia apresentam uma perda funcional de interneurônios GABAérgicos PV-positivos no córtex pré-frontal e no hipocampo (BEASLEY; REYNOLDS, 1997; ZHANG; REYNOLDS, 2002). Em pacientes com esquizofrenia, enquanto a perda funcional de interneurônios PV no córtex pré-frontal tem sido associada com o prejuízo cognitivo, principalmente na memória de trabalho (LEWIS; CURLEY; GLAUSIER; VOLK, 2012), no hipocampo a disfunção desses interneurônios parece resultar em hiperatividade hipocampal (HECKERS; KONRADI, 2015).

Alterações nos níveis e na sinalização de GABA, são também relatadas na depressão e em transtornos de ansiedade (PREVOT; LI; VIDOJEVIC; MISQUITTA *et al.*, 2019). Em humanos, estudos de *binding* revelaram déficits de receptores GABA no cérebro de pacientes com transtornos de ansiedade ou depressão (LUSCHER; SHEN; SAHIR, 2011). Há também estudos demonstrando níveis reduzidos de GABA no plasma (PETTY; SCHLESSER, 1981) e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com depressão (GERNER; HARE, 1981). Esse fenótipo neuroquímico é ainda consistente com alterações na atividade e diminuição de marcadores de interneurônios GABAérgicos observados principalmente no córtex pré-frontal dorsolateral de pacientes com depressão (FEE; BANASR; SIBILLE, 2017; HASLER; VAN DER VEEN; TUMONIS; MEYERS *et al.*, 2007). Curiosamente, alterações na

neurotransmissão GABAérgica parecem ser mais pronunciadas em pacientes com depressão severa ou resistente ao tratamento com antidepressivos (PRICE; SHUNGU; MAO; NESTADT *et al.*, 2009; SANACORA; GUEORGUIEVA; EPPERSON; WU *et al.*, 2004). Juntas, essas evidências indicam que, além da esquizofrenia, alterações no balanço excitatório-inibitório também estão presentes na depressão e em transtornos de ansiedade. Dessa forma, drogas com potencial para atenuar alterações no balanço excitatório-inibitório podem ser alternativas uteis no tratamento desses transtornos psiquiátricos.

1.2. Receptor GABA_A

Um alvo para regulação da disfunção no balanço excitatório-inibitório é a modulação da atividade potencialmente aumentada dos neurônios piramidais. Uma maneira pela qual os interneurônios GABAérgicos modulam a função de neurônios piramidais e, conseqüentemente, o balanço excitatório-inibitório é através da ativação de receptores GABA_A presentes nesses neurônios glutamatérgicos.

O receptor GABA_A é um canal iônico heteropentamérico composto por diferentes tipos de subunidades (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , σ , ρ_{1-3} e ϵ) (MCKERNAN; WHITING, 1996). Mudanças ou substituições dessas subunidades podem resultar em respostas farmacológicas variáveis do receptor. Por exemplo, foi observado que receptores GABA_A sem as subunidades γ_2 são pelo menos cinco vezes mais sensíveis ao GABA (BOWERY; SMART, 2006). Cada receptor possui cinco subunidades dispostas para formar um canal que, após sua ativação, permite o influxo de íons cloreto (Cl^-) através da membrana celular, resultando em inibição neuronal (NUTT, 2006). Além de permitir o fluxo de cloreto, os receptores GABA_A possuem locais de ligação para drogas, incluindo barbitúricos, hipnóticos, anestésicos gerais, relaxantes musculares, neuro

esteroides e álcool (ERNST; BRUCKNER; BORESCH; SIEGHART, 2005). Eles também são conhecidos como elementos chave no controle de estados de ansiedade com base na atividade ansiolítica dos benzodiazepínicos (CLAYTON; POE; RALLAPALLI; BIAWAT *et al.*, 2015). Os benzodiazepínicos atuam como moduladores alostéricos positivos em receptores GABA_A que contêm as subunidades α_1 , α_2 , α_3 ou α_5 (CLAYTON; POE; RALLAPALLI; BIAWAT *et al.*, 2015), sendo o sítio benzodiazepínico localizado entre as subunidades α e γ .

Estudos com animais geneticamente modificados indicam que diferentes subunidades α mediarão respostas farmacológicas distintas produzidas pelos benzodiazepínicos. Enquanto as propriedades ansiolíticas dos benzodiazepínicos são mediadas predominantemente pelos receptores GABA_A que contêm as subunidades α_2 (SMITH; ENGIN; MELONI; RUDOLPH, 2012) e α_5 (BEHLKE; FOSTER; LIU; BENKE *et al.*, 2016), subunidade α_1 parece mediar os efeitos sedativos, anticonvulsivantes, de indução de amnésia anterógrada e dependência (OLSEN; SIEGHART, 2008). Enquanto a expressão dos receptores GABA_A contendo as subunidades α_1 , α_2 e α_3 é amplamente distribuída em diferentes estruturas cerebrais, a expressão do receptor GABA_A contendo a subunidade α_5 parece ser restrita ao hipocampo e córtex pré-frontal (MOHAMAD; HAS, 2019) (Figura 1).

Figura 1- Distribuição das subunidades α do receptor GABA_A no cérebro de camundongos adultos. Os painéis mostram o padrão de expressão das subunidades α_1 , α_2 , α_3 , α_4 e α_5 do receptor GABA_A no cérebro de camundongos. Cores “quentes” (amarelo, laranja e vermelho) indicam maiores níveis de expressão e cores “frias” indicam a ausência ou a baixa expressão. Podemos observar que a subunidade α_5 é expressa principalmente no hipocampo e em algumas regiões corticais (Imagem adaptada de (FRITSCHY; PANZANELLI, 2014)).

Assim, de uma forma geral, os receptores GABA_A apresentam diferentes composições de subunidades, com localizações em distintas áreas do cérebro e diferentes respostas a moduladores, agonistas e antagonistas (STELL; MODY, 2002). Logo, identificar e projetar agonistas e moduladores com maior seletividade para receptores GABA_A contendo subunidade específicas pode resultar em melhor eficácia e tolerabilidade no tratamento farmacológico de determinados transtornos psiquiátricos.

1.3. Drogas que interagem com receptores GABA_A contendo a subunidade α_5

É sugerido que drogas que modulam seletivamente a atividade de receptores GABA_A contendo a subunidade α_5 (GABA_A- α_5) atenuam comportamentos tipo-ansiosos e tipo-depressivos em modelos animais de depressão baseados na exposição crônica à estressores e também prejuízos cognitivos e no estado hiperdopaminérgico observados em modelos animais de esquizofrenia (GILL; LODGE; COOK; ARAS *et al.*, 2011; PIANTADOSI; FRENCH; POE; TIMIĆ *et al.*, 2016). Como descrito anteriormente, a expressão do receptor GABA_A contendo a subunidade α_5 parece ser restrita ao hipocampo (MOHAMAD; HAS, 2019), compreendendo quase 25% de todos receptores GABA_A hipocámpais (CARAISCOS; ELLIOTT; YOU-TEN; CHENG *et al.*, 2004). Receptores GABA_A- α_5 também estão expressos, em menor quantidade, no córtex pré-frontal (MOHAMAD; HAS, 2019). Em roedores, a expressão da subunidade α_5 é particularmente elevada em neurônios piramidais no hipocampo e nas camadas profundas do neocórtex, particularmente no córtex pré-frontal, e baixa em todo o resto do cérebro (FRITSCHY; MOHLER, 1995).

Foi demonstrado que receptores GABA_A- α_5 são capazes de regular a frequência de disparo de neurônios piramidais e a atividade coordenada oscilatória (SEMYANOV; WALKER; KULLMANN; SILVER, 2004), contribuindo na modulação do balanço excitatório-inibitório e com potencial para regular a atividade potencialmente aumentada de neurônios piramidais em condições nas quais existem alterações no balanço excitatório-inibitório, como parece ocorrer em diferentes transtornos psiquiátricos. Além disso, foi demonstrado que a supressão da subunidade α_5 em animais geneticamente modificados produz comprometimentos que recapitulam sintomas positivos da esquizofrenia e déficits no teste de inibição pelo pré-pulso

(GERDIKOV; RUDOLPH; KEIST; MÖHLER *et al.*, 2008; HAUSER; RUDOLPH; KEIST; MÖHLER *et al.*, 2005). Isto sugere que receptores GABA_A- α_5 podem ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento de transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia, depressão e transtornos de ansiedade (PIANTADOSI; FRENCH; POE; TIMIĆ *et al.*, 2016), e, devido a extensão da sua expressão ser limitada, a modulação da sua atividade pode estar associado a uma menor propensão para indução de efeitos colaterais indesejados. Uma gama de compostos foi testada e projetada para modular a atividade de receptores GABA_A- α_5 . Foi relatado que, em humanos, agonistas não seletivos prejudicaram a cognição (SAVIĆ; OBRADOVIĆ; UGRESIĆ; BOKONJIĆ, 2005), enquanto alguns agonistas inversos não seletivos produziram efeito tipo-ansiolítico (ATAK, 2010). No entanto, moduladores alostéricos positivos (PAMs) e moduladores alostéricos negativos (NAMs), que agem sobre o sítio benzodiazepínico (BZ) de receptores GABA_A- α_5 , alterando a conformação do receptor (CLAYTON; POE; RALLAPALLI; BIAWAT *et al.*, 2015), já se mostraram importantes na expressão da resposta emocional condicionada e forneceram evidências adicionais para o envolvimento do hipocampo no aprendizado e na ansiedade (LI; CAO; ZHANG; FURTMUELLER *et al.*, 2003), sem produzir efeitos ansiolíticos e pro-convulsivantes, sendo considerados compostos promissores para o tratamento de alguns transtornos psiquiátricos.

O GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH₃ são moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA_A- α_5 , desenvolvidos pelo grupo do Prof. James Cook, do Departamento de Química e Bioquímica, da Universidade de Wisconsin-Milwaukee, Milwaukee, Wisconsin, EUA, sintetizados com base em uma estrutura IBZD (um híbrido BZ-imidazol) (PREVOT; LI; VIDOJEVIC; MISQUITTA *et al.*, 2019). As amidas são comumente usadas como substitutos para melhorar a estabilidade metabólica e

a biodisponibilidade (STAMENIĆ; POE; REHMAN; SANTRAČ *et al.*, 2016). Esses ligantes IBZD amida foram projetados com afinidade de ligação preferencial aumentada por receptores GABA_A- α_5 . O GL-II-73 foi preparado a partir do SH-053-2'F-R-CH₃. Estudos em camundongos indicam que a meia vida do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH₃ no plasma é de cerca de 72 minutos e no cérebro de 70 a 146 minutos (PIANTADOSI; FRENCH; POE; TIMIĆ *et al.*, 2016; PREVOT; LI; VIDOJEVIC; MISQUITTA *et al.*, 2019).

O SH-053-2'F-R-CH₃ já demonstrou reverter a hiperativação do sistema dopaminérgico em modelo animal de esquizofrenia baseado em alteração do neurodesenvolvimento (GILL; LODGE; COOK; ARAS *et al.*, 2011) além de reduzir os comportamentos induzidos por estresse em camundongos fêmeas, mas não em machos demonstrando um possível efeito dependente do sexo (PIANTADOSI; FRENCH; POE; TIMIĆ *et al.*, 2016). Por outro lado, GL-II-73 já demonstrou reverter os déficits de memória operacional espacial induzidos pela exposição a estresse crônico, possíveis propriedades ansiolíticas e antidepressivas e reverter déficits de memória de trabalho relacionados à idade em camundongos machos (PREVOT; LI; VIDOJEVIC; MISQUITTA *et al.*, 2019; PREVOT; SUMITOMO; TOMODA; KNUTSON *et al.*, 2020).

Acredita-se então que moduladores positivos dos receptores GABA_A- α_5 , podem compensar a perda/disfunção de interneurônios e a potencial atividade aumentada de neurônios piramidais e, então, ter um efeito benéfico em transtornos nos quais a disfunção no balanço excitatório-inibitório está presente. Entretanto, é possível que essas drogas produzam efeitos comportamentais mesmo na ausência de alterações no balanço excitatório-inibitório.

A nossa hipótese é que o GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH₃, dois moduladores alostérico positivos dos receptores GABA_A- α_5 , produzem efeitos comportamentais em testes preditivos para psicofármacos. Assim, este trabalho se propõe a investigar o perfil farmacológico do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH₃, avaliando suas possíveis propriedades antipsicóticas, ansiolíticas, antidepressivas e sobre a expressão da resposta emocional condicionada. Também será investigado se diferenças sexuais podem influenciar nos efeitos dessas drogas, uma vez que diferenças sexuais estão implicadas na incidência de alguns transtornos psiquiátricos e na resposta farmacoterapêutica (WELLMAN; BANGASSER; BOLLINGER; COUTELLIER *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar as propriedades ansiolíticas, antidepressivas, antipsicóticas e sobre a expressão da resposta emocional condicionada do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH₃, dois moduladores alostéricos positivos de receptores GABA_A- α_5 , em testes comportamentais preditivos para drogas com essas propriedades.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar se a administração aguda de GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH₃ é capaz induzir efeitos tipo-ansiolíticos e antidepressivos nos testes do labirinto em cruz elevado (LCE), teste do nado forçado (FST) e teste de supressão da alimentação pela novidade (NSF).
- Avaliar os efeitos da administração aguda de GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH₃ sobre a expressão e a extinção da resposta emocional condicionada no modelo do medo condicionado ao contexto.
- Avaliar os efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH₃ sobre a atividade locomotora basal e sobre o filtro sensorio-motor no teste de inibição pelo pré-pulso (PPI). Também será testado se o GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH₃ é capaz de atenuar a hiperlocomoção e o prejuízo no teste de PPI induzidos pelo MK-801, um antagonista de receptores NMDA. A atenuação das alterações induzidas pelo MK-801 representa um potencial indicativo de propriedade antipsicótica.

- Avaliar se a administração aguda de GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 altera a coordenação motora, avaliada no teste de rotarod, e produz efeitos reforçadores positivos em um protocolo de preferência condicionada ao lugar.
- Avaliar possíveis diferenças sexuais nos efeitos induzidos pelo GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos C57BL6 machos e fêmeas, com 6 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da USP em Ribeirão Preto foram utilizados. Os animais permaneceram no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) em gaiolas micro-isoladas, em uma sala com temperatura controlada (24 ± 1 ° C), sob luz de 12h ciclo (luzes acesas às 6h30) com comida e água *ad libitum*. CEUA/FMRP 070/2020.

3.2. Drogas:

- GL-II-73 (sintetizado pelo grupo do Prof. James Cook, *University of Wisconsin Milwaukee, EUA*) utilizado nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg. Veículo: 2% Tween 80% em salina. As doses foram baseadas em trabalhos anteriores (PREVOT; LI; VIDOJEVIC; MISQUITTA *et al.*, 2019).
- SH-053-2'F-R-CH3 (sintetizado pelo grupo do Prof. James Cook, *University of Wisconsin Milwaukee, EUA*) utilizado nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg. Veículo: 2% Tween 80 em salina. Utilizou-se doses iguais às do GL-II-73.
- MK-801 (Sigma, EUA), em salina, nas doses de 0,25 mg/kg, para indução de hiperlocomção, ou 0,5 mg/kg, para indução de prejuízo no teste de PPI (doses baseadas em Cortez, 2018).
- Morfina (Sigma, EUA) em salina na dose de 20 mg/kg, como controle positivo no teste de preferência condicionada ao lugar (dose baseada em Silva, 2020).
- Diazepam (Sigma, EUA) em salina na dose 10 mg/kg, como controle positivo no rotarod (dose baseada em Silva, 2020).

3.3. Testes comportamentais preditivos para o efeito de psicofármacos

3.3.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é um dos testes mais amplamente utilizados no estudo de comportamentos relacionados a ansiedade. Este consiste em um labirinto elevado a 50cm do solo, com dois braços abertos (30 x 5 cm) perpendiculares a dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) (Figura 2). A exploração dos braços abertos (frequência de entradas e o tempo gasto) é utilizado como parâmetro associado a ansiedade. No teste, os animais foram colocados no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados, e exploraram o aparato livremente por 5 minutos. A porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos, bem como o número total de entradas nos braços fechados (utilizado como índice de atividade locomotora) foram registrados com o auxílio do software Any-maze (Stoelting).

3.3.2. Teste do nado forçado

Amplamente utilizado e de elevada validade preditiva, o teste do nado forçado (FST; do inglês *forced swim test*) foi desenvolvido baseado na observação de que animais expostos a um cilindro com água, na impossibilidade de sair, assumem uma postura imóvel (realizando apenas pequenos movimentos para auxiliar na flutuação) após um período de comportamento de escape. Especificamente, drogas com propriedades antidepressivas reduzem o tempo de imobilidade dos animais no teste (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). No FST, os camundongos foram colocados individualmente em um cilindro de vidro (17 cm de diâmetro e 25 cm de altura)

contendo água (a 23-25 °C) até 10 cm de altura, onde permaneceram por 6 minutos, sendo que nos 4 últimos minutos foi contabilizado o tempo de imobilidade.

3.3.3. Supressão da alimentação pela novidade

O teste da supressão da alimentação pela novidade (NSF; do inglês *novelty-suppressed feeding*) é baseado na observação da relação inversa entre emocionalidade e o tempo para que um roedor sob privação alimentar busque comida em um ambiente novo e aversivo (BODNOFF; SURANYI-CADOTTE; QUIRION; MEANEY, 1989). Nesse teste é medida a latência de um camundongo para consumir alimentos colocados no meio de uma arena aversiva bem iluminada. Para o teste, os camundongos foram privados de comida por 24 horas. O teste foi realizado em uma caixa transparente (40 x 40 x 20 cm) contendo aproximadamente dois cm de serragem cobrindo a base da caixa, uma plataforma central contendo um único pellet de ração e com iluminação focada na plataforma com a ração. Os animais foram colocados na caixa individualmente e a latência para que animal iniciasse o consumo da ração foi medida. Só se considerou que o animal começou a comer se este permaneceu alimentando-se na plataforma central após 10 segundos da primeira mordida. Foi utilizado como tempo máximo de teste (cut-off) 10 minutos. Para descartar a hipótese de que os compostos alteram o consumo de comida, após o teste os animais foram reposicionados em uma caixa de permanência e a latência para o início do consumo de um pellet de ração foi mensurado. Neste modelo, uma vez que os roedores apresentam aversão etológica a locais centrais e iluminados, espera-se que o tratamento agudo com drogas com propriedades antidepressivas diminua a latência para que o animal inicie o consumo da ração.

3.3.4. Medo condicionado ao contexto

No teste do medo condicionado ao contexto, os animais antecipam uma ameaça, associando um ambiente a situações aversivas. O animal é colocado em um ambiente neutro durante alguns minutos e depois apresentado a um estímulo aversivo (choque nas patas) (FENDT; FANSELOW, 1999). O animal passa, então, a associar o ambiente (contexto) onde ele recebe o choque nas patas ao estímulo aversivo. Com a reexposição ao estímulo condicionado contextual, ocorre uma antecipação da resposta de medo demonstrando uma associação entre os eventos. Esta resposta pode ser caracterizada por congelamento (*freezing*), a principal variável dependente em estudos que investigam a expressão e a extinção da memória aversiva (NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000), que quando disfuncionais podem resultar em transtornos psiquiátricos, como transtornos de ansiedade e de estresse pós-traumático. No protocolo utilizado, os animais foram colocados em uma caixa (32 x 20 x 21 cm) com assoalho capaz de deflagrar choques durante 5 minutos onde, após 90 segundos, 3 choques inescapáveis, f, foram deflagrados nas patas. O tempo de congelamento foi quantificado. Um dia após o condicionamento, os animais passaram pela extinção, sendo reexpostos a caixa durante 20 minutos sem a apresentação de choque nas patas. O tempo de congelamento foi avaliado a cada 5 minutos. No dia 3, foi realizado o teste com a exposição do animal a caixa por 5 minutos, sem choques, e o tempo de congelamento foi avaliado.

3.3.5. Teste de inibição pelo pré-pulso

O teste de PPI (do inglês *prepulse inhibition*) oferece uma medida operacional do filtro sensorio-motor refletida pela capacidade de inibição de um reflexo de sobressalto, quando um estímulo sensorial é precedido por outro de menor

intensidade (FITCH; THRELKELD; MCCLURE; PEIFFER, 2008). No teste do PPI, a resposta de sobressalto do animal gera uma pressão em uma plataforma que é captada por sensores e amplificada gerando um sinal que é digitalizado e analisado por um software (Startle Reflex, versão 4.10, Med Associates) que representa graficamente os sinais dessa resposta em unidades digitais arbitrárias. A apresentação dos estímulos, duração, intensidade e amplitude foram computadorizadas através de uma interface (Med Associates). A resposta do sobressalto foi medida durante os primeiros 200 ms após a apresentação do estímulo de sobressalto. O teste de PPI foi composto por três etapas: Aclimação: período de 5 minutos, durante o qual nenhum estímulo é apresentado. Habituação para determinação da linha de base, por meio de 10 apresentações do pulso com intervalo entre os estímulos de 30 segundos. Inibição da resposta de sobressalto ao pulso (PPI): Apresentações aleatórias de (1) pulso (P; 105 dB de ruído branco, duração de 20 ms), (2) pré-pulso (PP; 80, 85 ou 90 dB de som puro, frequência de 7000 Hz, duração de 10 ms), (3) pré-pulso seguido de pulso (PP+P) com 100 ms de intervalo entre eles e (4) nulo. Durante essa sessão os estímulos foram apresentados em intervalos regulares de 30 segundos, sendo 20 de cada categoria. O PPI foi expresso como a porcentagem de inibição da amplitude do sobressalto em resposta a múltiplas apresentações do pulso precedido pelo pré-pulso, em função da amplitude da resposta apenas ao pulso, que é numericamente expresso na seguinte fórmula: $\%PPI = [100 - (PP+P/P) * 100]$.

3.3.6. Teste de atividade locomotora no campo aberto

Teste muito utilizado para avaliar a atividade locomotora do animal, este teste expressa a distância percorrida pelo animal em uma arena. Antagonistas dos receptores NMDA, como o MK-801, induzem hiperlocomoção, um efeito revertido ou

atenuado por drogas com propriedades antipsicóticas. Neste teste, para avaliação dos efeitos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a atividade locomotora basal ou sobre a hiperlocomoção induzida pelo MK-801, os animais foram posicionados no centro de uma arena circular de acrílico (40 x 40 cm) com luz amarela presente na sala, onde puderam percorrer livremente a arena durante 20 minutos. A distância total percorrida pelos animais foi registrada com ajuda do software Any-Maze.

3.3.7. Preferência condicionada ao lugar

A preferência condicionada ao lugar (CPP, do inglês *conditioned place preference*) é utilizada para mensurar os efeitos reforçadores positivos de diversas drogas com potencial de abuso. A preferência ocorre quando o animal prefere um determinado lugar por este ter sido associado previamente a um evento reforçador. Neste teste, os animais são apresentados repetidamente a dois ambientes distintos e inicialmente neutros que são pareados com estados distintos de droga e não-droga. Em uma sessão teste é avaliado se o animal apresenta preferência para explorar o ambiente previamente associado a droga, que é utilizado como indicativo de efeito reforçador positivo induzido pela droga. Foi utilizada uma caixa retangular constituída por dois compartimentos (20 cm de comprimento x 18 cm de largura x 25 cm de altura) separados por um compartimento central menor (20 cm x 7 cm x 25 cm), que liga os compartimentos maiores através de duas portas. Os compartimentos maiores apresentam diferenças no assoalho e nas paredes, para a distinção de lugar pelo animal. No pré-teste, os animais foram colocados no compartimento central da caixa, com ambas as portas abertas para explorar livremente 15 minutos. Nos dias subsequentes, ocorreu o confinamento em um dos lados da caixa com 3 sessões de condicionamento ao lado pareado a droga e 3 ao lado não pareado a droga em dias alternados. No dia do teste, os animais foram colocados novamente no compartimento

central da caixa, com ambas as portas abertas para explorar livremente por 15 minutos. O tempo de permanência em cada lado foi registrado com a ajuda do software Any-Maze. O resultado foi expresso como tempo de exploração do lado pareado com a droga durante a sessão teste – tempo de exploração do lado pareado com a droga durante a sessão de pré-teste (NEELAKANTAN; WARD; WALKER, 2016). A morfina, na dose 20 mg/kg, foi utilizada como controle positivo.

3.3.8. Rotarod

O teste de rotarod é comumente utilizado para avaliação sobre o efeito de drogas sobre a coordenação motora em roedores. O rotarod consiste em uma barra cilíndrica rotatória com raio de aproximadamente 2,5 centímetros e colocado a uma altura de 40 centímetros do assoalho. O aparelho possui 5 baias, com espaço de 3 centímetros para cada camundongo, de modo que 5 animais são avaliados por vez. Os camundongos foram colocados na barra enquanto a mesma girava a uma velocidade constante de 21 rotações por minuto (rpm). Neste teste, os animais devem caminhar continuamente sobre o cilindro em rotação, para avaliar o tempo que permanecem sobre o mesmo. Os animais foram inicialmente mantidos sobre o rotarod (Ugo Basile) nos cilindros por 5 minutos, para habituação. No dia seguinte, no teste, após a administração das drogas, os camundongos foram novamente colocados sobre o rotarod e a latência para queda dos animais foi medida automaticamente através de um sensor mecânico localizado no chão do aparato, sendo o tempo de corte utilizado de 180 segundos.

3.4. Experimentos

3.4.1. Experimento 1: Avaliação das propriedades ansiolíticas e antidepressivas do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3

Camundongos receberam GL-II-73 ou SH-053-2'F-R-CH3, i.p., nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, e, 30 minutos após a administração, foram submetidos ao teste do LCE. Imediatamente após o LCE, os animais foram submetidos ao FST. Em experimentos independentes, foi avaliado também de forma aguda se o GL-II-73, na dose 10 mg/kg, produz efeito tipo-antidepressivo no teste de supressão da alimentação pela novidade. Além disso, como o GL-II-73 produziu efeitos tipo-antidepressivos no FST, foi investigado se esse efeito é sustentado. Para isso, o GL-II-73, na dose 10 mg/kg, foi administrado e os animais submetidos ao FST 24 horas ou 3 dias (72 horas) após a administração. Foram realizados experimentos independentes com machos e fêmeas.

3.4.2. Experimento 2: Avaliação dos efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre a expressão e extinção da memória emocional condicionada contextual

Os animais foram submetidos ao protocolo de medo condicionado ao contexto descrito anteriormente. Trinta minutos antes da sessão de extinção, os animais receberam GL-II-73 ou SH-053-2'F-R-CH3, i.p., nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg. No terceiro dia, os animais foram reexpostos novamente ao contexto previamente pareado com choque nas patas para avaliação da consolidação da extinção (Teste, Fig. 1). Foram realizados experimentos independentes com machos e fêmeas.

Figura 2- Desenho experimental para avaliar os efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 no teste de medo condicionado ao contexto. O GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 foram administrados 30 minutos antes da sessão de extinção.

3.4.3. Experimento 3: Avaliação das propriedades antipsicóticas do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3

Para avaliar se o GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH3 é capaz de induzir alterações na atividade locomotora e no PPI, camundongos receberam uma injeção i.p., nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, e após 30 minutos foram submetidos aos protocolos de campo aberto e teste do PPI descritos acima. O MK-801, um antagonista de receptores NMDA, quando administrado de forma aguda, é capaz de produzir alterações relacionadas a sintomas da esquizofrenia, como um aumento da atividade locomotora em roedores e um prejuízo no PPI. A reversão destas alterações tem sido utilizada como indicativo de propriedade antipsicótica. Assim, para verificar se o GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH3 produzem efeitos tipo-antipsicóticos, os animais receberam injeções i.p., nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg. Após 20 minutos, os animais receberam o MK-801, via i.p., na dose de 0,25 mg/kg para indução de hiperlocomoção ou 0,5 mg/kg para indução de prejuízo no PPI. Decorridos 10 minutos da injeção de MK-801, os animais foram submetidos aos protocolos de campo aberto ou PPI (Fig. 3). Foram realizados experimentos independentes com machos e fêmeas.

Figura 3- Desenho experimental para avaliar os efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre o prejuízo no PPI e na hiperlocomoção induzidos pelo MK-801.

3.4.4. Experimento 4: Avaliação dos efeitos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a coordenação motora e se produz efeitos reforçadores positivos em um protocolo de preferência condicionada ao lugar

Alterações sobre a coordenação motora e o potencial de abuso podem limitar a utilidade clínica de determinados compostos. Assim, a fim de avaliar os efeitos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a coordenação motora, os animais receberam uma injeção via i.p. e após 30 minutos foram submetidos ao rotarod. O diazepam, na dose de 10mg/kg, foi utilizado como controle positivo. Para avaliação de efeitos reforçadores positivos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3, os animais foram submetidos ao protocolo de preferência condicionada ao lugar. Camundongos foram expostos a caixa livremente para exploração durante 15 minutos no dia 0 (pré-teste). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam veículo, GL-II-73 ou SH-053-2'F-R-CH3 (1, 5 e 10 mg/kg) pareados respectivamente a um lado da caixa onde ficaram confinados durante 30 minutos. No dia 7, os animais foram reexpostos a caixa por 15 minutos, podendo explorar o aparato livremente (Teste, Fig. 4). O tempo em que o animal permanece no lado pareado a droga foi contabilizado. Foram Realizados

experimentos independentes em machos e fêmeas. A morfina, na dose de 20 mg/kg, foi utilizada como controle positivo.

Figura 4- Desenho experimental para avaliar os efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 no teste preferência condicionada ao lugar (CPP). Os efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 foram comparados os induzidos pela morfina (20 mg/kg).

3.5. Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média e analisados por meio de teste T *de Student* ou ANOVA de uma via ou de múltiplos fatores, seguida de pós-teste Tukey. Para análise dos dados do teste de preferência condicionada ao lugar foi utilizada ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett. Para amostras que não seguiram distribuição normal, como no teste de rotarod, foi utilizado o Kruskal-Wallis. Para os dados do medo condicionado ao contexto foi utilizado ANOVA de medidas repetidas, com o tempo como medida repetida e tratamento como fator principal, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: Avaliação das propriedades ansiolíticas e antidepressivas do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3

4.1.1. Labirinto em cruz elevado

A administração aguda do GL-II-73, na dose 10 mg/kg, aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE em machos ($F_{3,25}=3,14$, $p<0,05$; Fig. 5A) e em fêmeas ($F_{3,36}=4,60$, $p<0,05$; Fig. 5D), sem alterar de forma significativa a porcentagem de tempo que os animais permaneceram nos braços abertos do LCE (Fig. 5B e E). Além disso, o GL-II-73, nas três doses utilizadas, aumentou de forma significativa o número de entradas nos braços fechados em machos ($F_{3,25}=23,38$, $p<0,05$; Fig. 5C), sugerindo um possível aumento na atividade locomotora. Nenhuma alteração no número de entradas dos braços fechados foi observada em fêmeas (Fig. 5F). Estes resultados sugerem um possível efeito do tipo-ansiolítico do GL-II-73, na dose 10 mg/kg, em machos e fêmeas. Entretanto, não é possível descartar que essa alteração na exploração dos braços abertos induzida pelo GL-II-73, na dose 10 mg/kg, em machos esteja associada a um aumento na locomoção induzida pelo tratamento.

Figura 5- Efeitos do GL-II-73 no LCE. (A) Em machos (n=7-8/grupo), o GL-II-73 (10 mg/kg) aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos, (B) sem alterar a porcentagem de tempo que os animais permaneceram nos braços abertos do LCE. (C) Um maior número de entradas nos braços fechados também foi observado em machos tratados com GL-II-73 (5 e 10 mg/kg). Em fêmeas (n=10/grupo), (D) o GL-II-73 aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos (E) mas não alterou a porcentagem de tempo nos braços abertos e (F) o número de entradas nos braços fechados do LCE. *P<0,05 vs. veículo; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

O SH-053-2'F-R-CH₃, nas doses 5 e 10 mg/kg, aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE em machos ($F_{3,45}=5,38$, $p<0,05$; Fig. 6 A), sem

alterar o número de entradas nos braços fechados (Fig. 6C). Esses resultados indicam um possível efeito tipo-ansiolítico do SH-053-2'F-R-CH3 em machos, sem alterar a atividade locomotora. Nenhuma alteração foi observada em fêmeas (Fig. 6 D, E e F).

Figura 6- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 no LCE. (A) Em machos (n=12-13/grupo), o SH-053-2'F-R-CH3 (5 e 10 mg/kg) aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos, (B) mas não alterou a porcentagem de tempo que os animais permaneceram nos braços abertos e (C) o número de entradas nos braços fechados do LCE. Em fêmeas (n=8/grupo), (D) o SH-053-2'F-R-CH3 não alterou a porcentagem de entradas e (E) de tempo nos braços abertos e também (F) não alterou o número de entradas nos braços fechados do LCE. *P<0,05 vs. veículo; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

4.1.2. Nado Forçado

No teste do nado forçado, o GL-II-73, na dose de 10 mg/kg, diminuiu o tempo de imobilidade em machos ($F_{3,25}=4,64$, $p<0,05$; Fig7A) e em fêmeas ($F_{3,36}=3,53$, $p<0,05$; Fig. 7B), indicando um possível efeito tipo-antidepressivo desse composto em machos e fêmeas. Já o SH-053-2'F-R-CH3 não alterou o tempo de imobilidade em machos e fêmeas (Fig. 7C e D).

Figura 7- Efeitos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3 no teste de nado forçado 30 minutos após a administração desses compostos. (A) O GL-II-73 (10 mg/kg) diminuiu o tempo de imobilidade no FST em machos ($n=7-8$ /grupo) e (B) em fêmeas ($n=10$ /grupo). (C) O SH-053-2'F-R-CH3 não alterou o tempo de imobilidade no FST em machos ($n=12-13$ /grupo) e (D) em fêmeas ($n=8$ /grupo) * $P<0,05$ vs. veículo; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

Como o GL-II-73 produziu efeitos tipo-antidepressivos no FST 30 minutos após sua administração, foi investigado se esse efeito é sustentado. Foi observado que o tempo de imobilidade do grupo tratado com GL-II-73, na dose de 10 mg/kg, e submetido ao nado forçado 24 horas após a administração foi significativamente

menor quando comparado ao grupo que recebeu veículo em machos ($t_{38}=2,27$, $p<0,05$; Fig. 8A) e fêmeas ($t_{15}=1,91$, $p<0,05$; Fig. 8B), sugerindo um possível efeito tipo-antidepressivo sustentando de GL-II-73. Entretanto, esse efeito não foi observado 72 horas após a administração do GL-II-73 (Fig. 8C e D).

Figura 8- Efeitos do GL-II-73 no teste de nado forçado 24 e 72 horas após sua administração. (A) O GL-II-73 (10 mg/kg), 24 horas após sua administração, diminuiu o tempo de imobilidade no FST em machos ($n=19-21$ /grupo) e (B) em fêmeas ($n=7-10$ /grupo) (C) mas não alterou o tempo de imobilidade 72 horas após sua administração em machos ($n=10$ /grupo) nem (D) em fêmeas ($n=9$ /grupo). * $P<0,05$ vs. veículo; teste T de Student.

4.1.3. Supressão da alimentação pela novidade

Como o GL-II-73 produziu efeitos tipo-antidepressivos no FST 30 minutos após sua administração, foi investigado se esse efeito também é observado no teste de supressão da alimentação pela novidade. A administração aguda do GL-II-73, na dose 10 mg/kg, diminuiu de forma significativa a latência para comer em machos ($t_{18}=2,15$, $p<0,05$; Fig. 9A) e fêmeas ($t_{17}=2,378$ $p<0,05$; Fig 9C), sem alterar a latência para

comer na *home cage* (Fig. 9B e D). Estes resultados sugerem um possível efeito tipo-antidepressivo do GL-II-73 em machos e fêmeas sem alterar a ingestão alimentar.

Figura 9- Efeitos do GL-II-73 no teste de supressão alimentar pela novidade. (A) O GL-II-73 (GL, 10 mg/kg) diminuiu a latência para comer em machos (n=10/grupo) e (C) em fêmeas (n=9-10/grupo), sem alterar a latência para comer na *home cage*. *P<0,05 vs. veículo; teste T de Student.

4.2. Experimento 2: Avaliação dos efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre a expressão e extinção da memória emocional condicionada contextual

4.2.1. Medo condicionado

Camundongos machos apresentaram uma porcentagem de tempo em congelamento crescente após cada choque deflagrado durante a sessão de condicionamento (Fig. 10A). O tratamento com GL-II-73 foi realizado 30 minutos antes da sessão de extinção. Na extinção, os animais apresentaram maiores níveis de

congelamento durante o período de expressão da memória aversiva, nos primeiros 5 minutos da sessão de extinção (bloco 1), sem diferença entre grupos. Houve uma diminuição na porcentagem de tempo de congelamento ao longo da extinção, demonstrando um aprendizado no processo de extinção (tempo: $F_{3,78}=37,39$, $p<0,05$; ANOVA de medidas repetidas). Também houve um efeito do tratamento ($F_{1,26}=8,62$, $p<0,05$), mas sem interação entre tempo e tratamento ($F_{3,78}=1,48$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni indicou que o grupo tratado com GL-II-73 apresentou uma queda menos acentuada na porcentagem de congelamento a partir do terceiro bloco de 5 minutos quando comparado ao grupo veículo ($p<0,05$; Fig. 10 A), sugerindo um possível prejuízo no processo de aprendizado da extinção da memória aversiva. Uma maior porcentagem de tempo de congelamento em animais tratados com GL-II-73 foi observado durante a sessão de extinção ($t_{26}=2,94$, $p<0,05$; Fig. 10B). Na sessão teste, não houve diferença significativa entre os grupos veículo e GL-II-73 na porcentagem de congelamento (Fig. 10A e B). Esses resultados indicam que o tratamento com GL-II-73 antes da sessão de extinção prejudicou o processo de extinção, mas sem alterar a retenção do aprendizado da extinção em machos.

Figura 10- Efeitos do GL-II-73 sobre a resposta emocional condicionada contextual em machos. (A) O GL-II-73 (10 mg/kg) parece retardar o aprendizado da extinção da memória aversiva, mas não alterou a retenção do aprendizado da extinção (teste). * $P < 0,05$ vs. veículo; ANOVA de medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Bonferroni. (B) Representação gráfica em barras com médias do tempo total de congelamento nas sessões de condicionamento, extinção e teste. * $P < 0,05$ vs veículo; Teste T não pareado; $n = 14$ /grupo.

Em fêmeas, também foi observado uma porcentagem de tempo em congelamento crescente após cada choque deflagrado durante a sessão de condicionamento (Fig. 11A). Durante a extinção, houve uma diminuição na porcentagem de tempo de congelamento ao longo da sessão, demonstrando um aprendizado no processo de extinção (tempo: $F_{3,78} = 47,51$, $p < 0,05$; ANOVA de medidas repetidas). Também houve

um efeito do tratamento ($F_{1,26}=28,42$, $p<0,05$), mas sem interação entre tempo e tratamento ($F_{3,78}=1,11$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni indicou que o grupo tratado com GL-II-73 apresentou uma maior porcentagem de congelamento durante todos os blocos da sessão de extinção ($p<0,05$; Fig. 11 A). Maiores níveis de congelamento durante o período de expressão da memória aversiva, nos primeiros 5 minutos da sessão de extinção (bloco 1), pode sugerir um possível efeito tipo-ansiolítico. Apesar de haver uma progressiva diminuição do tempo de congelamento, demonstrando um aprendizado no processo de extinção da memória aversiva, o GL-II-73 parece retardar o aprendizado da extinção da memória aversiva. Essas alterações foram refletidas em uma maior porcentagem de tempo de congelamento em animais tratados com GL-II-73 durante toda a sessão de extinção ($t_{26}=5,31$, $p<0,05$; Fig. 11B). Durante a sessão teste, houve uma diferença significativa entre o grupo veículo e GL-II-73 ($t_{26}=2,95$, $p<0,05$; Fig. 11A e B). Essa diferença pode sugerir que o GL-II-73 induz um prejuízo na retenção do aprendizado da extinção em fêmeas. Entretanto, é possível observar que a porcentagem de congelamento durante o último bloco da extinção (bloco 4) e da sessão teste são similares em ambos os grupos, sugerindo que o animal foi capaz de reter a memória de extinção do medo condicionado. Uma possível alternativa para avaliar se o GL-II-73 é de fato capaz de prejudicar a retenção da memória de extinção seria avaliar o congelamento na sessão de teste por um período maior.

Figura 11- Efeitos do GL-II-73 sobre a resposta emocional condicionada contextual em fêmeas. (A) O GL-II-73 (10 mg/kg) parece retardar o aprendizado da extinção da memória aversiva. Animais tratados com GL-II-73 também apresentaram uma maior porcentagem de tempo em congelamento durante a sessão teste. * $P < 0,05$ vs. veículo; ANOVA de medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Bonferroni. (B) Representação gráfica em barras com médias do tempo total de congelamento nas sessões de condicionamento, extinção e teste. * $P < 0,05$ vs veículo; Teste T não pareado; $n = 14$ /grupo.

Nos experimentos para avaliar os efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a resposta emocional condicionada, como esperado, houve um aumento progressivo no tempo de congelamento durante a sessão de condicionamento em machos (Fig. 12A) e fêmeas (Fig. 13A). Durante a extinção, os animais apresentaram maiores níveis de congelamento durante o período de expressão da memória aversiva, nos primeiros minutos da sessão de extinção, sem diferença entre grupos. Houve uma diminuição

na porcentagem de tempo em congelamento demonstrando um aprendizado no processo de extinção em machos (tempo: $F_{3,78}=84,04$, $p<0,05$; ANOVA de medidas repetidas) e em fêmeas (tempo: $F_{3,33}=56,56$, $p<0,05$; ANOVA de medidas repetidas). Em machos, mas não em fêmeas, houve uma tendência para efeito do tratamento ($F_{1,26}=4,19$, $p=0,05$) e para interação entre tempo e tratamento ($F_{3,78}=2,54$, $p=0,06$). O pós-teste de Bonferroni indicou que, em machos, o grupo tratado com SH-053-2'F-R-CH3 apresentou uma discreta redução na porcentagem de congelamento no terceiro bloco da sessão de extinção ($p<0,05$; Fig. 12A). Entretanto, nenhuma alteração foi observada quando se avaliou o tempo total de congelamento durante toda a sessão de extinção (Fig.12B). Além disso, observamos que não há diferença significativa entre os grupos veículo e SH-053-2'F-R-CH3 na porcentagem de congelamento durante o teste (Fig. 12A e B). Esses resultados indicam que, ao contrário do GL-II-73, a administração de SH-053-2'F-R-CH3 antes da sessão não prejudica a extinção da memória aversiva em machos, facilitando de forma discreta o processo de extinção da memória aversiva e sem alterar a retenção da memória de extinção.

Figura 12- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a resposta emocional condicionada contextual em machos. (A) Animais tratados com SH-053-2'F-R-CH3 (10 mg/kg) apresentaram uma menor porcentagem de tempo de congelamento no terceiro bloco da sessão de extinção, sugerindo um possível efeito sobre a facilitação do aprendizado da extinção da memória aversiva. Nenhuma alteração foi observada na retenção do aprendizado da extinção (teste). * $P < 0,05$ vs. veículo; ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. (B) Representação gráfica em barras com médias do tempo total de congelamento nas sessões de condicionamento, extinção e teste. * $P < 0,05$ vs veículo; Teste T não pareado; $n=14$ /grupo.

Em fêmeas, o SH-053-2'F-R-CH3 não alterou a extinção da memória aversiva e a retenção do aprendizado da extinção (Fig. 13).

Figura 13- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a resposta emocional condicionada contextual em fêmeas. (A) O SH-053-2'F-R-CH3 (10 mg/kg) não alterou a extinção da memória aversiva e a retenção do aprendizado da extinção (teste). ANOVA de medidas repetidas. (B) Representação gráfica em barras com médias do tempo total de congelamento nas sessões de condicionamento, extinção e teste. Teste T não pareado; n=7/grupo.

4.3. Experimento 3: Avaliação das propriedades antipsicóticas do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3

4.3.1. PPI

Camundongos receberam uma administração aguda de GL-II-73 nas doses 1, 5 e 10 mg/kg e foram submetidos ao PPI, com intensidades de pré-pulso de 80, 85 e 90 dB. O GL-II-73, em machos, induziu um prejuízo no PPI, nas doses 1 e 10 mg/kg, nas intensidades de pré-pulso de 85 dB ($F_{3,28}=3,56$, $p<0,05$) e de 90 dB ($F_{3,28}=4,94$;

$p < 0,05$; Fig. 14A). Nenhuma alteração foi observada em fêmeas (Fig. 14B). Também não foram observadas alterações na resposta de sobressalto (Tabela 1).

Figura 14- Efeitos do GL-II-73 no teste de PPI. (A) O GL-II-73 (1 e 10 mg/kg) prejudicou a porcentagem de inibição pelo pré-pulso em machos, ($n=8$ /grupo), mas (B) sem causar alteração em em fêmeas ($n=10$ /grupo). * $P < 0,05$ vs. veículo; ANOVA de uma via para cada intensidade de pré-pulso seguida pelo pós-teste de Tukey.

O SH-053-2'F-R-CH3, nas doses 1, 5 e 10mg/kg, não induziu alterações significativas no PPI em machos (Fig. 15A) e fêmeas (Fig. 15B) e também não alterou o reflexo de sobressalto (Tabela 1).

Figura 15- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 no teste de PPI. (A) O SH-053-2'F-R-CH3 não alterou a porcentagem de inibição pelo pré-pulso em machos (n=8/grupo) (B) e fêmeas (n=9/grupo). ANOVA de uma via para cada intensidade de pré-pulso.

Tabela 1- GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 não alteraram o reflexo de sobressalto.

Grupos	Sobressalto (UA)		Grupos	Sobressalto (UA)	
GL-II-73 machos	Média	EPM	SH-053 machos	Média	EPM
Veic.	711,85	± 75,15	Veic.	662	± 45,09
GL-II-73 1 mg/kg	665,25	± 55,90	SH-053 1 mg/kg	790,75	± 89,26
GL-II-73 5 mg/kg	833,25	± 82,53	SH-053 5 mg/kg	850,75	± 138,50
GL-II-73 10 mg/kg	913,25	± 73,43	SH-053 10 mg/kg	826,12	± 86,10
F_{3,28}=2,45; p>0,05			F_{3,28}=0,78; p>0,05		
GL-II-73 fêmeas	Média	EPM	SH-053 fêmeas	Média	EPM
Veic.	615,7	± 36,55	Veic.	490,889	± 51,05
GL-II-73 1 mg/kg	789,8	± 84,24	SH-053 1 mg/kg	554,778	± 39,82
GL-II-73 5 mg/kg	732,4	± 45,20	SH-053 5 mg/kg	608,667	± 40,66
GL-II-73 10 mg/kg	732,4	± 53,95	SH-053 10 mg/kg	636,222	± 62,74
F_{3,36}=1,60; p>0,05			F_{3,32}=1,68; p>0,05		

n=8-10/grupo. ANOVA de uma via. SH-053=SH-053-2'F-R-CH3, UA=unidades arbitrárias.

4.3.2. Prejuízo no PPI induzido pelo MK-801

Drogas com propriedades antipsicóticas atenuam o prejuízo no PPI induzido pelo MK-801, um antagonista de receptores NMDA (BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ; HORÁCEK; VRAJOVÁ; HÖSCHL, 2008). Assim, este teste foi realizado com o objetivo de analisar se o GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH3 são capazes de reverter ou atenuar os prejuízos causados pelo MK-801 no PPI, avaliando assim suas propriedades antipsicóticas. Nos experimentos com GL-II-73, como esperado, em machos e fêmeas, o MK-801 induziu prejuízos no PPI nas três intensidades de pré-pulso utilizadas (machos – 80 dB: $F_{4,31}=4,83$, $p<0,05$; 85 dB: $F_{4,31}=6,25$, $p<0,05$; 90 dB: $F_{4,31}=7,15$, $p<0,05$; fêmeas - 80 dB: $F_{4,35}=4,08$, $p<0,05$; 85 dB: $F_{4,35}=11,30$, $p<0,05$; 90 dB: $F_{4,35}=5,51$, $p<0,05$; Fig.16A e B). Em camundongos machos que foram tratados com GL-II-73, na dose de 5 mg/kg, não foi observado o prejuízo induzido pelo MK-801 no PPI nas intensidades de pré-pulso de 85 e 90 dB ($p>0,05$ vs. grupo veiculo+salina; pós-teste de Tukey; Fig.16A), indicando uma possível propriedade antipsicótica. Entretanto, esse efeito não foi observado em fêmeas (Fig. 16B). Adicionalmente, nenhuma alteração foi observada no reflexo de sobressalto (Tabela 2).

Figura 16- Efeitos do GL-II-73 sobre o prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801. (A) Em machos (n=6-8/grupo), o GL-II-73 (5 mg/kg) atenuou o prejuízo causado pelo MK-801 na porcentagem de inibição pelo pré-pulso nas intensidades de pré-pulso de 85 e 90 dB. (B) Em fêmeas (n=8/grupo), o GL-II-73 não alterou o prejuízo causado pelo MK-801 no PPI. * $P < 0,05$ vs. veículo; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

Nos experimentos com SH-053-2'F-R-CH₃, o MK-801 induziu prejuízos no PPI nas três intensidades de pré-pulso utilizadas em machos e fêmeas (machos – 80 dB: $F_{4,31}=12,34$, $p < 0,05$; 85 dB: $F_{4,31}=7,47$, $p < 0,05$; 90 dB: $F_{4,31}=6,17$, $p < 0,05$; fêmeas - 80 dB: $F_{4,31}=2,80$, $p < 0,05$; 85 dB: $F_{4,31}=2,82$, $p < 0,05$; 90 dB: $F_{4,31}=2,67$, $p = 0,05$; Fig.17A e B). Em camundongos fêmeas tratadas com SH-053-2'F-R-CH₃, nas três doses investigadas, não foi observado o prejuízo induzido pelo MK-801 no PPI nas

intensidades de pré-pulso de 80, 85 e 90 dB ($p>0,05$ vs. grupo veículo+salina; pós-teste de Tukey; Fig.17B), indicando uma possível propriedade antipsicótica. Entretanto, esse efeito não foi observado em machos (Fig. 17A). Adicionalmente, nenhuma alteração foi observada no reflexo de sobressalto (Tabela 2).

Figura 17- Efeitos do SH-053-2'F-R-CH3 (SH) sobre o prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801. (A) O SH-053-2'F-R-CH3 não alterou o prejuízo causado pelo MK-801 na porcentagem de inibição pelo pré-pulso em machos ($n=6-8$ /grupo) nem (B) em fêmeas ($n=6-8$ /grupo). * $P<0,05$ vs. veículo; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

Tabela 2- MK-801, sozinho ou com o pré-tratamento com GL-II-73 ou SH-053-2'F-R-CH3 não alterara o reflexo de sobressalto.

Grupos	Sobressalto (UA)		Grupos	Sobressalto (UA)	
GL-II-73 machos	Média	EPM	SH-053 machos	Média	EPM
Veic+Sal	744	± 93,09	Veic+Sal	716,83	± 37,01
Veic+MK-801	831,28	± 78,08	Veic+MK-801	969,5	± 90,20
GL 1 mg/kg+MK-801	792	± 101,44	SH-053 1 mg/kg+MK-801	785,5	± 54,47
GL 5 mg/kg+MK-801	940,28	± 105,98	SH-053 5 mg/kg+MK-801	765	± 44,25
GL 10 mg/kg+MK-801	952,37	± 122,18	SH-053 10 mg/kg+MK-801	889,62	± 65,50
F_{4,31}=0,76; p>0,05			F_{4,33}=2,53; p>0,05		
GL-II-73 fêmeas	Média	EPM	SH-053 fêmeas	Média	EPM
Veic+Sal	710,25	± 56,87	Veic+Sal	565,5	± 59,02
Veic+MK-801	822,75	± 68,37	Veic+MK-801	757,90	± 66,53
GL 1 mg/kg+MK-801	843,625	± 85,28	SH-053 1 mg/kg+MK-801	715,75	± 62,71
GL 5 mg/kg+MK-801	809,5	± 53,24	SH-053 5 mg/kg+MK-801	795,70	± 33,58
GL 10 mg/kg+MK-801	780,375	± 69,02	SH-053 10 mg/kg+MK-801	783,91	± 34,05
F_{4,35}=0,59; p>0,05			F_{4,31}=2,55; p>0,05		

n=6-8/grupo. ANOVA de uma via. GL=GL-II-73, SH-053=SH-053-2'F-R-CH3, UA=unidades arbitrárias

4.3.3. Atividade locomotora em campo aberto

A fim de se avaliar a atividade locomotora basal de animais tratados com GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 os animais foram submetidos ao campo aberto e tiveram a distância percorrida avaliada. O GL-II-73 aumentou a atividade locomotora em machos nas doses 1, 5 e 10 mg/kg ($F_{3,32}=27,61$, $p<0,05$; Fig. 18A). Em fêmeas, o GL-II-73 também aumentou a atividade locomotora nas doses 5 e 10 mg/kg ($F_{3,36}=7,27$,

$p < 0,05$, Fig. 18B). Já o SH-053-2'F-R-CH₃, nas doses 1, 5 e 10 mg/kg, não alterou a atividade locomotora em machos e fêmeas (Fig. 18C e D).

Figura 18- Efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH₃ sobre a atividade locomotora 30 minutos após a administração. (A) Em machos ($n = 9$ /grupo) e (B) em fêmeas ($n = 10$ /grupo) o GL-II-73 (machos 1, 5 e 10 mg/kg; fêmeas 5 e 10 mg/kg) aumentou a atividade locomotora no campo aberto. Já o (C) SH-053-2'F-R-CH₃ não alterou a atividade locomotora no campo aberto em machos ($n = 6$ /grupo) e (D) fêmeas ($n = 9-10$ /grupo). * $P < 0,05$ vs. veículo; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

Como o GL-II-73 produziu um aumento na atividade locomotora 30 minutos após sua administração em machos e fêmeas, foi investigado se esse efeito perduraria após 24 e 72 horas da sua administração e, assim, influenciar nos efeitos tipo-antidepressivos sustentados observados no FST. Foi observado que o GL-II-73 não alterou a atividade locomotora de machos e fêmeas 24 e 72 horas após sua administração (Fig 19).

Figura 19- Efeitos do GL-II-73 sobre a atividade locomotora 24 e 72 horas após sua administração. (A) Em machos (n= 9/grupo) e (B) em fêmeas (n=8/grupo) o GL-II-73 (10 mg/kg) não alterou a atividade locomotora no campo aberto 24 horas após sua administração. (C) Também não foi observada alteração 72 horas após a administração de GL-II-73 em machos (n=10/grupo) (D) em fêmeas (n=8/grupo). Teste t não pareado.

4.3.4. Hiperlocomação induzida por MK-801

O MK-801, um antagonista de receptores NMDA, quando administrado de forma aguda, é capaz de produzir alterações relacionadas a sintomas da esquizofrenia, como mostrado anteriormente ao induzir prejuízo no teste de PPI, mas também resulta em um aumento da atividade locomotora em roedores. A fim de avaliar as propriedades antipsicóticas de GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH₃, os animais foram tratados com GL-II-73 ou SH-053-2'F-R-CH₃ e logo após, MK-801. Como esperado, o MK-801 induziu um aumento na atividade locomotora em machos (experimento GL-

II-73: $F_{4,63}=62,67$, $p<0,05$; experimento SH-053-2'F-R-CH3: $F_{4,29}=20,99$, $p<0,05$) e fêmeas (experimento GL-II-73: $F_{4,33}=7,58$, $p<0,05$; experimento SH-053-2'F-R-CH3: $F_{4,39}=8,58$, $p<0,05$; Fig. 20). Em machos, o GL-II-73, na dose de 10 mg/kg, atenuou a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 ($p<0.05$ vs. veículo+MK-801, pós-teste de Tukey; Fig. 20A). Entretanto, em fêmeas, o GL-II-73, em nenhuma das doses testadas, atenuou a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 (Fig. 20B). Diferente do GL-II-73, o SH-053-2'F-R-CH3 em machos, não foi capaz de atenuar a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 (Fig. 20C). Porém, em fêmeas, o SH-053-2'F-R-CH3, na dose de 10 mg/kg, atenuou a hiperlocomoção induzida pelo MK-801 ($p<0.05$ vs. veículo+MK-801, pós-teste de Tukey; Fig. 20D). Esses efeitos do GL-II-73 em machos e do SH-053-2'F-R-CH3 em fêmeas sugerem possíveis propriedades antipsicóticas desses compostos e são, de certa forma, similares aos observados na atenuação do prejuízo no teste de PPI induzido pelo MK-801.

Figure 20- Efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre a hiperlocomção induzida pelo MK-801. (A) Em machos, o GL-II-73 (GL; 10 mg/kg) atenuou a hiperlocomção induzida pelo MK-801 no campo aberto (n= 12-14/grupo), (B) mas não em fêmeas (n= 8/grupo). (C) O SH-053-2'F-R-CH3 (SH) não alterou a hiperlocomção induzida pelo MK-801 em machos (n= 6-7/grupo). (D) Em fêmeas, o SH-05-2'F-R-CH3, na dose de 10 mg/kg, atenuou a hiperlocomção induzida pelo MK-801 (n=8/grupo). *P<0,05; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

4.4. Experimento 4: Avaliação dos efeitos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3 sobre a coordenação motora e se produz efeitos reforçadores positivos em um protocolo de preferência condicionada ao lugar

4.4.1. Preferência condicionada ao lugar (CPP)

Para avaliação de efeitos reforçadores positivos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3, os animais foram submetidos ao protocolo de CPP. Como esperado, a morfina alterou a preferência nos animais em explorar o compartimento pareado com a

administração da droga em machos ($F_{3,23}=4,38$, $p<0,05$; Fig. 21A) e fêmeas ($F_{3,27}=5,33$, $p<0,05$; Fig. 21B). Diferente da morfina, o GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH3, na dose de 10 mg/kg, não induziu nenhuma alteração no CPP (Fig. 21).

Figure 21- Efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 no teste preferência condicionada ao lugar. (A) Em machos (B) e fêmeas, o GL-II-73 (GL) e o SH-053-2'F-R-CH3 (SH), na dose de 10 mg/kg, diferente da morfina (20 mg/kg), não alterou índice de CPP ($n=7/\text{grupo}$) * $P<0,05$ vs. veículo; ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Dunnett.

4.4.2. Rotarod

O rotarod foi utilizado para avaliação sobre efeitos GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 sobre a coordenação motora. Como esperado, o diazepam, na dose de 10 mg/kg) diminuiu o tempo de permanência dos animais no rotarod em machos ($H=12,25$, $p<0,05$; Fig. 22A) e fêmeas ($H=35,63$, $p<0,05$; Fig. 22B), indicando seu efeito em induzir prejuízo na coordenação motora. Diferente do diazepam, o GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH3, na dose de 10 mg/kg, não induziu prejuízo na coordenação motora (Fig. 22).

Figure 22- Efeitos do GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 no teste de rotarod. (A) Em machos e (B) em fêmeas, o GL-II-73 (GL; 10 mg/kg) e o SH-053-2'F-R-CH3 (SH; 10 mg/kg), diferente do Diazepam (DZP; 10 mg/kg), não alteraram o tempo no rotarod (n=5-10/grupo). *P<0,05 vs. veículo; teste de Kruskal-Wallis.

Em suma, os efeitos comportamentais gerais induzidos pelo GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 em machos e fêmeas são descritos na tabela 3.

Tabela 3- Resumo dos efeitos comportamentais distintos de GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3 em machos e fêmeas

GL-II-73	machos	dose	fêmeas	dose
labirinto em cruz elevada	✓	10	✓	10
nado forçado	✓	10	✓	10
supressão alimentar pela novidade	✓	10	✓	10
medo condicionado	▼	10	▼	10
atividade locomotora	↑	1,5 e 10	↑	5 e 10
inibição pelo pré-pulso	▼	1 e 10	—	
hiperlocomoção induzida por MK-801	✓	10	X	
inibição pelo pré-pulso + MK-801	✓	5	X	
preferência condicionada ao lugar	X		X	
rotarod	X		X	

SH-053-2'F-R-CH3	machos	dose	fêmeas	dose
labirinto em cruz elevada	✓	10	X	
nado forçado	X		X	
medo condicionado	▲	10	—	
atividade locomotora	—		—	
inibição pelo pré-pulso	—		—	
hiperlocomoção induzida por MK-801	X		✓	10
inibição pelo pré-pulso + MK-801	X		✓	1,5 e 10
preferência condicionada ao lugar	X		X	
rotarod	X		X	

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades ansiolíticas, antidepressivas, antipsicóticas e sobre a expressão da resposta emocional condicionada do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3, dois moduladores alostéricos positivos de receptores GABA_A- α_5 , em testes comportamentais preditivos para psicofármacos em camundongos machos e fêmeas. Também foi avaliado se esses compostos alteram a coordenação motora e produzem efeitos reforçadores positivos. Estes testes foram baseados na hipótese de que a potencialização da neurotransmissão GABAérgica mediada pelos receptores GABA_A- α_5 possui propriedades terapêuticas para o tratamento de transtornos psiquiátricos e com uma menor propensão para indução de efeitos adversos.

Nossos resultados indicaram diferenças no perfil de efeitos produzidos pelo GL-II-73 e pelo SH-053-2'F-R-CH3 com as doses testadas (1, 5 e 10 mg/kg para ambos). Diferenças sexuais nos efeitos desses compostos também foram observadas. O GL-II-73 aumentou a exploração dos braços abertos do LCE em machos e fêmeas, um efeito sugestivo de propriedade ansiolítica, diminuiu a imobilidade no teste de nado forçado 30 minutos e 24 horas após a sua administração além de diminuir a latência para comer no teste de supressão da alimentação pela novidade, sugerindo um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado em machos e fêmeas, além de atenuar a hiperlocomoção e o prejuízo no teste do PPI induzidos pelo antagonista de receptor NMDA MK-801 apenas em machos, um efeito similar ao de drogas antipsicóticas. Também foi observado que, embora o GL-II-73 não tenha alterado a coordenação motora e não produzido efeitos reforçadores positivos, esse composto *per se* aumentou a atividade locomotora, prejudicou a extinção de memórias aversivas em machos e fêmeas além de produzir um prejuízo no teste de PPI em machos. Já o SH-

053-2'F-R-CH3 produziu efeito tipo-ansiolítico no LCE em machos, sem produzir efeitos tipo-antidepressivos. Além disso, SH-053-2'F-R-CH3 produziu efeitos tipo antipsicóticos em fêmeas sem alterar a atividade locomotora, a coordenação motora e a performance no PPI e sem induzir efeitos reforçadores positivos.

Alguns dos nossos achados são consistentes com trabalhos anteriores. Por exemplo, os efeitos tipo-ansiolíticos no LCE e tipo-antidepressivos no teste de nado forçado observados 30 minutos após a administração do GL-II-73 são consistentes com resultados reportados por Prevot et al. (PREVOT; LI; COOK; SIBILLE, 2019). Ainda sobre as propriedades antidepressivas do GL-II-73, nós observamos que esse efeito parece ser rápido e sustentado, sendo observado 30 minutos e 24 horas após a sua administração. Esses resultados se assemelham com os efeitos da quetamina, um antagonista de receptores NMDA. Além disso, de forma similar ao que nós observamos para o GL-II-73, a administração aguda de quetamina, além de diminuir o tempo de imobilidade no nado forçado de forma rápida e sustentada, também produz, minutos após a sua administração, aumentos na atividade locomotora e prejuízos no teste de PPI (ZANOS; NELSON; HIGHLAND; KRIMMEL *et al.*, 2017). Entretanto, o GL-II-73 não alterou a atividade locomotora 24 horas após a sua administração. Diferente do GL-II-73, o SH-053-2'F-R-CH3 não produziu efeitos tipo-antidepressivos no teste do nado forçado. Estudos anteriores sugerem que o SH-053-2'F-R-CH3 é capaz de diminuir a latência para comer no teste de supressão da alimentação pela novidade na dose 30 mg/kg (PIANTADOSI; FRENCH; POE; TIMIĆ *et al.*, 2016). Estudos futuros precisam ser realizados para avaliar se a dose de 30 mg/kg é capaz de induzir efeito tipo-antidepressivos no teste do nado forçado. Além disso, enquanto nós observamos que o SH-053-2'F-R-CH3 produziu efeitos tipo-ansiolíticos no LCE apenas em machos, em modelos baseados na exposição repetida

a estressores, como o estresse crônico variável, foi observado que o tratamento agudo e crônico com SH-053-2'F-R-CH3 atenuou os comportamentos tipo-ansiedade induzido pelo estresse apenas em fêmeas (PIANTADOSI; FRENCH; POE; TIMIĆ *et al.*, 2016).

Apesar do GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH3 terem seus mecanismos de ação associados à modulação alósterica positiva de receptores GABA_A- α_5 , o fato desses compostos produzirem perfis de efeitos farmacológicos distintos e até mesmo opostos – enquanto o GL-II-73 prejudica a extinção e o SH-053-2'F-R-CH3 tende a facilitar a extinção de memórias aversivas – pode indicar que esses compostos atuam em diferentes alvos farmacológicos para produzirem seus efeitos. Por exemplo, alguns estudos ressaltam a importância de receptores GABA_A com a subunidade α_2 no processo de extinção da memória aversiva, sugerindo seu envolvimento neste processo (EHRlich; HUMEAU; GRENIER; CIOCCHI *et al.*, 2009). Assim, é possível que SH-053-2'F-R-CH3 possa apresentar uma ocupação moderada de receptores GABA_A- α_5 e baixa de receptores GABA_A com a subunidade α_2 , o que poderia estar associada a facilitação na extinção de memórias aversivas observado com o SH-053-2'F-R-CH3. Além disso, a ativação robusta de receptores GABA_A com a subunidade α_1 medeia efeitos deletérios no aprendizado e na memória (BRICKLEY; MODY, 2012) sendo possível que GL-II-73 possa apresentar uma ocupação moderada de GABA_A- α_5 e baixa de receptores GABA_A com a subunidade α_1 , o que poderia estar associado ao prejuízo na extinção de memórias aversivas observado com o GL-II-73. Entretanto, essas possibilidades ainda precisam ser melhor explorado, bem como outros potenciais alvos de ação do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3.

Trinta minutos após a sua administração, o GL-II-73 aumentou a atividade locomotora. É possível que isto possa ter influenciado nos efeitos desse composto no

LCE, nado forçado e condicionamento aversivo ao contexto, uma vez que uma maior locomoção sugere uma maior exploração do LCE, um menor tempo de imobilidade no nado forçado e um menor tempo de congelamento na sessão de extinção do condicionamento aversivo. De forma curiosa, embora todas as doses testadas de GL-II-73 (1, 5 e 10 mg/kg) em machos tenham aumentado a atividade locomotora no teste de campo aberto e o número de entradas nos braços fechados do LCE, apenas a dose de 10 mg/kg, induziu aumento na exploração dos braços abertos do LCE e diminuiu o tempo de imobilidade no nado forçado. Além disso, o GL-II-73 retardou a extinção da memória aversiva, indicado por um maior tempo de congelamento na sessão de extinção em ambos os sexos. Vale lembrar também que GL-II-73 24 horas após administração não induziu um aumento na atividade locomotora, porém exibiu um efeito tipo-antidepressivo sustentado. Mais estudos avaliando o mesmo animal nos diferentes testes comportamentais mencionados devem ser realizados para que seja possível concluir se os efeitos locomotores do GL-II-73 podem ser dissociados dos seus efeitos tipo-ansiolíticos, antidepressivos e na extinção de memórias aversivas.

Em relação aos resultados observados no teste do medo condicionado ao contexto, o GL-II-73 parece retardar o aprendizado da extinção da memória aversiva em machos e fêmeas. Além disso, em fêmeas, o GL-II-73 parece induzir um possível efeito tipo-ansio gênico (indicado por uma maior porcentagem de tempo em congelamento no primeiro bloco da sessão de extinção) e um prejuízo na retenção do aprendizado da extinção em fêmeas (indicado por uma maior porcentagem de congelamento no teste). Assim, é possível que o retardo no aprendizado da extinção da memória aversiva também possa estar associado a um efeito tipo-ansio gênico induzido pelo GL-II-73. Embora esse possível efeito tipo-ansio gênico induzido pelo GL-II-73 durante a sessão de extinção esteja em oposição ao efeito tipo-ansiolítico no

LCE, deve-se ressaltar que esses modelos envolvem contingências aversivas distintas (LCE: resposta inata vs. medo condicionado: resposta condicionada). Logo, a avaliação dos efeitos do GL-II-73 em outros testes comportamentais para o estudo da ansiedade são necessários para um melhor entendimento dos efeitos desse composto.

Quanto ao prejuízo na retenção do aprendizado de extinção (avaliado na sessão teste), este de fato ocorre quando além da diferença na porcentagem de congelamento entre grupos, observamos também que a reexposição a caixa após o período de extinção faz com que a porcentagem de congelamento do animal seja diferente do nível de congelamento durante os últimos minutos da sessão de extinção. Por isso, é importante ressaltar a necessidade de avaliar se o GL-II-73 é de fato capaz de prejudicar a retenção da memória de extinção, avaliando o congelamento na sessão de teste por um período maior. Para o SH-053-2'F-R-CH₃, houve um discreto efeito sobre a facilitação do aprendizado da extinção da memória aversiva em machos. Estudos anteriores utilizando camundongos geneticamente modificados expressando menos receptores GABA_A- α_5 demonstraram maiores níveis de congelamento em relação ao controle, indicando uma extinção prejudicada (CRESTANI; KEIST; FRITSCHY; BENKE *et al.*, 2002; YEE; HAUSER; DOLGOV; KEIST *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado que uma redução na inibição mediada por GABA_A- α_5 melhora a retenção da memória em um paradigma do medo condicionado ao som (ENGIN; SIGAL; BENKE; ZELLER *et al.*, 2020). De forma curiosa, os resultados dos estudos com o receptor GABA_A- α_5 são mistos e, às vezes, contraditórios, indicando um papel complexo do GABA_A- α_5 na extinção e retenção da memória de medo. Alguns estudos também sugerem que a ativação de receptores GABA_A- α_5 prejudica o aprendizado e a memória dependentes do hipocampo de forma

que o agonismo inversos do receptor GABA_A- α_5 tem um efeito positivo no aprendizado espacial (CHAMBERS; ATACK; CARLING; COLLINSON *et al.*, 2004; STERNFELD; CARLING; JELLEY; LADDUWAHETTY *et al.*, 2004) e o antagonismo aumenta a memória de reconhecimento de objeto (GACSÁLYI; MÓRICZ; GIGLER; WELLMANN *et al.*, 2017; LING; MIHALIK; ETHERINGTON; KAPUS *et al.*, 2015). Esses efeitos observados na cognição a partir da modulação da atividade do receptor GABA_A- α_5 podem também influenciar as respostas comportamentais induzidas pelo GL-II-73 e o SH-053-2'F-R-CH3.

Sobre as propriedades antipsicóticas do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3, foi observado que o GL-II-73 atenuou a hiperlocomoção e os prejuízos no PPI causados pelo MK-801 em machos, mas não em fêmeas. Apesar disso, o GL-II-73 *per se* induziu déficit no PPI. Já o SH-053-2'F-R-CH3, nas doses testadas, foi capaz de atenuar a hiperlocomoção e os prejuízos no PPI causados pelo MK-801 em fêmeas, mas não em machos. Efeitos tipo-antipsicóticos induzidos pelo SH-053-2'F-R-CH3 foram observados em modelos animais de esquizofrenia baseados em alterações no neurodesenvolvimento, como o modelo que emprega a administração do antimitótico acetato de metilazoximetanol (MAM) durante período gestacional e em modelo baseado em ativação imune materna (BATINIĆ; SANTRAČ; JANČIĆ; LI *et al.*, 2017; GILL; LODGE; COOK; ARAS *et al.*, 2011). Já o GL-II-73, embora tenha aumentado a atividade locomotora e induzido prejuízos no teste PPI *per se*, foi capaz de atenuar a hiperlocomoção e prejuízos no teste do PPI induzidos pelo MK-801.

Acredita-se que as alterações relacionadas a esquizofrenia induzidas pelo MK-801 sejam mediadas, principalmente, pela ação dessa droga em antagonizar receptores NMDA em interneurônios PV-positivos, resultando em diminuição na atividade desses interneurônios e, conseqüentemente, em aumento na atividade de neurônios

piramidais(O'DONNELL, 2011). Assim, a modulação positiva de receptores GABA_A- α_5 que estão localizados em neurônios piramidais poderia atenuar as alterações induzidas por antagonistas de receptores NMDA e a atividade aumentada dessa estrutura, o estado hiperdopaminérgico. Nesse contexto, no modelo MAM, que é caracterizado pela perda funcional de interneurônios PV no hipocampo(LODGE; BEHRENS; GRACE, 2009) foi observado que o aumento induzido da expressão de receptores GABA_A- α_5 no hipocampo ventral atenuou e prejuízos cognitivos em animais MAM (DONEGAN; BOLEY; YAMAGUCHI; TONEY *et al.*, 2019). Estudos anteriores modulando a atividade do hipocampo em comportamentos que requerem memória espacial, demonstram que alterar a atividade “normal” de circuitos hipocámpais, de maneira aumenta ou diminuir a ativação desses circuitos, pode perturbar o desempenho comportamental em testes envolvendo cognição, indicando a necessidade de um ajuste fino para a atividade de alguns circuitos neurais (KAHN; PORT; ANDERSON; COULTER, 2020). Tais evidências podem explicar os resultados aparentemente contraditórios do GL-II-73 ao induzir prejuízo no teste PPI *per se* e atenuar o prejuízo induzido pelo MK-801. Assim, ao modular positivamente a atividade de receptores GABA_A- α_5 expresso em neurônios piramidais, o primeiro efeito pode estar associado com o efeito do GL-II-73 em diminuir a atividade de neurônios piramidais e o segundo a normalização da atividade potencialmente aumentada de neurônios piramidais induzida pelo MK-801.

Quanto as diferenças sexuais encontradas nos testes para avaliação das propriedades antipsicóticas e na extinção da memória aversiva, estudos farmacocinéticos utilizando SH-053-2'F-R-CH₃ mediram a biodisponibilidade do composto em ambos os sexos associando os resultados com respostas comportamentais em testes como o LCE, o campo aberto e o de supressão alimentar

pela novidade. O SH-053-2'F-R-CH₃ induziu propriedades ansiolíticas e antidepressivas em fêmeas, mas não em machos (PIANTADOSI; FRENCH; POE; TIMIĆ *et al.*, 2016). Entretanto, é provável que as diferenças comportamentais específicas ao sexo não sejam explicadas pelas diferenças na disponibilidade do SH-053-2'F-R-CH₃ visto que os efeitos em machos e fêmeas diferem mesmo em momentos em que os níveis plasmáticos e cerebrais totais do composto eram semelhantes (PIANTADOSI; FRENCH; POE; TIMIĆ *et al.*, 2016). Logo, as principais causas das diferenças sexuais encontradas nos testes comportamentais podem estar associadas aos efeitos, por exemplo, dos hormônios sexuais. De fato, diferenças na prevalência de transtorno psiquiátricos, na idade de início e nos perfis de sintomas em homens e mulheres são influenciados por hormônios sexuais (MENDREK; LAKIS; JIMÉNEZ, 2011; MENDREK; MANCINI-MARİE, 2016).

Em modelos animais, estudos anteriores demonstram que a atividade locomotora induzida por anfetaminas e a interação social podem ser afetadas pelo ciclo estral em ratos expostos ao MAM (PEREZ; DONEGAN; LODGE, 2019). As fêmeas tratadas com MAM e com solução salina exibiram um aumento na atividade locomotora durante o proestro/estro quando comparado ao metaestro/diestro. Esses dados sugerem que alguns comportamentos semelhantes à esquizofrenia podem ser modulados pelos hormônios estrogênio e progesterona. Curiosamente, durante o ciclo estral, quando os níveis de progesterona são elevados, os receptores GABA_A tornam-se reorganizados para diminuir a excitabilidade neuronal (MAGUIRE; STELL; RAFIZADEH; MODY, 2005). Além disso, há muito se sabe que o próprio tratamento com estrogênio regula positivamente os receptores GABA_A no cérebro de roedores (MAGUIRE; MODY, 2007). Dada as diferenças sexuais observadas nas respostas comportamentais do tratamento com moduladores alóstericos positivos do receptor

GABA_A- α ₅, é possível sugerir que a interação com hormônios circulantes (por exemplo, estrógenos) e receptores GABA_A extra-sinápticos possa estar influenciando os resultados. No entanto, é importante ressaltar que apesar da diferença na expressão dos receptores GABA_A em diferentes fases do ciclo, mais estudos precisam ser realizados afim de elucidar se os receptores GABA_A- α ₅ também são modulados durante o ciclo estral. Estudos sobre o efeito do sexo ou do ciclo estral na expressão da subunidade α ₅ ainda são pouco conhecidos, no entanto, não podemos excluir este fator como um potencial responsável pelas diferenças nas respostas comportamentais.

Tendo em vista que a avaliação do ciclo estral não foi realizada neste estudo, é importante ressaltar que o principal foco foi investigar se existem diferenças entre machos e fêmeas na resposta aos compostos. A importância de observarmos essas diferenças é que quando estudamos o comportamento de fêmeas, por exemplo, tendo como referência apenas uma grande maioria de estudos em machos, aumentamos o potencial translacional do estudo. Isso parece ser ainda mais importante em estudos relacionados a transtornos psiquiátricos. Doenças como transtorno depressivo maior e estresse pós-traumático são duas vezes mais prevalentes em mulheres. Mas, como a maioria dos estudo empregam apenas machos (SHANSKY, 2019), acredita-se que isso tenha contribuído, por exemplo, em um menor entendimento dos mecanismos que possam estar subjacentes à maior suscetibilidade de mulheres a esses transtornos. Essas diferenças ressaltam a importância de se trabalhar com ambos os sexos. Diversos estudos optam por não trabalhar com fêmeas devido a flutuações hormonais que podem influenciar nas respostas em testes comportamentais. Entretanto, deve-se levar em conta que ambos os sexos podem apresentar variações nos níveis hormonais durante diferentes momentos. Machos, por exemplo, quando

alojados em caixas com outros machos, estabelecem uma hierarquia de dominância. Os níveis de testosterona circulante em machos dominantes são, em média, cinco vezes mais altos que nos subordinados, e assim a variabilidade dos dados no sexo masculino pode ser devido ao seu status de dominância e aos níveis hormonais correspondentes (MACHIDA; YONEZAWA; NOUMURA, 1981). Hormônios gonadais em ambos os sexos merecem o mesmo foco experimental e rigor que são aplicados para responder a qualquer outra questão científica, caso a pergunta principal envolva os hormônios sexuais. Adicionalmente, estudos futuros em fêmeas serão necessários para avaliar os efeitos do GL-II-73 e do SH-053-2'F-R-CH3 em diferentes estágios do ciclo estral.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que a modulação alostérica positiva de receptores GABA_A- α_5 pode representar uma nova abordagem terapêutica para transtornos psiquiátricos, incluindo efeitos do tipo-antidepressivos, ansiolíticos e antipsicóticos, embora diferenças sexuais possam existir. Estudos futuros devem explorar a seletividade desses compostos e avaliar o grau de afinidade pelos diferentes subtipos de receptores GABA_A e outros possíveis alvos farmacológicos. Além disso, é necessário aprofundar questões referentes aos efeitos dependentes do sexo e propor o mecanismo exato pelo qual a modulação dos receptores GABA_A- α_5 exerce seus efeitos. Tomadas em conjunto, nossos resultados apoiam a continuidade da pesquisa pré-clínica sobre a utilização de GL-II-73 e SH-053-2'F-R-CH3, dois moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA_A- α_5 como antipsicótico, antidepressivo e ansiolítico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATACK, J. R. Preclinical and clinical pharmacology of the GABAA receptor alpha5 subtype-selective inverse agonist alpha5IA. **Pharmacol Ther**, 125, n. 1, p. 11-26, Jan 2010.

BATINIĆ, B.; SANTRAČ, A.; JANČIĆ, I.; LI, G. *et al.* Positive modulation of $\alpha 5$ GABA-A receptors in preadolescence prevents reduced locomotor response to amphetamine in adult female but not male rats prenatally exposed to lipopolysaccharide. **Int J Dev Neurosci**, 61, p. 31-39, Oct 2017.

BEASLEY, C. L.; REYNOLDS, G. P. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. **Schizophr Res**, 24, n. 3, p. 349-355, Apr 1997.

BEHLKE, L. M.; FOSTER, R. A.; LIU, J.; BENKE, D. *et al.* A Pharmacogenetic 'Restriction-of-Function' Approach Reveals Evidence for Anxiolytic-Like Actions Mediated by $\alpha 5$ -Containing GABAA Receptors in Mice. **Neuropsychopharmacology**, 41, n. 10, p. 2492-2501, 09 2016.

BENHAM, R. S.; ENGIN, E.; RUDOLPH, U. Diversity of neuronal inhibition: a path to novel treatments for neuropsychiatric disorders. **JAMA Psychiatry**, 71, n. 1, p. 91-93, Jan 2014.

BODNOFF, S. R.; SURANYI-CADOTTE, B.; QUIRION, R.; MEANEY, M. J. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical antidepressant drugs in an animal model of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, 97, n. 2, p. 277-279, 1989.

BOWERY, N. G.; SMART, T. G. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. **Br J Pharmacol**, 147 Suppl 1, p. S109-119, Jan 2006.

BRICKLEY, S. G.; MODY, I. Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. **Neuron**, 73, n. 1, p. 23-34, Jan 2012.

BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ, V.; HORÁČEK, J.; VRAJOVÁ, M.; HÖSCHL, C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. **Neurosci Biobehav Rev**, 32, n. 5, p. 1014-1023, Jul 2008.

CARAISCOS, V. B.; ELLIOTT, E. M.; YOU-TEN, K. E.; CHENG, V. Y. *et al.* Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 10, p. 3662-3667, Mar 2004.

CHAMBERS, M. S.; ATTACK, J. R.; CARLING, R. W.; COLLINSON, N. *et al.* An orally bioavailable, functionally selective inverse agonist at the benzodiazepine site of GABAA alpha5 receptors with cognition enhancing properties. **J Med Chem**, 47, n. 24, p. 5829-5832, Nov 2004.

CLAYTON, T.; POE, M. M.; RALLAPALLI, S.; BIAWAT, P. *et al.* A Review of the Updated Pharmacophore for the Alpha 5 GABA(A) Benzodiazepine Receptor Model. **Int J Med Chem**, 2015, p. 430248, 2015.

CORTEZ, I. **Investigação do possível efeito antipsicótico do HU-910, um agonista seletivo de receptores canabinoide do tipo 2 (CB2)**. Orientador: Francisco Guimarães. 2018. Trabalho de conclusão de curso. Ciências Biomédicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São paulo. 2018. Disponível em: <http://www.tcc.sc.usp.br/tce/disponiveis/17/17500100/tce-03052019-114522/> em 09, fevereiro, 2021.

CRESTANI, F.; KEIST, R.; FRITSCHY, J. M.; BENKE, D. *et al.* Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 13, p. 8980-8985, Jun 2002.

CURLEY, A. A.; ARION, D.; VOLK, D. W.; ASAFU-ADJEI, J. K. *et al.* Cortical deficits of glutamic acid decarboxylase 67 expression in schizophrenia: clinical, protein, and cell type-specific features. **Am J Psychiatry**, 168, n. 9, p. 921-929, Sep 2011.

DONEGAN, J. J.; BOLEY, A. M.; YAMAGUCHI, J.; TONEY, G. M. *et al.* Modulation of extrasynaptic GABA. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 2819, 06 2019.

EHRlich, I.; HUMEAU, Y.; GRENIER, F.; CIOCCHI, S. *et al.* Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. **Neuron**, 62, n. 6, p. 757-771, Jun 2009.

ENGIN, E.; SIGAL, M.; BENKE, D.; ZELLER, A. *et al.* Bidirectional regulation of distinct memory domains by α 5-subunit-containing GABA. **Learn Mem**, 27, n. 10, p. 423-428, 10 2020.

ERNST, M.; BRUCKNER, S.; BORESCH, S.; SIEGHART, W. Comparative models of GABAA receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. **Mol Pharmacol**, 68, n. 5, p. 1291-1300, Nov 2005.

FEE, C.; BANASR, M.; SIBILLE, E. Somatostatin-Positive Gamma-Aminobutyric Acid Interneuron Deficits in Depression: Cortical Microcircuit and Therapeutic Perspectives. **Biol Psychiatry**, 82, n. 8, p. 549-559, Oct 2017.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev**, 23, n. 5, p. 743-760, May 1999.

FITCH, R. H.; THRELKELD, S. W.; MCCLURE, M. M.; PEIFFER, A. M. Use of a modified prepulse inhibition paradigm to assess complex auditory discrimination in rodents. **Brain Res Bull**, 76, n. 1-2, p. 1-7, May 2008.

FRITSCHY, J. M.; MOHLER, H. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. **J Comp Neurol**, 359, n. 1, p. 154-194, Aug 1995.

FRITSCHY, J. M.; PANZANELLI, P. GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. **Eur J Neurosci**, 39, n. 11, p. 1845-1865, Jun 2014.

GACSÁLYI, I.; MÓRICZ, K.; GIGLER, G.; WELLMANN, J. *et al.* Behavioural pharmacology of the $\alpha 5$ -GABA. **Neuropharmacology**, 125, p. 30-38, Oct 2017.

GERDIKOV, T. V.; RUDOLPH, U.; KEIST, R.; MÖHLER, H. *et al.* Hippocampal alpha 5 subunit-containing GABA A receptors are involved in the development of the latent inhibition effect. **Neurobiol Learn Mem**, 89, n. 2, p. 87-94, Feb 2008.

GERNER, R. H.; HARE, T. A. CSF GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. **Am J Psychiatry**, 138, n. 8, p. 1098-1101, Aug 1981.

GILL, K. M.; LODGE, D. J.; COOK, J. M.; ARAS, S. *et al.* A novel $\alpha 5$ GABA(A)R-positive allosteric modulator reverses hyperactivation of the dopamine system in the MAM model of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, 36, n. 9, p. 1903-1911, Aug 2011.

GRACE, A. A.; GOMES, F. V. The Circuitry of Dopamine System Regulation and its Disruption in Schizophrenia: Insights Into Treatment and Prevention. **Schizophr Bull**, 45, n. 1, p. 148-157, 01 2019.

HASLER, G.; VAN DER VEEN, J. W.; TUMONIS, T.; MEYERS, N. *et al.* Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. **Arch Gen Psychiatry**, 64, n. 2, p. 193-200, Feb 2007.

HAUSER, J.; RUDOLPH, U.; KEIST, R.; MÖHLER, H. *et al.* Hippocampal alpha5 subunit-containing GABAA receptors modulate the expression of prepulse inhibition. **Mol Psychiatry**, 10, n. 2, p. 201-207, Feb 2005.

HECKERS, S.; KONRADI, C. GABAergic mechanisms of hippocampal hyperactivity in schizophrenia. **Schizophr Res**, 167, n. 1-3, p. 4-11, Sep 2015.

JACOB, T. C. Neurobiology and Therapeutic Potential of α 5-GABA Type A Receptors. **Front Mol Neurosci**, 12, p. 179, 2019.

KAHN, J. B.; PORT, R. G.; ANDERSON, S. A.; COULTER, D. A. Modular, Circuit-Based Interventions Rescue Hippocampal-Dependent Social and Spatial Memory in a 22q11.2 Deletion Syndrome Mouse Model. **Biol Psychiatry**, 88, n. 9, p. 710-718, Nov 2020.

LEWIS, D. A.; CURLEY, A. A.; GLAUSIER, J. R.; VOLK, D. W. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. **Trends Neurosci**, 35, n. 1, p. 57-67, Jan 2012.

LI, X.; CAO, H.; ZHANG, C.; FURTMUELLER, R. *et al.* Synthesis, in vitro affinity, and efficacy of a bis 8-ethynyl-4H-imidazo[1,5a]- [1,4]benzodiazepine analogue, the first bivalent α 5 subtype selective BzR/GABA(A) antagonist. **J Med Chem**, 46, n. 26, p. 5567-5570, Dec 2003.

LING, I.; MIHALIK, B.; ETHERINGTON, L. A.; KAPUS, G. *et al.* A novel GABA(A) α 5 receptor inhibitor with therapeutic potential. **Eur J Pharmacol**, 764, p. 497-507, Oct 2015.

LODGE, D. J.; BEHRENS, M. M.; GRACE, A. A. A loss of parvalbumin-containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal model of schizophrenia. **J Neurosci**, 29, n. 8, p. 2344-2354, Feb 2009.

LUSCHER, B.; SHEN, Q.; SAHIR, N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. **Mol Psychiatry**, 16, n. 4, p. 383-406, Apr 2011.

MACHIDA, T.; YONEZAWA, Y.; NOUMURA, T. Age-associated changes in plasma testosterone levels in male mice and their relation to social dominance or subordination. **Horm Behav**, 15, n. 3, p. 238-245, Sep 1981.

MAGUIRE, J.; MODY, I. Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. **J Neurosci**, 27, n. 9, p. 2155-2162, Feb 2007.

MAGUIRE, J. L.; STELL, B. M.; RAFIZADEH, M.; MODY, I. Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. **Nat Neurosci**, 8, n. 6, p. 797-804, Jun 2005.

MCKERNAN, R. M.; WHITING, P. J. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? **Trends Neurosci**, 19, n. 4, p. 139-143, Apr 1996.

MENDREK, A.; LAKIS, N.; JIMÉNEZ, J. Associations of sex steroid hormones with cerebral activations during mental rotation in men and women with schizophrenia. **Psychoneuroendocrinology**, 36, n. 9, p. 1422-1426, Oct 2011.

MENDREK, A.; MANCINI-MARIĆ, A. Sex/gender differences in the brain and cognition in schizophrenia. **Neurosci Biobehav Rev**, 67, p. 57-78, Aug 2016.

MOHAMAD, F. H.; HAS, A. T. C. The $\alpha 5$ -Containing GABA. **J Mol Neurosci**, 67, n. 2, p. 343-351, Feb 2019.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 406, n. 6797, p. 722-726, Aug 2000.

NEELAKANTAN, H.; WARD, S. J.; WALKER, E. A. Effects of paclitaxel on mechanical sensitivity and morphine reward in male and female C57Bl6 mice. **Exp Clin Psychopharmacol**, 24, n. 6, p. 485-495, Dec 2016.

NUTT, D. GABAA receptors: subtypes, regional distribution, and function. **J Clin Sleep Med**, 2, n. 2, p. S7-11, Apr 2006.

O'DONNELL, P. Adolescent onset of cortical disinhibition in schizophrenia: insights from animal models. **Schizophr Bull**, 37, n. 3, p. 484-492, May 2011.

OLSEN, R. W.; SIEGHART, W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. **Pharmacol Rev**, 60, n. 3, p. 243-260, Sep 2008.

PEREZ, S. M.; DONEGAN, J. J.; LODGE, D. J. Effect of estrous cycle on schizophrenia-like behaviors in MAM exposed rats. **Behav Brain Res**, 362, p. 258-265, 04 2019.

PETTY, F.; SCHLESSER, M. A. Plasma GABA in affective illness. A preliminary investigation. **J Affect Disord**, 3, n. 4, p. 339-343, Dec 1981.

PIANTADOSI, S. C.; FRENCH, B. J.; POE, M. M.; TIMIĆ, T. *et al.* Sex-Dependent Anti-Stress Effect of an $\alpha 5$ Subunit Containing GABA. **Front Pharmacol**, 7, p. 446, 2016.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266, n. 5604, p. 730-732, Apr 1977.

PREVOT, T. D.; LI, G.; COOK, J. M.; SIBILLE, E. Insight into Novel Treatment for Cognitive Dysfunctions across Disorders. **ACS Chem Neurosci**, 10, n. 5, p. 2088-2090, May 2019.

PREVOT, T. D.; LI, G.; VIDOJEVIC, A.; MISQUITTA, K. A. *et al.* Novel Benzodiazepine-Like Ligands with Various Anxiolytic, Antidepressant, or Pro-Cognitive Profiles. **Mol Neuropsychiatry**, 5, n. 2, p. 84-97, Apr 2019.

PREVOT, T. D.; SUMITOMO, A.; TOMODA, T.; KNUTSON, D. E. *et al.* Reversal of Age-Related Neuronal Atrophy by $\alpha 5$ -GABAA Receptor Positive Allosteric Modulation. **Cereb Cortex**, Oct 2020.

PRICE, R. B.; SHUNGU, D. C.; MAO, X.; NESTADT, P. *et al.* Amino acid neurotransmitters assessed by proton magnetic resonance spectroscopy: relationship to treatment resistance in major depressive disorder. **Biol Psychiatry**, 65, n. 9, p. 792-800, May 2009.

RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 54, p. 483-507, 2014.

SANACORA, G.; GUEORGIEVA, R.; EPPERSON, C. N.; WU, Y. T. *et al.* Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. **Arch Gen Psychiatry**, 61, n. 7, p. 705-713, Jul 2004.

SAVIĆ, M. M.; OBRADOVIĆ, D. I.; UGRESIĆ, N. D.; BOKONJIĆ, D. R. Memory effects of benzodiazepines: memory stages and types versus binding-site subtypes. **Neural Plast**, 12, n. 4, p. 289-298, 2005.

SEMYANOV, A.; WALKER, M. C.; KULLMANN, D. M.; SILVER, R. A. Tonicity active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. **Trends Neurosci**, 27, n. 5, p. 262-269, May 2004.

SHANSKY, R. M. Are hormones a "female problem" for animal research? **Science**, 364, n. 6443, p. 825-826, May 2019.

SIGEL, E.; ERNST, M. The Benzodiazepine Binding Sites of GABA. **Trends Pharmacol Sci**, 39, n. 7, p. 659-671, 07 2018.

SILVA, N. **HUF-101, um análogo do canabidiol, previne a alodinia mecânica e térmica em modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápico**. Orientador: Francisco Guimarães. 2018. Tese de doutorado, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São paulo. 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17133/tde-18082020-212144/pt-br.php> em 09, fevereiro, 2021.

SMITH, K. S.; ENGIN, E.; MELONI, E. G.; RUDOLPH, U. Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABAA receptor subtypes in mice. **Neuropharmacology**, 63, n. 2, p. 250-258, Aug 2012.

STAMENIĆ, T. T.; POE, M. M.; REHMAN, S.; SANTRAČ, A. *et al.* Ester to amide substitution improves selectivity, efficacy and kinetic behavior of a benzodiazepine positive modulator of GABA. **Eur J Pharmacol**, 791, p. 433-443, Nov 2016.

STELL, B. M.; MODY, I. Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. **J Neurosci**, 22, n. 10, p. RC223, May 2002.

STERNFELD, F.; CARLING, R. W.; JELLEY, R. A.; LADDUWAHETTY, T. *et al.* Selective, orally active gamma-aminobutyric acid α 5 receptor inverse agonists as cognition enhancers. **J Med Chem**, 47, n. 9, p. 2176-2179, Apr 2004.

WELLMAN, C. L.; BANGASSER, D. A.; BOLLINGER, J. L.; COUTELLIER, L. *et al.* Sex Differences in Risk and Resilience: Stress Effects on the Neural Substrates of Emotion and Motivation. **J Neurosci**, 38, n. 44, p. 9423-9432, 10 2018.

YEE, B. K.; HAUSER, J.; DOLGOV, V. V.; KEIST, R. *et al.* GABA receptors containing the α 5 subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditioned fear. **Eur J Neurosci**, 20, n. 7, p. 1928-1936, Oct 2004.

ZANOS, P.; NELSON, M. E.; HIGHLAND, J. N.; KRIMMEL, S. R. *et al.* A Negative Allosteric Modulator for α 5 Subunit-Containing GABA Receptors Exerts a Rapid and Persistent Antidepressant-Like Action without the Side Effects of the NMDA Receptor Antagonist Ketamine in Mice. **eNeuro**, 4, n. 1, 2017 Jan-Feb 2017.

ZHANG, Z. J.; REYNOLDS, G. P. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. **Schizophr Res**, 55, n. 1-2, p. 1-10, May 2002.