

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2009.04.28**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2011.07.25**

(45) Data e BPI da concessão: /

(73) Titular(es):

**UNIVERSIDADE DE COIMBRA**  
**PAÇO DAS ESCOLAS 3004-531 COIMBRA** PT

(72) Inventor(es):

**JOÃO JOSÉ OLIVEIRA MALVA** PT  
**FABIENNE AGASSE** PT  
**CLARISSA DE SAMPAIO SCHINTINE** PT  
**SARA ALVES XAPELLI** PT  
**ANA PAULA PEREIRA DA SILVA MARTINS** PT

(74) Mandatário:

**MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA**  
**RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA** PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA CULTURA DE CÉLULAS ESTAMINAIS NEURAIS BASEADO NAS AMPACINAS E/OU OUTROS MODULADORES DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS, COMPOSIÇÕES E SEU USO EM CONDIÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE AO PROCESSO DE CULTURA DE CÉLULAS ESTAMINAIS BASEADO NO USO DAS AMPACINAS E/OU OUTROS MODULADORES DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS. ESTES COMPOSTOS INDUZEM UMA ACÇÃO PROLIFERATIVA E PRONEUROGÉNICA FORTE E UM EFEITO NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL QUANDO APLICADOS A CULTURAS DE SVZ. NOUTRO ASPECTO DA PRESENTE INVENÇÃO, COMPOSIÇÕES BASEADAS NAS AMPACINAS E/OU OUTROS MODULADORES DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS SÃO DESCRITOS PARA USO COMO INDUTORES DA PRODUÇÃO DE NEURÓNIOS E/OU DIFERENCIAÇÃO QUANDO APLICADOS A CULTURAS DE SVZ. ALÉM DISSO, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE TAMBÉM A COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM CULTURAS DE CÉLULAS ESTAMINAIS TRATADAS COM AMPACINAS E/OU OUTROS MODULADORES DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS E O SEU USO COMO MEDICAMENTO PARA TRATAMENTO, PREVENÇÃO E/OU INTENSIFICAÇÃO DE CONDIÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC), COMO DOENÇAS CEREBRAIS E/OU CONDIÇÕES CEREBRAIS NÃO PATOLÓGICAS. A PRESENTE INVENÇÃO É APLICÁVEL NAS ÁREAS FARMACOLÓGICAS E MÉDICAS.

## RESUMO

### **"PROCESSO PARA CULTURA DE CÉLULAS ESTAMINAIS NEURAIS BASEADO NAS AMPACINAS E/OU OUTROS MODULADORES DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS, COMPOSIÇÕES E SEU USO EM CONDIÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL"**

A presente invenção refere-se ao processo de cultura de células estaminais baseado no uso das ampacinas e/ou outros moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Estes compostos induzem uma acção proliferativa e proneurogénica forte e um efeito na diferenciação neuronal quando aplicados a culturas de SVZ.

Noutro aspecto da presente invenção, composições baseadas nas ampacinas e/ou outros moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos são descritos para uso como indutores da produção de neurónios e/ou diferenciação quando aplicados a culturas de SVZ.

Além disso, a presente invenção refere-se também a composições que compreendem culturas de células estaminais tratadas com Ampacinas e/ou outros moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e o seu uso como medicamento para tratamento, prevenção e/ou intensificação de condições do Sistema Nervoso Central (SNC), como doenças cerebrais e/ou condições cerebrais não patológicas.

A presente invenção é aplicável nas áreas farmacológicas e médicas.

## DESCRIÇÃO

### "PROCESSO PARA CULTURA DE CÉLULAS ESTAMINAIS NEURAIIS BASEADO NAS AMPACINAS E/OU OUTROS MODULADORES DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS, COMPOSIÇÕES E SEU USO EM CONDIÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL"

#### Campo técnico da invenção

A presente invenção refere-se ao processo para cultura de células estaminais neurais com ampacinas e/ou outros moduladores de receptores glutamatérgicos, composições que compreendem as células estaminais neurais e seu uso para prevenir e/ou intensificar as condições do SNC. A presente invenção tem aplicação nas áreas farmacêutica e médica.

#### Estado da técnica

O hipocampo de mamíferos pertence a um importante nicho neurogênico localizado na área subgranular do giro dentado. Nessa região do cérebro, as células estaminais neurais renovam-se, dividem-se, diferenciam-se e migram para a camada de células granulares, onde novas células são integradas (Gray e Laskowski, 2007, Kempermann et al, 2008).

Essa importante fonte neurogênica apresenta um importante papel fisiológico no hipocampo, e conseqüentemente disfunções na neurogênese resultam em disfunções comportamentais relacionadas com o circuito de memória. Pelo menos duas importantes evidências suportam o papel da neurogênese hipocampal na memória e aprendizagem: 1-o nível de neurogênese determina o desempenho da aprendizagem e memória; 2-tarefas de aprendizagem aumentam

a neurogénese e a sobrevivência de novos neurónios (Abrous e Wojtowicz, 2008).

Para além disso, já foi demonstrado que o comportamento depressivo está associado com a diminuição do sistema límbico, com um particular impacto no hipocampo. Para a aprendizagem e memória, existe ainda uma associação entre a depressão e a neurogénese. Ou seja, a depressão induz a degeneração neuronal e diminui a neurogénese hipocampal, enquanto os antidepressivos aumentam os níveis de neurogénese (Sahay et al, 2008).

Além disso, a produção de novas células aumenta nos nichos neurogénicos, especialmente na zona sub-ventricular, permitindo às células migrar e substituir neurónios mortos. Portanto, a capacidade das células estaminais progenitoras de proliferar e gerar células reparadoras está a levantar grandes expectativas referentes ao seu uso no tratamento cerebral.

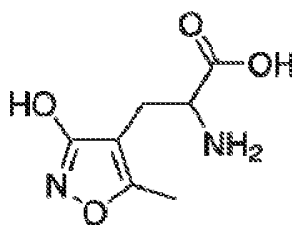
Evidências recentes mostram que a neurogénese é fortemente influenciada pela actividade neuronal, envolvendo mecanismos sinápticos e não sinápticos (Kemperman 2004, Geg, et al, 2007; Jang et al, 2008).

Um facto particularmente interessante é o efeito estimulante relatado de GABA e Glutamato na neurogénese do hipocampo e da SVZ (TozuKa et al, 2005; Platel et al, 2008). A acção espaço-temporal orquestrada dos efeitos excitatórios, devido à activação dos receptores ionotrópicos de GABA<sub>A</sub> e glutamato (Kempermann et al, 2008, Jang et al, 2008) induzem a força que move a diferenciação

celular dos progenitores neurais para células granulares pós mitóticas e neuroblastos derivados da SVZ.

Os receptores AMPA são membros da família de receptores ionotrópicos não NMDA, com o papel central na despolarização pós sináptica e na transmissão excitatória rápida. Os receptores AMPA funcionais são organizados em tetrâmeros (Glu R1-4), formando complexos dímero-dímero com o canal operado por receptor funcional. Importantes modificações pós transcricionais incluindo a edição de RNA e o processamento alternativo dos variantes flip/flop, assim como o controlo de qualidade da montagem das subunidades que ocorrem no retículo endoplasmático contribui para a diversidade existente dos receptores funcionais. Essas modificações são especialmente relevantes no que concerne à expressão da superfície da membrana, no controlo de abertura e nas propriedades de dessensibilização (Greger et al, 2007).

As ampacinas (Fórmula I) são uma família de moléculas pequenas, estruturalmente diversas, que cruzam a barreira hemato-encefálica e funcionam como moduladores alostéricos positivos de receptores AMPA.



**Fórmula I**

As ampacinas têm sido relatadas como moduladores potenciais procognitivos baseados em estudo in vivo e in

vitro (Wezenberg et al, 2007) e o seu papel nas respostas sinápticas foi apresentado inicialmente no documento W09402475.

As ampacinas funcionam ligando-se aleatoriamente a receptores particulares no cérebro, chamados de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, i.e., através da modulação da activação neuronal e da transmissão em neurónios contendo receptores glutamatérgicos. Isso aumenta a actividade do glutamato, um neurotransmissor e torna mais fácil a codificação de memória e aprendizagem.

As ampacinas não têm efeitos agonistas ou antagonistas, ao invés, estabilizam o receptor no estado aberto, seguindo-se a ligação do glutamato endógeno (Lynch e Gall, 2006).

Os efeitos relatados para as ampacinas em termos celulares- moleculares- da rede , em ratos de laboratório incluem: 1-aumento da transmissão sináptica, 2-diminuição do limiar e aumento da potencialização de longo termo; 3-aumento da expressão de BDNF, 4-aumento da actividade cerebral em estruturas associadas a efeitos comportamentais (Lynch e Gall, 2006; Lynch 2006).

A hiperactivação dos receptores de glutamato é uma causa maioritária de actividade convulsiva e de dano cerebral excitotóxico. De forma interessante, as acções modulatórias positivas dos receptores AMPA das Ampacinas, têm mostrado que essas moléculas não são tóxicas (Lynch 2006). Membros dessa família de medicamentos (BPD29, CX554, CX516, CX546, Cx614, Cx717, Farampor) têm demonstrado uma vasta aplicação terapêutica incluindo: retenção e aquisição

de memória, depressão, privação de sono, desordem de hiperactividade e défice de atenção; esquizofrenia, e outros (Lynch 2006). Em resumo, as ampacinas contribuem para estimular a actividade das redes cerebrais.

Por outro lado, dados experimentais e ensaios clínicos indicam que as ampacinas podem funcionar como moduladores cognitivos potentes, inclusive em humanos, pelo reforço da actividade hipocampal.

Contudo, ao nível de rede, os processos envolvidos pelas ampacinas em alerta, anti-depressão e melhoria do estado cognitivo não foram ainda claramente identificados. A hipótese estaria relacionada com a estimulação e o aumento da eficiência da neuro-transmissão sináptica em circuitos hipocampais.

Tem sido proposto como um tratamento da síndrome Rett após um teste favorável em modelos animais (Ogier et al, Outubro 2007).

Drogas relacionadas com a modulação da actividade de receptores de AMPA, tais como as relacionadas com a família da racetam, têm sido descritas em modelos para o tratamento de patologias neurológicas. Contudo, o seu modo de acção e os seus efeitos ainda precisam ser esclarecidos.

O documento W09921422 descreve o uso de algumas dessas drogas para o uso de esquizofrenia e desordens relacionadas. Contudo, essas composições não são capazes de induzir a acção proliferativa e/ou proneurogénica. Essa composição tem sido associada a uma melhoria da eficiência sináptica e da potencialização de longo termo na SVZ e,

portanto deve ser capaz de agir em patologias neurológicas restritas.

O documento W02005072345 apresenta drogas para melhorar os efeitos terapêuticos de um potenciador de receptor AMPA pela co-administração de um inibidor de acetilcolinesterase. Contudo, essas composições também apresentam desvantagens como as referidas acima.

A acção "proneurogénica" no sentido da presente invenção significa a capacidade de uma fonte de células estaminais neurais gerar células maduras, diferenciadas e funcionais, incluindo novos neurónios.

A presente invenção revela que a estimulação das células estaminais derivados da SVZ pelas ampacinas também envolve a proliferação e neurogénese. Por isso, as composições farmacêuticas baseadas em células estaminais neurais tratadas com ampacinas são capazes de funcionar como moduladores procognitivos e antidepressivos pelo aumento da neurogénese e portanto, têm um papel central em novas terapias celulares e farmacológicas para o tratamento e/ou prevenção de desordens no sistema nervoso central (SNC) e também no uso para manutenção e/ou aumento das habilidades cerebrais cognitivas. Estas composições são capazes não apenas de manter os efeitos de composições das ampacinas já conhecidas, mas também de melhorar as respostas do SNC em condições patológicas e não patológicas.

#### **Descrição geral da invenção**

A presente invenção refere-se à cultura de células estaminais neurais com ampacinas e/ou outros moduladores de

receptores glutamatérgicos. Outro objecto da presente invenção são as composições que compreendem as células estaminais neurais bem como o seu uso para prevenir, melhorar e tratar as condições do SNC.

O Glutamato tem sido relacionado como um importante sinal para o controlo da proliferação de neuroblastos em nichos de células estaminais no cérebro (Platel et al, 2008).

De forma a testar a hipótese de qual a activação e/ou modulação de AMPA em culturas de neuroesferas da SVZ leva a um aumento do número de células proliferantes, culturas de SVZ foram incubadas com BrdU para investigar os efeitos de AMPA e AMPAcina Cx546 na proliferação celular. Uma marcação para BrdU foi feita em células derivadas da SVZ expostas a AMPA.

Como mostrado na figura 1, neuroesferas da SVZ cultivadas sob condições proliferativas ou de diferenciação expressam receptores AMPA como foi revelado pela expressão das subunidades GluR1 e GluR2 e o tratamento com AMPA a 5 $\mu$ M induziu um aumento de aproximadamente 4 vezes na percentagem de células BrdU positivas em culturas de SVZ tratadas durante 48 horas.

A adição de CX546 teve um impacto semelhante nas culturas de SVZ em termos do aumento do número de células BrdU positivas, já que CX546 a 5 $\mu$ M induziu um aumento de duas vezes na quantidade de células BrdU+, enquanto o tratamento com CX546 a 50 $\mu$ M apresentou um aumento de quatro vezes e a 150 $\mu$ M houve o aumento de 6 vezes do número de células BrdU+ comparando com culturas não tratadas. Esses

dados mostram que AMPA e AMPAcina CX546 aumentam a incorporação de BrdU em células progenitoras neurais na SVZ de forma dependente da dose.

Com relação ao processo de diferenciação, a adição de AMPA 5 $\mu$ M resultou no aumento de aproximadamente duas vezes na percentagem de células imunoreactivas para NeuN (um marcador nuclear específico de neurónios maduros), comparado com culturas não tratadas. Culturas de células da SVZ expostas a CX546 (50 $\mu$ M e 150 $\mu$ M) mostram um aumento de duas vezes e de três vezes na percentagem de células positivas para NeuN (figura 3).

De modo a avaliar funcionalmente a diferenciação neuronal em culturas de SVZ, foi utilizado o método previamente descrito por Agasse et al, 2008; W02008100168 que é baseado na variação de  $[Ca^{2+}]_i$  em resposta à presença de KCl ou histamina.

A despolarização da membrana em células neuronais seguida de exposição de KCl em altas concentrações leva à abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e uma entrada maciça de iões  $Ca^{2+}$  no citoplasma (Ambrósio et al, 2000). Entretanto, o estímulo com histamina desencadeia um aumento intracelular de  $[Ca^{2+}]_i$  em células imaturas da SVZ (Agasse et al, 2008).

Esse método permite a rápida identificação de um rácio de resposta à exposição com histamina ou KCl (Hist/KCl). Esse rácio diferencia-se significativamente entre os grupos celulares, com uma relação Hist/KCl baixa (abaixo de 0,8) sendo característico de neurónios derivados da SVZ (Agasse et al, 2008). Assim, para investigar se AMPA e ampacina

CX546 poderiam induzir a diferenciação de células provenientes da SVZ em neurónios funcionais, foram diferenciadas neuroesferas da SVZ de 6 a 8 dias de cultivo em lâminas cobertas com poli-D-Lisina por 7 dias na presença de AMPA (100nM a 50µM) ou CX546 (500nM a 150µM).

Como mostrado na figura 4 e na figura 6, culturas de SVZ tratadas com AMPA por 7 dias apresentaram um aumento de 3 vezes na percentagem de neurónios funcionais de forma dependente da dose. Em paralelo, o tratamento com CX546 duplicou a percentagem de células neuronais em culturas de SVZ (figura 5 e figura 6).

Em contraste, culturas não tratadas apresentaram um perfil predominante de células imaturas, caracterizado por um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  em resposta a histamina, mas uma resposta pequena ou nenhuma resposta à estimulação com KCl. O perfil de diferenciação de culturas de SVZ induzido pelo tratamento com AMPA ou AMPAcina CX546 foi semelhante ao efeito proneurogénico do neuropeptídeo Y previamente observado (Agasse et al, 2008) ou ainda ao efeito de baixas concentrações do factor de necrose tumoral alfa (Bernardino et al, 2008).

O próximo ensaio foi realizado para testar se AMPA e AMPAcina CX546 poderia activar a via de sinalização celular da proteína cinase activada por stress (SAPK)-Jun amino terminal cinase (JNK) em culturas da SVZ, já que foi demonstrado que essa via de sinalização está envolvida no processo de neurogénesse (Amura et al, 2005; Agasse et al, 2008; Bernardino et al, 2008) e é activada em resposta a uma variedade de factores incluindo factores de crescimento, citocinas, radiação UV e choque térmico. Como

mostrado na figura 7, a adição de AMPA a 1 $\mu$ M ou AMPAcina CX546 5 $\mu$ M por 6 horas aumentou o número de ramificações por neuroesferas e o comprimento total de ramificações imunoreactivas JNK de tau-positivo (figura 7), quando comparado com as culturas SVZ de controlo.

Esses resultados mostram que a activação ou a modulação dos receptores AMPA aumentam a axonogénese, diferenciação e a maturação funcional de neurónios em culturas de SVZ.

Como mencionado anteriormente, a activação dos receptores AMPA pode desencadear a proliferação e a diferenciação de neuroblastos pelo aumento da concentração intracelular de cálcio (mensageiro secundário importante para a sinalização celular e funções como divisão celular) e despolarização da membrana / excitabilidade celular.

As propriedades ionotrópicas dos receptores AMPA e sua permeabilidade selectiva ao cálcio em função da ausência da subunidade GluR2, contribui para a hipótese que a activação dos receptores AMPA pode exercer um papel central na proliferação celular e maturação funcional dos neurónios.

Assim, composições baseadas nas ampacinas são interessantes para modular as propriedades de abertura dos canais dos receptores AMPA. Com o aumento da probabilidade de abertura dos receptores AMPA, as ampacinas podem selectivamente aumentar a excitabilidade dos receptores AMPA expostos ao glutamato endógeno local que é libertado de forma transiente, aumentando a excitabilidade dos progenitores neurais, mas sem propriedades tóxicas significativas.

### **1- Processo para a cultura de células estaminais:**

Células da SVZ são obtidas a partir de cérebros de ratos de laboratório de 1 a 3 dias da linhagem C57Bl6 e os cérebros são removidos após decapitação e colocados em solução HBSS (Gibco).

Os fragmentos de SVZ são dissecados em secções cerebrais de 450µm, digeridas em tripsina 0,25% e EDTA 0,2mM (Gibco) e dissociados em trituração branda com uma pipeta P1000.

A suspensão celular resultante é então diluída em meio de cultura livre de soro, composto de meio de eagle modificado de Dulbeco (DMEM F12), Glutamax (Gibco) suplementado com 100 unidades de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina, 1% de B27 (Gibco), 10ng/ml de factor de crescimento epidermal EGF (Gibco), 10ng/ml de factor de crescimento de fibroblasto básico (FGF-2, Gibco).

As células isoladas são então colocadas em placas de petri numa densidade de 100ml de células por cm<sup>2</sup>, as neuroesferas resultantes irão desenvolver-se numa atmosfera húmida a 37 °C, com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 6 a 8 dias, as neuroesferas são recolhidas com uma pipeta Pasteur e depositadas numa lamela previamente tratada com poli-D-lisina em placas de 12 poços para experiências de imageologia de cálcio ou placas de 24 poços para imunocitoquímica e depois preenchidas com 1ml ou 500µl respectivamente, de SFM livre de factores tróficos.

## **2- Avaliação da diferenciação neuronal**

Para avaliar a diferenciação neuronal das culturas de células da SVZ, as neuroesferas são desenvolvidas por 7 dias a 37 °C na ausência ou na presença de AMPA 1, 5 e 50µM ou CX546 5, 50 e 150µM (ambas de Tocris).

## **3-Imageologia de cálcio**

Para determinar o padrão de diferenciação das células de SVZ, foram analisadas variações nos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> após a estimulação com 50mM KCl e 100µM de histamina (sigma) como relatado anteriormente (Agasse et al, 2008<sup>a</sup>). A despolarização de KCl leva a um aumento dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> enquanto a estimulação com histamina leva a um aumento dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> em células imaturas. Culturas de células de SVZ são adicionadas com 5µM de Fura 2AM (molecular probes) por 40 minutos a 37 graus, 0,1% de BSA livre de ácido gordo e 0,02% de ácido plurônico F127 em Krebs (132mM).

Após 10 minutos de preenchimento das lamelas montadas numa câmara RC20 numa plataforma Ph3 (Warner) no estágio de um microscópio invertido de fluorescência Axiovert 200 (Carl Zeiss).

As células são continuamente perfundidas com solução de Krebs e estimuladas aplicando 100µM de histamina ou alta concentração de solução de Krebs com potássio (50mM KCl), substituição iso-osmótica de NaCl. As soluções são adicionadas às células por um sistema de alta pressão (95%ar 5%CO<sub>2</sub>) (Automate Scientific Berkely CA).

A concentração intracelular de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> é avaliada pela quantificação da razão de fluorescência emitida a 510nm

seguinte de excitação alternada (750ms) a 340nm e 380nm usando um aparelho Lambda DG4 (Sutter Instruments, Novato, CA) e um sistema de filtros a 510nm antes da aquisição de fluorescência com uma objectiva de 40x e uma câmara digital Coll Snap (Roper scientific, Tucson, AZ). Os valores adquiridos são processados com o software Metafluor (Universal Imaging, Downingtown, PA). Os valores de histamina/KCl para a razão de Fura-2 são calculados para determinar a extensão maturação neural das culturas.

#### **4- Avaliação imunocitoquímica**

Após fixação, por uma hora em paraformaldeído 4%, as células são permeabilizadas e os sítios não específicos são bloqueados durante 1,5h com 0,25% Triton X-100 (Sigma) e 6% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma) dissolvidos em PBS. As células são então incubadas durante a noite a 4 graus com anticorpo monoclonal anti NeuN de rato (1:200), (Chemicon), anticorpo policlonal de coelho da forma anti fosforilada da proteína cinase activada por stress (anti-p-SAPK-cjun-NH2-terminal cinase) (JNK) (1:100) e anticorpo monoclonal de ratos anti-tau (1:500) (Cell Signaling, Danvers, MAT). De seguida as lamelas são lavadas em PBS e incubadas durante 1h a temperatura ambiente com os anticorpos secundários apropriados: anticorpo de cabra e anticorpo de rato Alexa Fluor 594 (1:200), anticorpo de coelho Alexa Fluor 488 (1:200) (todos da Molecular Probes). Após lavagem com PBS as preparações celulares são incubadas durante 5 min a temperatura ambiente com Hoechst 33342 (2µg-ml, molecular Probes) em solução de PBS contendo 0,25% de BSA para marcação do núcleo. Finalmente, as preparações são montadas utilizando um meio de fluorescência Dakocitomação. As imagens de fluorescência são então

registadas numa câmara digital acoplada a um microscópio Axioscop (Carl Zeiss).

### **5- Ensaio de proliferação**

Para investigar o efeito de AMPA ou de CX546 na proliferação celular, as células de SVZ foram expostas a 10 $\mu$ M de BrdU (Sigma-Aldrich) durante as 4 horas finais de cada tratamento de AMPA ou CX546. Então, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 30 minutos e lavadas durante 30 min em 0,15M PBS à temperatura ambiente. O BrdU é então revelado e marcado seguindo-se sucessivas passagens em 1% triton X-100, 0,1M de HCl gelado em tampão borato a 37°C (0,1M, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, pH8,5), e incubado com o anticorpo de rato anti BrdU associado a uma IgG marcada Alexa Fluor 594 (1:200 Sigma) durante a noite a 4 graus. A contra marcação do núcleo e a montagem é realizada como descrito previamente.

### **6- Análise de dados estatísticos**

Em todas as experiências, a condição experimental é realizada pelo menos 3 vezes. Para as experiências de SCCI, a percentagem de células foi calculada com base num campo por cada lamela, contendo cerca de 100 células. A percentagem das células NeuN imunoreactivas são calculadas a partir das contagens celulares de 5 campos independentes em cada lamela com uma objectiva de 40X (cerca de 200 células por campo). Como nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os controlos, os dados correspondentes foram retirados de amostras e expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística das diferenças foi examinada por ANOVA seguido de um pós teste de Bonferroni para múltiplas comparações ou teste t ímpar.

Na presente invenção, é descrito um processo para a cultura de células de SVZ com ampacinas e/ou outros moduladores dos receptores de glutamato ionotrópicos.

Noutro aspecto da presente invenção, são descritas composições compreendendo a cultura de SVZ tratadas com ampacinas e/ou outros moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, de acordo com esse processo.

Outros moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos podem ser seleccionados a partir do grupo: (±)-ácido sólido-2 amino-4 fosfonobutírico, (±) AMPA hidrobromdo, (±) hidrocloreto de cetamina, (±)-MK-801 hidrogeno maleato, (2S,4R)-4-ácido metilglutâmico, 1-ácido hidrocloreto aminociclopropanocarboxílico, 1-naftilacetil espermina trihidroclorídico, 2,6-Difluor-4-[2-(tio-(fenil-sulfonil-amino)-etil)-fenoxi-acetamida, 6,7-Dicloroquinoxalina-2,3-diona, ácido D-Homocisteínasulfínico, ácido DL-2-amino-5-fosfonopentanóico, ácido DL-2-amino-7-fosfonoheptanóico, L cisteína hidrocloreto monohidrato, ácido L-Homocisteico, ATPO, ATPA, complexo CNBQX-HBC, CX546, ciclotiazida, N-(3,3-difenilpropil)glicinamida, PEAQX tetrasódio hidrato, ácido  $\gamma$ -D-glutamilaminometilsulfónico e outros.

Os compostos da família racetam podem estar compreendidos na presente invenção, tais como Piracetam, Oxiracetam, Aniracetam, Pramiracetam, fenilpiracetam, Etiracetam, levetiracetam, Nefiracetam, Nicoracetam, Rolziracetam, Nebracetam, Fasoracetam, Imuracetam, Coluracetam, Dimiracetam, Brivaracetam, Seletacetam, Rolipram e outros.

As células estaminais usadas na presente invenção podem ser adultas ou exclusivamente de origem não-humana.

Outras substâncias activas podem ser adicionadas à composição básica para aumentar e/ou potenciar o efeito das ampacinas e/ou outros moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos.

Assim, em outro aspecto da presente invenção, a composição baseada em células de SVZ tratadas com ampacinas e/ou outros moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos pode incluir outras substâncias activas, como substâncias activas com efeito neurológico e/ou antibióticos. Essas substâncias activas podem ser seleccionadas a partir do grupo: haloperidol, flufenazina, perfenazina, cloropromazina, molidona, pimozida, trifluoperazina, tioridazina, clozapina, risperidona, olanzepina, sertindola, ziprasidona, seroquel, zotepina, amilsulpride, iloperidona e outros. Nesse sentido, compostos com o efeito inibitório da acetilcolinesterase podem também ser seleccionados.

Além do mais, as composições descritas podem ainda incluir, veículos, suportes e excipientes farmacológicos aceitáveis e/ou outras substâncias activas comumente aceitáveis e usadas na farmacologia, como corantes, conservantes, estabilizadores, aromatizantes, etc, seleccionados de forma adequada ao método de administração escolhido.

Em outro aspecto da presente invenção, as composições descritas podem ser apresentadas em forma de tabletes, cápsulas, ampolas, líquido e gel e/ou formulações de libertação controlada.

As composições de culturas de SVZ da presente invenção são usadas para prevenir, reparar e ou intensificar as condições do Sistema Nervoso Central. Essas condições estão relacionadas não somente a condições patológicas, mas também condições não patológicas como o aumento das capacidades cognitivas, como manutenção e aumento da capacidade de memória.

Condições patológicas na presente invenção incluem condições crónicas como a depressão crónica.

Outras situações patológicas que se incluem na presente invenção são: condições cognitivas, depressão aguda, disfunções psiquiátricas, esquizofrenia, condições neurodegenerativas como as doenças de Parkinson e Alzheimer, acidente vascular cerebral e/ou outras condições neuropáticas na qual ocorre perda neuronal.

Condições não patológicas compreendem, por exemplo, situações nas quais o desempenho cognitivo é insuficiente, como a manutenção da vitalidade, memória, etc.

As composições que compreendem as células estaminais da presente invenção podem ser usadas em técnicas de transplante para reparar condições ou injúrias do SNC, para prevenir perdas de capacidades cognitivas e/ou aumentar as capacidades relacionadas com o desempenho neuronal.

Noutro aspecto da presente invenção é descrito o uso das composições de ampacinas no tratamento de células estaminais neurais.

### **Descrição das figuras**

Figura 1: Culturas de células progenitoras derivadas da SVZ expressam subunidades de receptores AMPA GluR1 e GluR2 em condições de proliferação (linha de cima) e em condições de diferenciação (linha de baixo). Linha de cima: microscopia confocal de neuroesferas processadas para o protocolo de centrifugação (Cytospin). Linha de baixo: neuroesferas cultivadas em condições de diferenciação na presença de poli-D-lisina e na ausência de factores de crescimento.

Figura 2: AMPA e CX546 estimulam a proliferação celular em culturas de SVZ sob condições de diferenciação. Azul: marcação com Hoechst 33342; Vermelho: marcação anti BrdU em células em divisão.

Figura 3: AMPA e AMPAcina CX546 aumentam a diferenciação neuronal em culturas de SVZ cultivadas em condições proliferativas. A diferenciação neuronal foi avaliada pela quantificação do número de células imunopositivas para o marcador neuronal NeuN.

Figura 4: A exposição de culturas de células progenitoras derivadas da SVZ a AMPA resulta num efeito proneurogénico robusto. O efeito proneurogénico mediado por receptores AMPA é sensível à inibição do composto GYK52466. A exposição a AMPA induz o aumento do número de células com respostas neuronais com uma diminuição paralela do número de células que respondem à histamina. A inibição dos receptores AMPA com o uso do composto GYK52466 mudou o perfil de resposta para níveis comparados aos do controlo.

Figura 5: A exposição de culturas de células da SVZ a AMPAcina CX546 resulta num robusto efeito proneurogénico. Esse efeito proneurogénico mediado por receptores AMPA é sensível à inibição com o composto GYK52466. A exposição a ampacina induz o aumento do número de células que respondem ao KCl, com um efeito paralelo de diminuição do número de células que respondem ao estímulo com histamina. A inibição dos receptores AMPA com o uso do composto GYK52466 mudou o perfil de resposta para níveis comparados aos do controlo.

Figura 6: A exposição de culturas de SVZ a AMPA ou a moduladores dos receptores de AMPA como as AMPAcinas CX546 resulta numa robusta diferenciação neuronal. A exposição a AMPA aumenta o número de células que respondem ao KCl com efeito paralelo de diminuição da resposta ao estímulo com histamina.

Figura 7: A incubação de culturas de SVZ com AMPA ou AMPAcina CX546 por 6 horas resultou num aumento do número de ramificações JNK+ que migravam a partir das neuroesferas. Além disso, foi observado um robusto aumento no comprimento total de ramificações marcadas para JNK.

### **Exemplos**

**Exemplo 1:** Estabelecimento de culturas de SVZ:

Células da SVZ foram obtidas a partir de cérebros de ratos de 1 a 3 dias de idade da linhagem C57Bl/6. Os cérebros foram removidos após decapitação e colocados em solução de HBSS.

Fragmentos de SVZ foram dissecados e cortados em secções coronais de 450µm, digeridos em tripsina 0,25% e 0,265mM de

EDTA e foram dissociados por trituração suave com uma pipeta P1000.

A suspensão celular foi diluída em meio de cultura sem soro (D-MEM-F12 Glu-MAX-I, Gibco) suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco), 1% de B27 (Gibco), 10 ng/ml de factor de crescimento epidermal (EGF; Gibco), e 10 ng/ml factor de crescimento de fibroblasto (FGF-2; Gibco).

As células individuais foram então colocadas em placas de Petri na densidade de 3000 células/cm<sup>2</sup>.

As neuroesferas resultantes foram cultivadas em câmara humidificada a 37 °C, contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 6 a 8 dias de cultivo, as neuroesferas foram recolhidas e colocadas em placas de 12 poços ou 24 poços em lamelas tratadas com poli-D-lisina para experiências de imunocitoquímica e cobertas com 1ml ou 500µl de meio na ausência de factores tróficos.

**Exemplo 2:** Diferenciação neuronal em culturas de SVZ tratadas com AMPAcina CX546 nas concentrações de 0,8 a 500µM. As culturas de SVZ foram isoladas e diferenciadas de acordo com o exemplo 1 e preparadas para imageologia de cálcio após 7 dias de incubação na presença de CX546 (0,8 a 500µM) e de acordo com os procedimentos da "Descrição Geral da Invenção -3. Imageologia de Cálcio de Células Individuais".

A avaliação da resposta neuronal ao cálcio (relação Histamina/KCl abaixo de 0,8) resulta numa percentagem que varia entre 15 a 45%.

**Exemplo 3:** Diferenciação neuronal de culturas de SVZ na ausência de ampacina ou outros moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos. As culturas de SVZ foram isoladas e diferenciadas de acordo com o exemplo 1 e preparadas para imageologia de cálcio na ausência de CX546 de acordo com os procedimentos da "Descrição Geral da Invenção -3. Imageologia de Cálcio de Células Individuais".

A avaliação da resposta neuronal ao cálcio (relação Histamina/KCl abaixo de 0,8) resulta numa percentagem que varia entre 5 a 12%.

#### **Referências:**

\*Abrous DN and Wojtowicz JM. "Neurogenesis and hippocampal memory system", in: Adult neurogenesis; Edited by FH Gage, G Kempermann and Song H; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2008).

\*Ambrósio AF, Silva AP, Malva JO, Mesquita JF, Carvalho AP and Carvalho CM. Role of desensitization of AMPA receptors on the neuronal viability and on the  $[Ca^{2+}]_i$  changes in cultured rat hippocampal neurons. Eur J Neurosci 2000, 12:2021-2031.

\*Amura CR, Marek L, Winn RA, Heasley LE. Inhibited neurogenesis in JNK1-deficient embryonic stem cells. Mol Cell Biol. 2005 25:10791-10802.

\*Agasse F, Bernardino L, Silva B, Ferreira R, Grade S and Malva JO. Response to histamine allows the functional identification of neuronal progenitors, neurons,

astrocytes, and immature cells in subventricular zone cell cultures. *Rejuvenation Res* 2008a, 11:187-200.

\*Agasse F, Bernardino L, Kristiansen H, Christiansen SH, Ferreira R, Silva B, Grade S, Woldbye DP and Malva JO.

Neuropeptide Y promotes neurogenesis in murine subventricular zone. *Stem Cells* 2008b, 26:1636-1645.

\*Bernardino L, Agasse F, Silva B, Ferreira R, Grade S and Malva JO. Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. *Stem Cells* 2008,23 26:2361-71.

\*Galvão RP, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J*

*Neurosci.* 2008, 28:13368-13383.

\*Ge S, Pradhan DA, Ming GL and Song H. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 2007, 30: 1-8.

\*Gray W and Laskowski A. "Glia and hippocampal neurogenesis in the normal, aged and epileptic brain", in: *Interaction between neurons and glia in aging and disease*; Edited by JO Malva, AC Rego, RA Cunha and CR Oliveira; Springer, New York (2007).

\*Greger IH, Ziff EB and Penn AC. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends Neurosci* 2007, 30: 407-416.

\*Jang M-H, Song H and Ming G-l. "Regulation of adult neurogenesis by neurotransmitters", in: *Adult neurogenesis*; Edited by FH Gage, G Kempermann and Song H; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2008).

\*Jourdi H, Hamo L, Oka T, Seegan A, Baudry M. BDNF mediates the neuroprotective effects of positive AMPA receptor

modulators against MPP(+)-induced toxicity in cultured hippocampal and mesencephalic slices. *Neuropharmacology*. 2009, 56,876-85.

\*\*Kempermann G, Jessberger S, Steiner B and Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosci* 2004, 27: 447-452.24

\*Kempermann G, Song H and Gage FH. "Neurogenesis in the adult hippocampus", in: *Adult neurogenesis*; Edited by FH Gage, G Kempermann and Song H; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2008).

\*Lynch G. Glutamate-based therapeutic approaches: ampakines. *Current Opinion in Pharmacology* 2006, 6: 82-88.

\* Lynch G and Gall CM. Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement. *Trends Neurosci* 2006, 29: 554-562.

\* Ogier M, Wang H, Hong E, Wang Q, Greenberg ME, Katz DM (October 2007). "Brain-derived neurotrophic factor expression and respiratory function improve after ampakine treatment in a mouse model of Rett syndrome". *J. Neurosci*. 27 (40): 10912 7.

\*Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain- derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*. 2001, 21:6706-6717.

\*Platel JC, Dave KA and Bordey A. Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol* 2008, 586: 3739-3743.

\*Sahay A, Hen R and Duman RS. "Hippocampal neurogenesis: depression and antidepressant responses", in: *Adult neurogenesis*; Edited by FH Gage, G Kempermann and Song H; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2008).25

\*Simmons DA, Rex CS, Palmer L, Pandyarajan V, Fedulov V, Gall CM, Lynch G. Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106:4906-4911.

\*Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T and Hisatsune T. GABAergic Excitation Promotes Neuronal Differentiation in Adult Hippocampal Progenitor Cells. Neuron 2005, 47 :803-815

\*Wezenberg E, Verkes RJ, Ruijt GS, Hulstijn W and Sabbe BG. Acute effects of the ampakine farampator on memory and information processing in healthy elderly volunteers. Neuropsychopharmacology 2007, 32: 1272-1283.

Lisboa, 21 de Março de 2011

## REIVINDICAÇÕES

1-Processo de cultura de células da SVZ caracterizado por compreender a presença de pelo menos uma Ampacina e/ou outros moduladores de receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

2-Processo, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por os moduladores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos serem AMPA.

3-Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a concentração de AMPA ser de pelo menos  $1\mu\text{M}$ .

4-Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a Ampacina ser CX546.

5- Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por a concentração da Ampacina CX546 ser de pelo menos  $5\mu\text{M}$ .

6- Composições caracterizadas por compreenderem células da SVZ tratadas de acordo com o processo descrito nas reivindicações anteriores.

7- Composições, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizadas por compreenderem ainda outras substâncias activas, preferencialmente substâncias activas com efeito neurológico.

8-Composições, de acordo com as reivindicações 6 a 7, caracterizadas por compreenderem ainda veículos, suportes

excipientes e/ou outras substâncias farmacologicamente aceitáveis e usadas em farmacologia.

9-Composições, de acordo com as reivindicações 6 a 8, caracterizadas por apresentarem a forma de tabletes, cápsulas, ampolas, líquido, gel e/ou outras formulações de libertação controlada.

10- Composições, de acordo com as reivindicações de 6 a 9, caracterizadas por serem usadas como medicamento.

11- Composições, de acordo com as reivindicações de 6 a 9, caracterizadas por serem usadas para o tratamento ou prevenção de distúrbios do SNC.

12- Composições, de acordo com as reivindicações de 6 a 9, caracterizadas por serem usadas como estimulantes do SNC.

Lisboa, 21 de Março de 2011

**GluR1**



**GluR2**

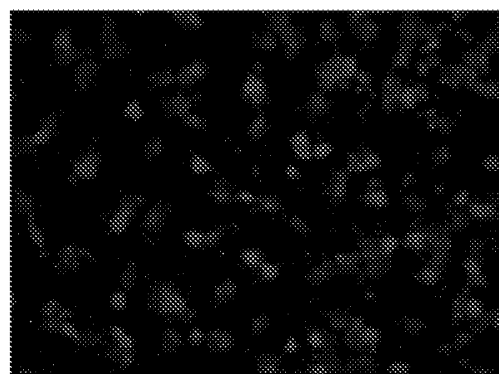
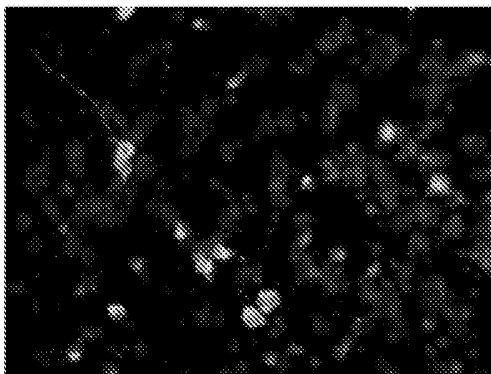


Figura 1

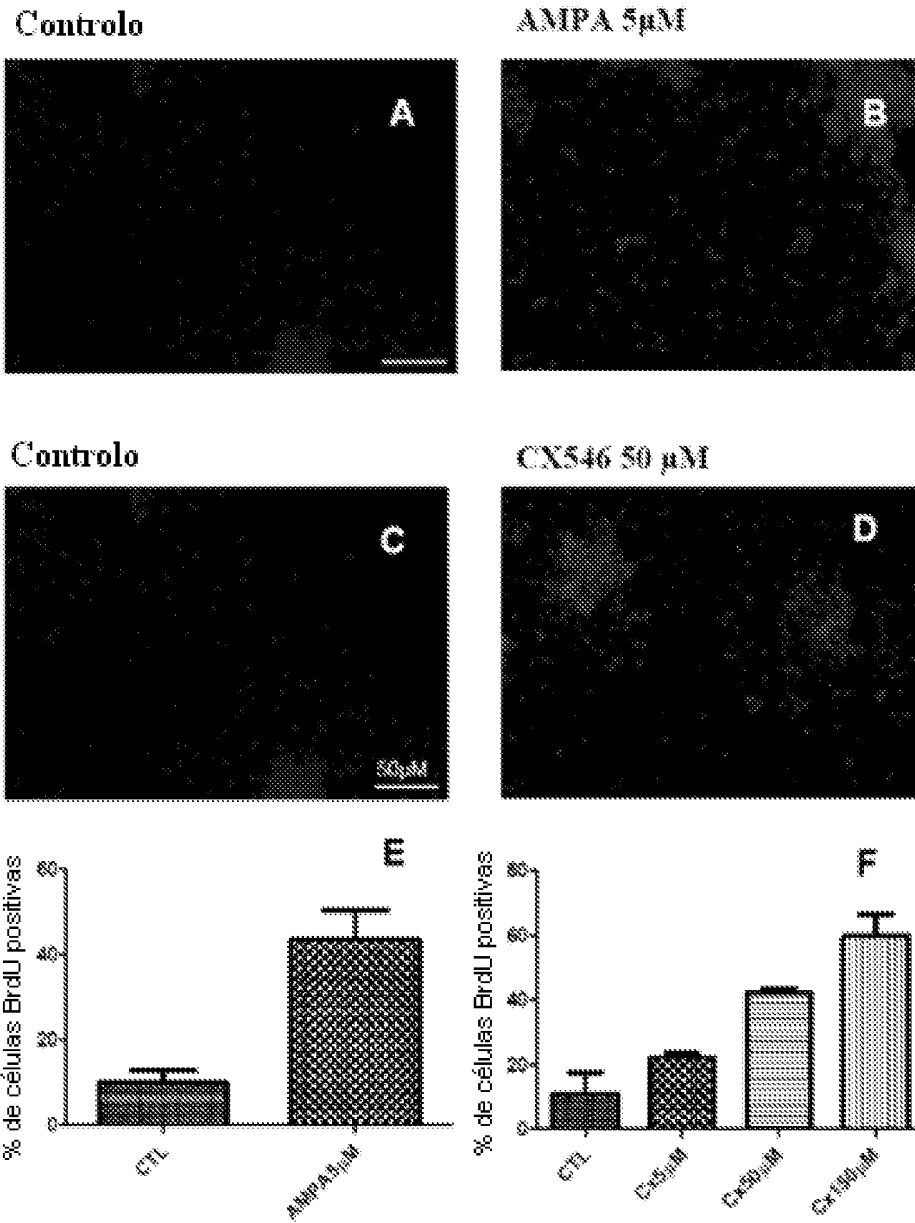


Figura 2

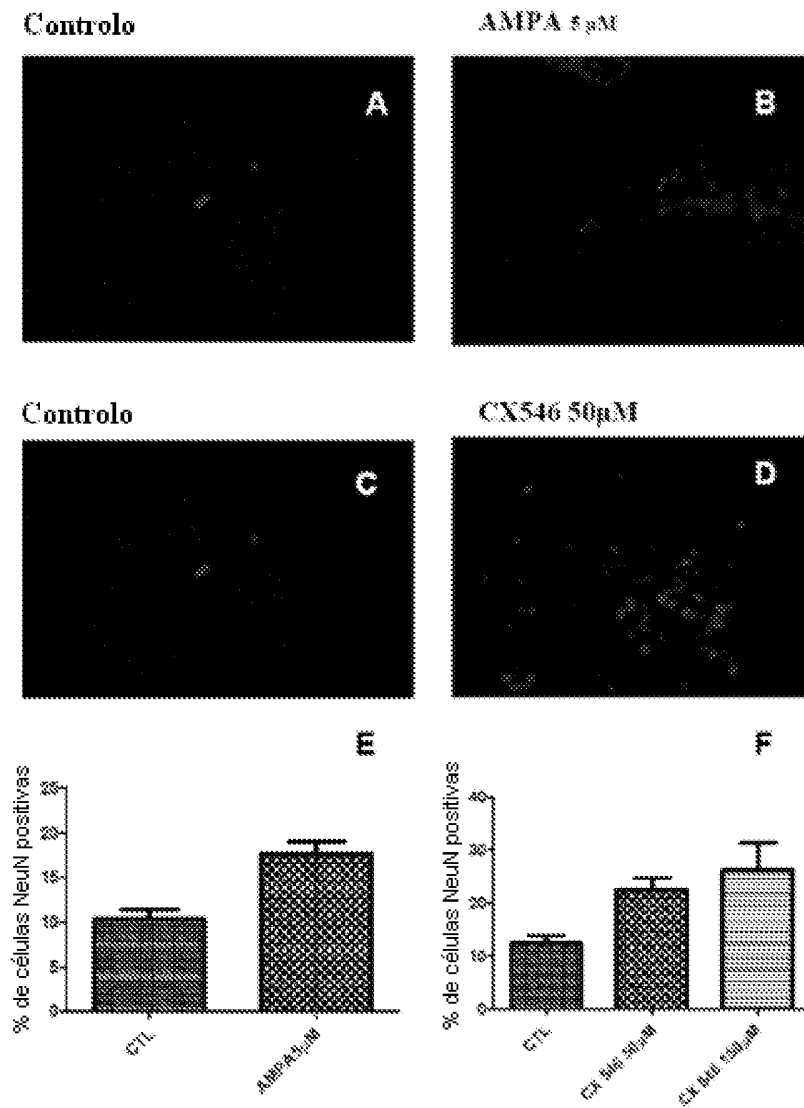
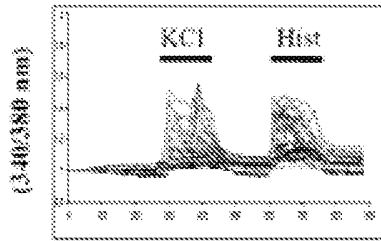
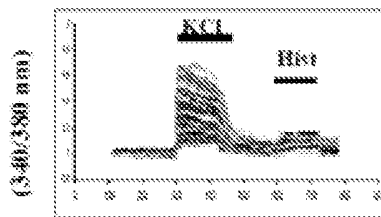


Figura 3

Controlo



AMPA 5µM



AMPA 5µM + GYK 10µM

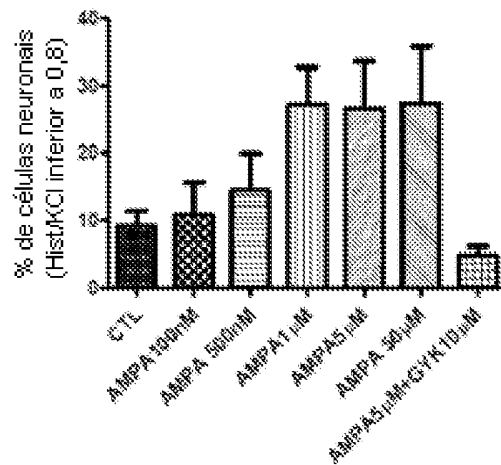
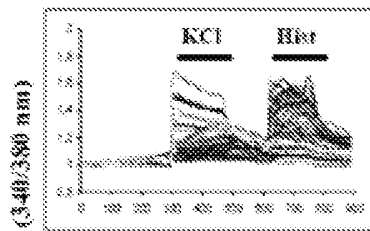
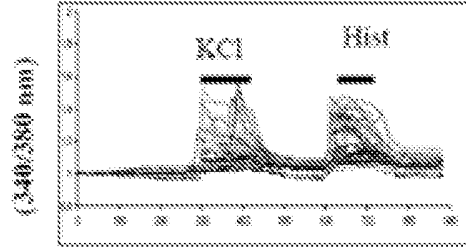
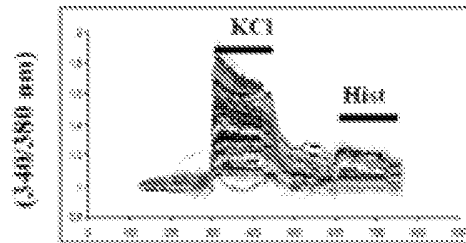


Figura 4

Controlo



CX546 50  $\mu$ M



CX546 50 $\mu$ M+ GYK 10 $\mu$ M

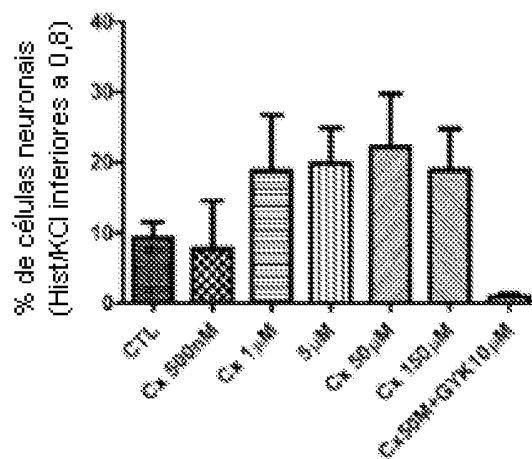
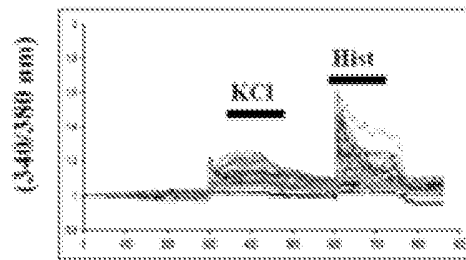
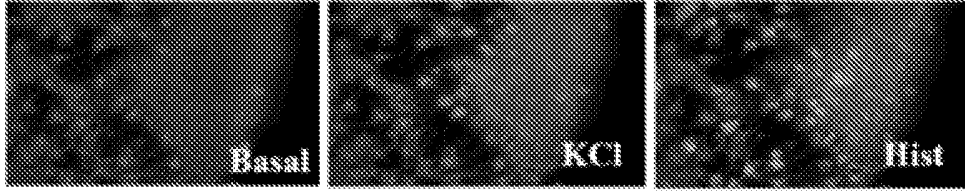
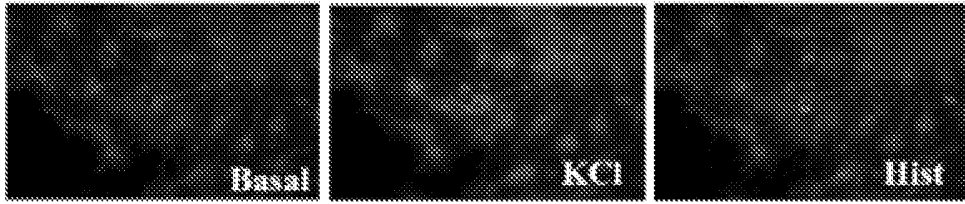


Figura 5

**CONTROLO**



**AMPA 5 $\mu$ M**



**CX 546 50 $\mu$ M**

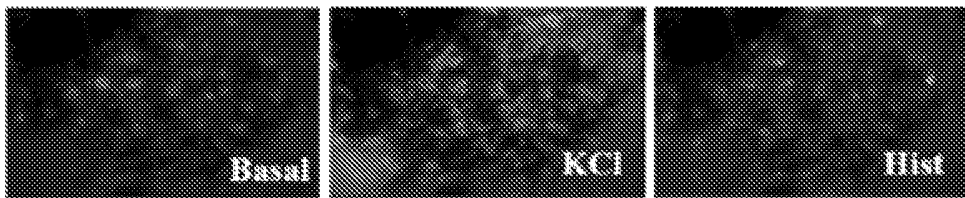


Figura 6

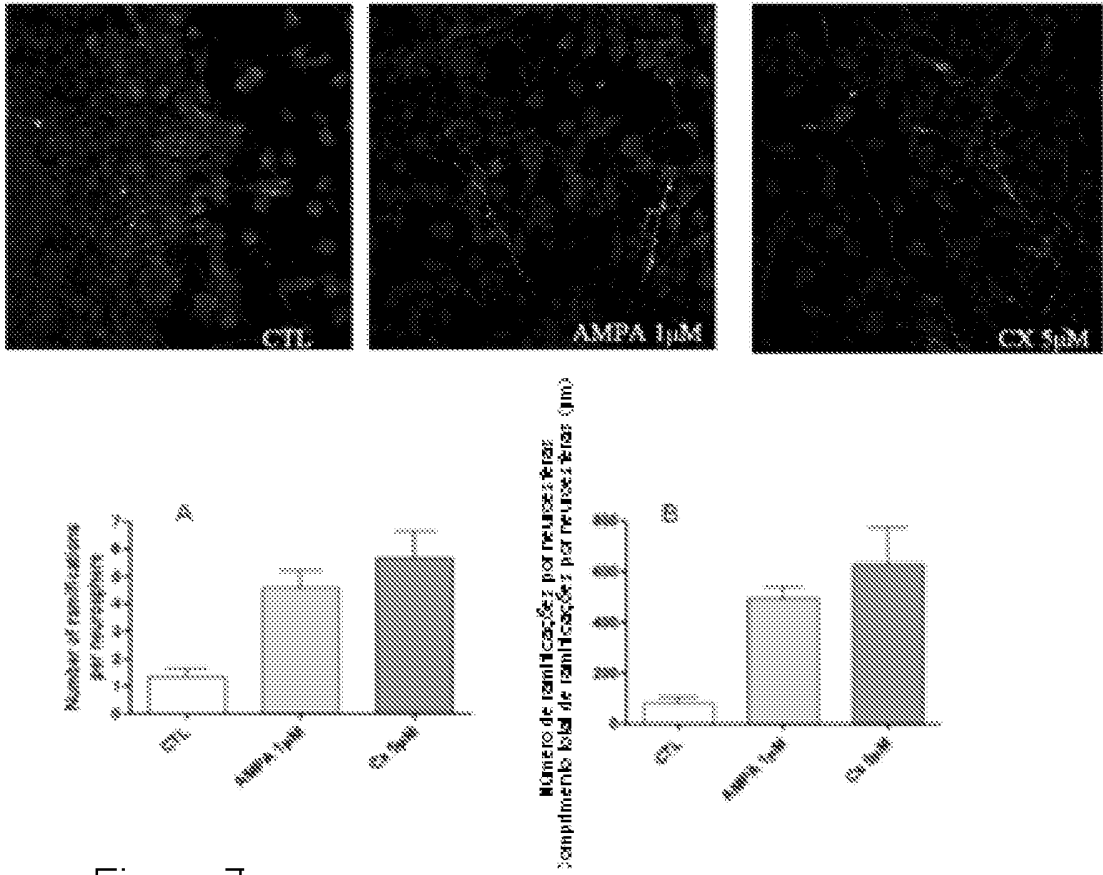


Figura 7