UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO NEUROPROTETOR DA SARCOSINA EM MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

BRUNO LEMES MARQUES

Goiânia - GO
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

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

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

1. Identificação do material bibliográfico

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

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

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

2. Nome completo do autor

Bruno Lemes Marques

3. Título do trabalho

Efeito neuroprotetor da sarcosina em modelo animal de isquemia cerebral focal

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

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

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período,a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista cientifica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

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

Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto**, **Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 21:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º doart. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **BRUNO LEMES MARQUES**, **Discente**, em 30/11/2022, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543,de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando ocódigo verificador **3367481** e o código CRC **C2DF260E**.

Referência: Processo nº 23070.060571/2022-99

SEI nº 3367481

BRUNO LEMES MARQUES

EFEITO NEUROPROTETOR DA SARCOSINA EM MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Ciências Biológicas Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto

Goiânia – GO

2022

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

Marques, Bruno Lemes
Efeito neuroprotetor da Sarcosina em modelo animal de isquemiacerebral focal [manuscrito] / Bruno Lemes Marques. - 2022.
LX, 60 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Institutode Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas , Goiânia, 2022.
Bibliografia. Anexos.
Inclui abreviaturas, gráfico, lista de figuras.

1. Neuroproteção. 2. Sarcosina. 3. Isquemia Cerebral. I. Pinto,Mauro Cunha Xavier , orient. II. Título.

CDU 57

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Ata nº 550 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Bruno Lemes Marques** o título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Ciências Biológicas Farmacologia e Fisiologia.

Aos quatro dias do mês de novembro de 2022, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "Avaliação do efeito neuroprotetor da inibição dostransportadores de glicina do tipo 1 em modelo animal de isquemia cerebral". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Mauro Cunha Xavier Pinto (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Célio José de Castro Júnior (Faculdade Santa Casa BH), membro titular externo; Professora Doutora Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino (UFMT), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Mauro Cunha Xavier Pinto, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, paraconstar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos quatro dias do mês de novembro de 2022.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Efeito neuroprotetor da sarcosina em modelo animal de isquemia cerebral focal

Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto**, **Professor do Magistério Superior**, em 09/11/2022, às 00:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º doart. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino**, **Usuário Externo**, em 09/11/2022, às 15:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º doart. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro**, **Coordenador de Pós- graduação**, em 29/11/2022, às 10:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3ºdo art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3310900** eo código CRC **89B00E47**.

Referência: Processo nº 23070.060571/2022-99

SEI nº 3310900

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho aos meus pais Roberto e Cláudia, à minha irmã Bianka, meus padrinhos Ildefonso e Cleide, aos meus primos/irmãos Fernando e Lohanny, aos meus avós Maria e João, aos meus tios Cacilda e Adair, aos meus amigos Paulo Roger, João Pedro, Ian, Vitor e Gustavo, minhas amigas Lavynia, Yllana, Rafaela, Raphaela e ao grande amor da minha vida Adryane. Sem o apoio incansável de todos vocês eu nunca teria chegado aonde cheguei agora. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de começar meus agradecimentos relembrando que todos os que aqui serão citados fizeram parte tanto da construção da minha carreira profissional como também do meu desenvolvimento como pessoa.

Muito obrigado Pai e Mãe por terem me concebido e me auxiliado nessa longa jornada de estudos desde os meus 5 anos. Sei que vocês podem pensar que não, mas são muito amados por mim! Muito obrigado Vô e Vó por também terem sido meus pais e terem me dado alento, colo e estabilidade durante toda minha vida. Sem vocês eu sei que nunca seria o homem que sou hoje.

Muito obrigado Padrinho e Madrinha, por terem sido conselheiros, amigos e pais que sempre me incentivaram, tanto financeiramente como emocionalmente em todos os problemas e aventuras que minha carreira profissional proporcionou. Tudo isso é fruto do investimento que vocês fizeram em mim e, um dia, irei retribuir tudo que fizeram com tanto amor.

Muito obrigado a todos os meus amigos, que dividiram as tristezas e alegrias dessa jornada e que estiveram e ainda estão dispostos de serem amigos com quem eu posso contar para qualquer aventura. Vocês são a família que escolhi ter!

Por fim, muito obrigado ao meu amor Adryane, por não somente ter acreditado em mim mesmo quando eu não acreditei, como por ter me ajudado a me tornar um homem melhor nesses últimos anos. Eu sei que você está disposta a passar os dias bons e ruins ao meu lado e isso me faz sentir capaz de realizar qualquer coisa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVE - Acidente Vascular Encefálico

NMDAR - Receptor de N-Metil-D-Aspartato

GlyT1 - Transportador de Glicina do Tipo 1

SNC - Sistema Nervoso Central

ATP - Adenosina Trifosfato

CAT - Catalase

GPX - Glutationa Peroxidase

rTPA - Ativador de Plasminogênio Tecidual Recombinante

GluT - Transportador de glutamato

LTP - Potenciação de longo-prazo

LTD - Depressão de longo-prazo

ABC - Cassete de ligação de ATP

SLC - Transportadores de soluto

GlyT2 - Transportador de glicina do tipo 2

PCP - Fenciclidina

MCAO - Oclusão de artéria cerebral média

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

TrkB - Receptor tirosina quinase B

CaMKII - Cálcio/Calmodulina quinase II

CaMKIV - Cálcio/Calmodulina quinase IV

CREB - Elemento de resposta a AMPc

mTOR - Alvo mamífero da Rapamicina

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

VEGFR2 - Receptor de fator de crescimento vascular endotelial 2

Sumário

1.Justificativa: Impacto e Relevância para a sociedade 15

2. Introdução 17

2.1. Acidente Vascular Encefálico Isquêmico 17

2.2. Estratégias terapêuticas para o AVE isquêmico 21

2.3. Alvos terapêuticos em fase de pesquisa 22

2.4. Receptores de NMDA: uma perspectiva geral 23

2.5. Receptores de NMDA na fisiopatologia da isquemia cerebral 25

2.5.1. Excitotoxicidade 25

2.6. Pré-condicionamento isquêmico 27

2.7. Glicina 29

2.8. Transportadores de Glicina 31

2.9. Inibidores dos transportadores de glicina do tipo 1 35

2.10. Reparo tecidual após isquemia 37

3. Objetivos 40

3.1. Objetivo geral 40

3.2. Objetivos específicos 40

4. Materiais e Métodos 41
4.1. Animais experimentais 41
4.2. Desenho experimental 41
4.3. Modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) 41
4.4. Avaliação motora dos animais 42
4.4.1. Teste do Cilindro 42
4.4.2. Teste de Limb Clasping 43
4.4.3. Western Blotting 43
4.4.4. Imunofluorescência 44
4.4.5. Análise Estatística 45
5. Resultados 45
5.1. Sarcosina promove efeito neuroprotetor em modelo animal de isquemia cerebral 45
5.2. Pré-tratamento com Sarcosina promove mudanças na expressão dos transportadores de glicina e do receptor de glicina 47
5.3. Pré-tratamento com Sarcosina promove alteração na expressão de receptores de NMDA e suas sinalizações intracelulares 47
5.4. Pré-tratamento com Sarcosina promove aumenta de expressão de BDNF e aumento de atividade da via de sinalização TrkB/Akt/mTOR 49
5.5. Pré-tratamento com Sarcosina não altera a sinalização do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) 51
6. Discussão 52
7.Conclusão 54
8.Referências 57
9.Anexos 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das etapas de formação da lesão cerebral pós-isquemia, evidenciando o núcleo isquêmico e a zona de penumbra.....17
Figura 2. Representação esquemática da cascata de eventos celulares relacionados com a fisiopatologia da isquemia cerebral.....20
Figura 3. Representação esquemática dos sítios de ligação e das subunidades que compõem o receptor de NMDA.....25
Figura 4. Distribuição neuroanatômica dos transportadores de glicina.....33
Figura 5. Distribuição celular dos transportadores de glicina.....34
Figura 6. Efeitos neuroprotetores da Sarcosina em modelo animal de isquemia cerebral.....46
Figura 7. Pré-tratamento com Sarcosina promove alteração na transmissão glicinérgica e na recaptação de glicina no córtex cerebral.....47
Figura 8. Pré-tratamento com Sarcosina promove alteração na composição de

subunidades do receptor NMDA e nas vias de CaMKIIα/CaMKIV/CREB.....49
Figura 9. Pré-tratamento com Sarcosina promove aumento da expressão de BDNF, estimula a atividade de TrkB, e aumenta a sinalização intracelular de PI3K/Akt/mTOR.....50
Figura 10. O pré-tratamento com Sarcosina não altera a expressão de VEGF e sua respectiva sinalização intracelular.....51
Figura 11**.** Sarcosina promove efeito neuroprotetor e de reparo tecidual pós-isquemia por vias diferentes.....55

RESUMO

O AVE (Acidente Vascular Encefálico) é caracterizado por uma perturbação no fornecimento de sangue cerebral, levando à privação de oxigênio e glicose ao tecido. A isquemia cerebral envolve uma liberação aumentada de glutamato, ativação anormal de NMDAR (receptores de N-Metil-D-Aspartato), e excitotoxicidade. O transportador de glicina tipo 1 (GlyT1) modula a neurotransmissão glutamatérgica através de receptores NMDA, sugerindo uma estratégia terapêutica alternativa para o AVE. Este trabalho investigou o potencial neuroprotetor e de reparo neuronal da inibição de GlyT1 num modelo de isquemia focal em camundongos. Camundongos Swiss submetidos à oclusão permanente da artéria cerebral média (MCAO) foram randomicamente selecionados para receber três doses diferentes de Sarcosina (125, 250, e 500 mg/kg, injeção intraperitoneal) ou veículo antes ou depois da isquemia. O pré-tratamento com 250 e 500 mg/kg de sarcosina levou à neuroprotecção contra o AVE, como demonstrado pela redução da área de infarto e déficits neurológicos. Além disso, as vias de GluN2A/CaMKIV/CREB e BDNF/TrKB/Akt/mTOR foram estimuladas pela sarcosina. A

neuroproteção da sarcosina está também relacionada com a diminuição da atividade da subunidade GluN2B e com uma diminuição da fosforilação de CaMKIIα. Portanto, a neuroproteção induzida pela sarcosina ocorre através da via de BDNF/TRKB e CaMKIV/CREB, ambos os processos desencadeados pela atividade de NMDAR.

Palavras-chave: Isquemia, Neuroproteção, Reparo tecidual, GlyT1, Sarcosina

ABSTRACT

Stroke is characterized by a disruption in the cerebral blood supply, leading to oxygen and glucose deprivation to the tissue. Cerebral ischemia involves enhanced glutamate release, abnormal NMDAR activation, and excitotoxicity. Glycine transporter type 1 (GlyT1) modulates glutamatergic neurotransmission through NMDA receptors, suggesting an alternative stroke therapeutic strategy. This work investigated the neuroprotective and neurorestorative potential of GlyT1 inhibition in a mouse model of focal ischemia. Swiss mice subjected to permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) were randomized to receive three different doses of Sarcosine (125, 250, and 500 mg/kg) or vehicle before or after ischemia. Pretreatment with 250 and 500 mg/kg of Sarcosine led to neuroprotection against stroke, as demonstrated by reduction of infarct area and neurological deficits. Moreover, GluN2A/CaMKIV/CREB and BDNF/TrKB/Akt/mTOR pathways were enhanced by sarcosine. The sarcosine neuroprotection is also related to GluN2B subunit downregulation and a decrease in

CaMKIIα phosphorylation. Additionally, we observed that post-stroke treatment with higher doses of Sarcosine improves the neurorepair process, which is evidenced by the marked reduction of the infarct area and motor deficits. Therefore, sarcosine pretreatment induced neuroprotection through the BDNF/TRKB and CaMKIV/CREB pathways, both processes trigged by NMDAR activity.

Keywords: Glycine transporter type 1; Sarcosine; Stroke; Neuroprotection; Neurorepair.

1.Justificativa: Impacto e Relevância para a sociedade

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma desordem na qual o fluxo sanguíneo cerebral é abruptamente reduzido, causando dano neuronal massivo e até mesmo a morte. Diferencia-se em dois tipos distintos: AVE hemorrágico, no qual ocorre uma lesão vascular que rompe o vaso sanguíneo e promove uma hemorragia intracerebral, e o AVE isquêmico, onde ocorre a interrupção do fluxo sanguíneo cerebral em decorrência de alterações vasculares como trombos e placas ateromatosas. Estima-se que, anualmente, 17 milhões de pessoas no mundo sofram com o acidente vascular encefálico (AVE), sendo que um terço destas pessoas morre e outro terço fica permanentemente incapacitado devido às sequelas neurológicas cognitivas e motoras. No Brasil, as doenças cerebrovasculares representam uma das principais causas de morte, com incidência anual de 108 casos por 100 mil habitantes, sendo mais prevalentes em homens que em mulheres.

Os sintomas do AVE incluem diversas alterações motoras como dificuldade para caminhar, fraqueza e rigidez muscular e incapacidade de coordenar movimentos,

bem como alterações cognitivas como dificuldade de fala, fala arrastada, confusão mental e perda de memória recente. No presente momento, os tratamentos disponíveis não são capazes de reverter o quadro neurológico instalado após o AVE, sendo capazes apenas de evitar maiores prejuízos como a morte encefálica por diminuição severa de fluxo sanguíneo cerebral. Diante desse prisma, é de fundamental importância o desenvolvimento de fármacos capazes de promover neuroproteção e reparo neuronal, a fim de melhorar substancialmente o quadro clínico dos pacientes que sofrem com AVE e, portanto, melhorar a sua qualidade de vida.

Neste trabalho foi avaliado o efeito neuroprotetor do bloqueio de transportadores de glicina do tipo 1 – GlyT1, em modelos animais que simulam a as condições de um acidente vascular encefálico isquêmico. Foi avaliado o efeito da sarcosina, um fármaco que atua através da inibição de GlyT-1, que por sua vez promove o aumento dos níveis de glicina na fenda sináptica, levando a uma estimulação indireta dos receptores de NMDA. De forma interessante, os resultados obtidos demonstram que a sarcosina preveniu a perda da capacidade motora e reduziu a lesão cerebral proveniente da indução do modelo, assim como também promoveu o aumento de expressão de proteínas relacionadas a sobrevivência celular.

Além disso, o presente estudo também demonstrou que o tratamento pós-isquemia com sarcosina foi capaz de promover uma ação de reparo neuronal, diminuindo a área de lesão cerebral e melhorando os déficits motores correlacionados com a lesão no modelo animal de isquemia focal. Por fim, o tratamento pós-isquêmico com sarcosina também foi capaz de aumentar a angiogênese, um processo essencial para a formação de vasos que podem contribuir para o aporte sanguíneo deficitário às regiões afetadas pela isquemia cerebral, ajudando, portanto, no reestabelecimento das funções neurais e na diminuição da lesão neurológica.

Nesse sentido, essa pesquisa contribuiu para a determinação de alvos farmacológicos úteis para a promoção de um efeito neuroprotetor e reparo neuronal no contexto das lesões cerebrais isquêmicas, servindo como base para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de efetivamente tratar essa condição.

2. Introdução
2.1. Acidente Vascular Encefálico Isquêmico

Conforme citado anteriormente, o acidente vascular encefálico é decorrente da interrupção abrupta de fluxo sanguíneo cerebral causada por diferentes alterações vasculares. Essa interrupção causa diretamente a morte neuronal de uma parte do tecido cerebral (chamada de núcleo isquêmico), bem como o desenvolvimento de um processo inflamatório contundente na área de tecido neural adjacente (conhecida como área de penumbra isquêmica) (Figura 1) (1).

A patogênese da isquemia cerebral resulta da diminuição do aporte sanguíneo focal ou global. Esse processo é acompanhado pela redução repentina da quantidade de oxigênio e glicose no sistema nervoso central (SNC), gerando um colapso energético que desencadeia a morte das células (2). Dessa forma, a gravidade da lesão cerebral depende do tempo de duração e da extensão da localização do AVE. De fato, evidências mostram que cerca de 120 milhões de neurônios morrem a cada

hora em que um AVE isquêmico não é tratado, o que representa uma perda substancial na capacidade neurológica (3).

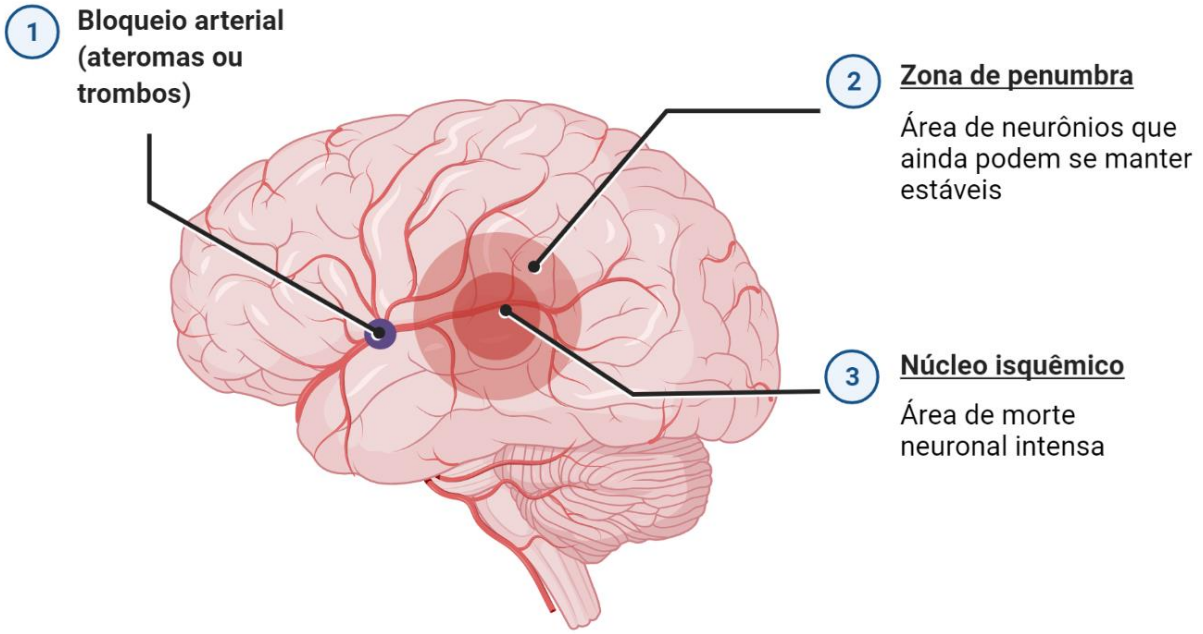

Figura 1. Representação esquemática das etapas de formação da lesão cerebral pós-isquemia, evidenciando o núcleo isquêmico e a zona de penumbra. Fonte: Autoria própria, utilizando os recursos do site Biorender.com

A interrupção de fluxo sanguíneo cerebral desencadeia três principais cascatas de alterações que culminam na morte celular: a mudança para o metabolismo energético anaeróbico, o prejuízo da atividade de bombas de sódio/potássio (Na^+/K^+ ATPases) e a ativação das vias de estresse celular (Figura 2). A primeira cascata está relacionada com a diminuição de oxigênio causada pela privação de fluxo sanguíneo, o que por sua vez gera uma mudança drástica no metabolismo celular que força a célula a promover o aumento da respiração anaeróbica através da fermentação de piruvato para a formação de lactato. Isso gera um aumento expressivo na acidose tecidual que gera sinalização necessária para a morte celular (4).

Tendo em vista que a privação de oxigênio e mudança do metabolismo energético gera uma deficiência grave de adenosina trifosfato (ATP), após o AVE isquêmico ocorre uma mudança radical no funcionamento das Na^+/K^+ ATPases que mantém o equilíbrio eletroquímico e o potencial de repouso das membranas celulares. Esse prejuízo leva à um aumento de despolarização desregulada da membrana neuronal e um alto influxo de Ca^{+2}, que por sua vez resulta na liberação excessiva de neurotransmissores como glutamato e glicina para a fenda sináptica. Essa liberação

descontrolada de neurotransmissores resulta no aumento de atividade dos receptores pós-sinápticos glutamatérgicos dos tipos, ácido αamino-3-hydroxy-5-methylsoxazole-4-propionico (AMPA) e N-metil-D-Aspartato (NMDA), que culminam no aumento excessivo da concentração intracelular de cálcio e a ativação de vias de morte celular, um processo conhecido como excitotoxicidade. Dentre elas, as principais são aquelas que resultam na disfunção mitocondrial, no dano ao DNA e às membranas celulares, e por fim a ativação da atividade das caspases e consequente apoptose (5).

Por fim, a ativação das vias de estresse celular, que ocorre concomitantemente com o desbalanço eletroquímico e ativação exacerbada de receptores glutamatérgicos, leva à produção de espécies reativas de oxigênio (O_2^-, H_2O_2, OH^-). O aníon superóxido (O_2^-) é um produto derivado de várias reações que envolvem enzimas como NADPH oxidase, monooxigenases e NADH desidrogenase. O O_2^- é prejudicial para a célula, sendo rapidamente eliminado pela enzima superóxido dismutase, que converte duas moléculas de O_2^- em uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e uma de oxigênio (O_2). Por sua vez, H_2O_2 também oferece risco oxidativo à célula, sendo os níveis celulares de H_2O_2 controlados pela catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPX), que convertem duas moléculas de H_2O_2 em uma molécula de H_2O e uma de O_2. De forma interessante, o intenso estresse oxidativo culmina na atividade pró-inflamatória das células microgliais, astrocitárias e endoteliais, o que por sua vez estabelece uma cascata de neuroinflamação que se retroalimenta (6, 7).

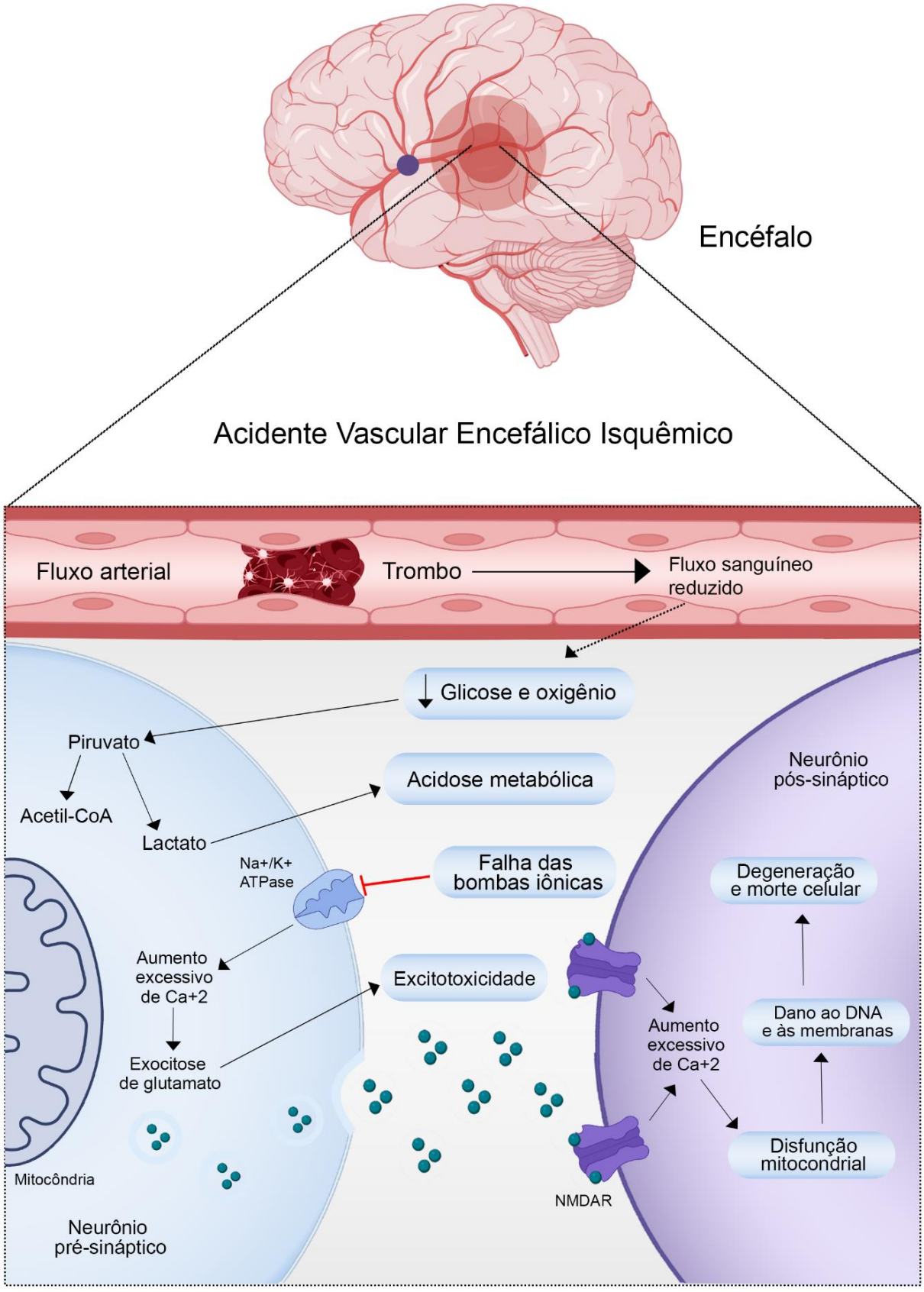

Figura 2. Representação esquemática da cascata de eventos celulares relacionados com a fisiopatologia da isquemia cerebral. Nessa imagem destaca-se como a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral causa uma drástica diminuição do aporte de oxigênio e glicose, o que por sua vez modifica o

metabolismo celular para a produção anaeróbica de lactato e consequente geração de acidose metabólica. Além disso, ocorre a falha das bombas iônicas, que promovem um aumento da concentração intracelular de cálcio e a exocitose massiva de glutamato. Esse glutamato por sua vez hiperativa receptores NMDA, que geram um alto influxo de cálcio no neurônio pós-sináptico, que em última instância sofre disfunção mitocondrial, dano ao DNA e membranas, e morte celular. Fonte: Autoria própria, utilizando os recursos do site Biorender.com

2.2. Estratégias terapêuticas para o AVE isquêmico

Até o presente momento não existem terapias farmacológicas eficazes para o manejo do AVE isquêmico. Em casos agudos, isto é, aqueles em que as manifestações sintomáticas surgem de forma repentina e que levam o paciente a procurar atendimento médico, os profissionais de saúde dependem de terapia trombolítica realizada pelo Ativador de Plasminogênio Tecidual Recombinante (rtPA). Em casos preventivos, onde se tem um risco elevado de formação de trombos (como em condições de trombofilia ou outras alterações de coagulação), recomenda-se o uso de antiagregantes como aspirina em baixas doses.

Contudo, existem inúmeras desvantagens no emprego dessas estratégias farmacológicas. Tendo em vista o considerável risco de desenvolvimento de hemorragia intracerebral, a utilização de rtPA é conduzida através de uma avaliação rigorosa de critérios de exclusão. Esses critérios incluem: tomografia computadorizada de crânio sem sinais de alterações hemorrágicas, valores pressóricos arteriais dentro dos limites fisiológicos, início dos sintomas entre 3 e 5 horas, paciente sem histórico prévio de uso de anticoagulante ou antiagregante plaquetário e razão normalizada internacional (RNI, que avalia a atividade dos fatores de coagulação sanguínea) menor que 1.7. Em decorrência desses critérios excludentes, apenas cerca de 4% dos pacientes que sofrem de AVE isquêmico se encaixam no perfil elegível para o tratamento farmacológico com rtPA (8, 9).

Outro medicamento com o mesmo mecanismo farmacológico do rtPA que têm de se demonstrado útil no manejo de pacientes com AVE isquêmico é a tenecteplase. Ele é uma versão geneticamente modificada do rtPA com uma afinidade aumentada para a fibrina, maior resistência contra a ação do inibidor do ativador de plasminogênio – 1, e meia vida mais longa. Contudo, os mesmos riscos relacionados com a utilização de rtPA estão presentes para a terapia com esse fármaco anticoagulante (10).

No que se refere às estratégias de prevenção, ainda existem limitações

importantes que restringem a utilização delas em casos clínicos com alto risco de surgimento de AVEs isquêmicos. A utilização de aspirina ou outros antiagregantes plaquetários de forma crônica está diretamente associada com o aumento significativo de irritação de mucosa estomacal, o que por sua vez aumento o risco de surgimento de lesões ulcerativas e até mesmo hemorragias gástricas (11, 12). Diante desse prisma, é crucial o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas e novos alvos terapêuticos que se demonstrem eficazes para o manejo neuroprotetor e de reparo neuronal no contexto do AVE isquêmico.

2.3. Alvos terapêuticos em fase de pesquisa

Uma das áreas promissoras de pesquisa de novos alvos terapêuticos para a isquemia cerebral são os antagonistas de receptores de NMDA. Confome citado anteriormente, ocorrem alterações nas membranas neuronais que levam ao aumento da liberação de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), levando ao fenômeno de excitotoxicidade, que em termos gerais é caracterizado pela hiperatividade de receptores de NMDA, alto influxo de cálcio e degeneração e morte neuronal induzida pela atividade de cascatas pró-apoptóticas. De forma interessante, após a descoberta desse mecanismo de excitotoxicidade mediada pelo glutamato, ocorreu um aumento nos estudos envolvendo a utilização de fármacos antagonistas de receptores NMDA para avaliação de potencial efeito neuroprotetor no contexto isquêmico (13-15).

Inúmeros fármacos foram desenvolvidos e avaliados nesse contexto de inibição de receptores de NMDA para prevenção de danos excitotóxicos. Com mecanismos de antagonismo competitivo e não-competitivo, fármacos como o MK-801, Memantina e CP-101,606 foram avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos para a análise de um possível efeito neuroprotetor ou de reparo neuronal no contexto de isquemia cerebral. Infelizmente, todos os testes clínicos falharam em demonstrar evidências da eficácia desses fármacos para o manejo adequado do AVE isquêmico, além de apresentarem efeitos adversos psicomiméticos sendo largamente relatados (16). Essa estratégia terapêutica pode ter falhado pelo fato desses fármacos antagonizarem completamente a atividade dos receptores NMDA, que, em contextos não patológicos, são essenciais para o funcionamento correto das transmissões sinápticas nas diversas regiões cerebrais.

Contudo, apesar das evidências apontarem para a ineficácia do antagonismo completo de receptores de NMDA na promoção de efeitos neuroprotetores, existem outras formas de modular a atividade desses receptores e de suas respectivas vias intracelulares. De fato, um teste clínico recente apontou resultados promissores utilizando a nerinetida, um fármaco capaz de inibir a via de NMDA-PSD-95-nNOS e mitigar a atividade excitotóxica relacionada com a hiperatividade de receptores de NMDA. Ainda existem limitações relevantes no que concerne a eficácia desse alvo terapêutico, principalmente levando em conta que a nerinetida sofre clivagem proteolítica pela plasmina, quando essa é aplicada em conjunto com o rtPA. Entretanto, estudos recentes têm analisado a capacidade de enantiômeros da nerinetida insensíveis à clivagem pela plasmina de serem utilizados para o tratamento da isquemia cerebral (17, 18).

Para além desses fármacos e alvos anteriormente citados, estudos recentes têm demonstrado a utilidade da modulação da atividade glutamatérgica não pelo antagonismo direto, mas sim pela modulação da concentração de um dos principais co-agonistas dos receptores de NMDA: a glicina. Nas seções a seguir, iremos discutir a fisiologia dos receptores de NMDA, sua relação com a atividade excitotóxica no contexto isquêmico e a regulação de sua atividade pela glicina.

2.4. Receptores de NMDA: uma perspectiva geral

Os receptores de NMDA são canais iônicos regulados por ligantes que medeiam uma vasta quantidade de processos cognitivos e comportamentais através do controle da neurotransmissão glutamatérgica excitatória no SNC. Além deles, os receptores AMPA e cainato, ambos pertencentes ao grupo de canais iônicos regulados por ligantes, também fazem parte da modulação da atividade glutamatérgica. De forma interessante, ao contrário do que acontece com os receptores AMPA e cainato, o receptor NMDA possui um bloqueio voltagem-dependente de Mg^{+2}, uma alta permeabilidade para o cálcio e requer a atividade concomitante do agonista e co-agonistas (glicina ou d-serina). Isso impacta diretamente na atividade e na funcionalidade desses receptores dentro do contexto fisiológico do sistema nervoso central (19, 20).

Nas sinapses excitatórias espalhadas pelo encéfalo, a liberação de glutamato promove a geração de correntes pós-sinápticas excitatórias através de dois principais

componentes: a atividade dos receptores AMPA, seguida da atividade dos receptores de NMDA. A ligação do glutamato aos receptores AMPA/cainato promove uma geração rápida e transiente de correntes de sódio, que por sua vez são fortes o suficiente para mudar a polarização da membrana neuronal e promover a retirada do Mg^{+2} que bloqueia a atividade dos receptores de NMDA (21, 22).

A atividade dos receptores NMDA mediada tanto pela ligação do glutamato quanto pelos seus co-agonistas promove um aumento substancial no influxo de Ca^{+2} por um tempo prolongado. Esse aumento nos níveis intracelulares de cálcio é responsável pela atividade de diversas vias intracelulares sensíveis ao cálcio, que por sua vez promovem mudanças a curto e longo-prazo relacionadas com a força sináptica e a morfologia neuronal. Essas alterações celulares se mostram vitais para processos importantes como a aquisição e consolidação de memória, bem como no contexto patológico da isquemia cerebral (23).

Os receptores de NMDA são codificados por uma família de genes que produzem uma subunidade GluN1 constitutiva (que possui 8 variantes por splicing alternativo), uma subunidade GluN2 (que possui quatro variantes: GluN2A-D), e uma subunidade GluN3 (que possui 2 variantes: GluN3A-B). Essas diferentes subunidades são agrupadas no retículo endoplasmático em pares distintos. A forma mais comum de receptor NMDA encontrada no sistema nervoso é feita pelo agrupamento de duas subunidades GluN1 e duas subunidades GluN2, arranjadas de forma a conter um poro central por onde o cálcio entra (24).

De forma interessante, a composição tetramérica desses receptores e suas respectivas localizações possuem regulações complexas. Enquanto as subunidades GluN1 são constitutivamente expressas de forma uniforme através do sistema nervoso central, as diferentes variantes da subunidade GluN2 possuem distribuições regionais específicas. Essa variação regional é essencial para as propriedades biofísicas e os papeis fisiológicos que os receptores NMDA possuem no SNC (25).

Existem diferentes sítios de ligação para os agonistas e co-agonistas dos receptores de NMDA, sendo estes responsáveis por cascatas intracelulares distintas. Os principais sítios são o sítio de ligação da glicina na subunidade GluN1 e o sítio de ligação do glutamato na subunidade GluN2. Uma vez que ambos os sítios estejam devidamente ocupados pelo glutamato e glicina, os receptores de NMDA sofrem alterações conformacionais que resultam na abertura do canal e consequente influxo de cálcio, sódio e efluxo de potássio (Figura 3) (26).

A desregulação da atividade dos receptores de NMDA é sabidamente relacionada com condições patológicas como a esquizofrenia, a Doença de Alzheimer e o AVE isquêmico. Isso ocorre em decorrência do papel desses receptores no desenvolvimento do processo de excitotoxicidade. Nesse sentido, nas próximas seções iremos discutir sobre o papel dos receptores de NMDA na fisiopatologia da isquemia cerebral.

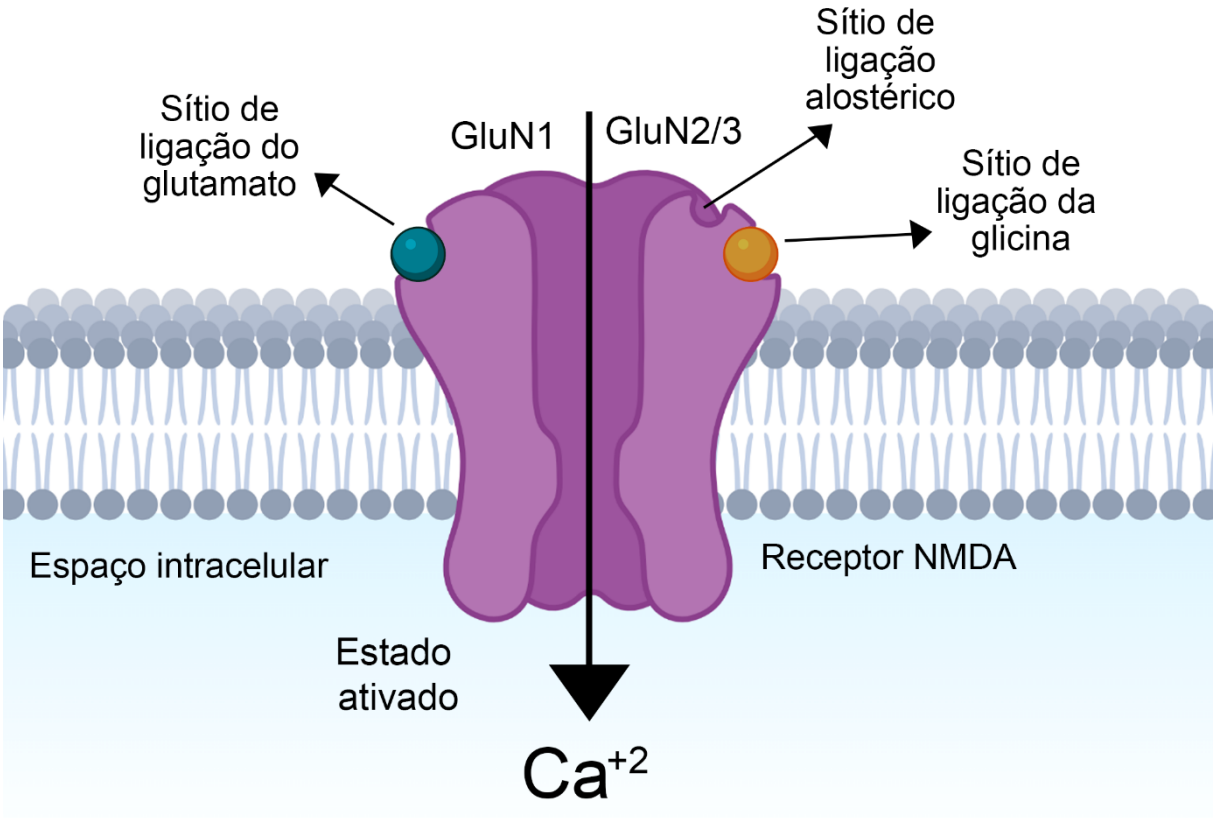

Figura 3. Representação esquemática dos sítios de ligação e das subunidades que compõem o receptor de NMDA. Fonte: Autoria própria, utilizando os recursos do site Biorender.com

2.5. Receptores de NMDA na fisiopatologia da isquemia cerebral

2.5.1. Excitotoxicidade

O processo fisiopatológico de excitotoxicidade é diretamente ligado com a hiperatividade dos receptores de NMDA. Essa hiperativação implica numa abertura prolongada desse canal iônico, incorrendo em influxos sustentados de cálcio e uma consequente sinalização anormal. A liberação massiva de glutamato durante esse processo, como discutido anteriormente, é resultado as alterações no balanço eletroquímico e no potencial de repouso das membranas neuronais, resultando em morte neuronal e neurodegeneração por vários dias após o evento isquêmico (27).

Essa disruptura nos gradientes eletroquímicos das membranas neuronais também é responsável pela alteração do funcionamento de transportadores como o transportador de glutamato (GluT), que acaba por realizar a liberação de glutamato na fenda sináptica (ao invés da recaptação), perpetuando uma cascata de atividade excitotóxica nas células neuronais adjacentes.

O papel dos receptores de NMDA na fisiopatologia da isquemia cerebral tem sido estudado extensivamente. A literatura recente demonstra que sua atividade no contexto da excitotoxicidade varia em função das vias intracelulares ativadas, o que por sua vez depende tanto da sua composição de subunidades quanto da localização celular destes receptores.

De fato, no que se refere às hipóteses relacionadas com a composição de subunidades, existe uma extensa literatura que indica papéis diferentes para receptores compostos pelas subunidades GluN1/GluN2A e GluN1/GluN2B. Postula-se que os receptores deste primeiro grupo contribuem para a sobrevivência neuronal pós-isquemia, enquanto os receptores do segundo grupo estão mais envolvidos com a atividade de morte celular pós-isquemia (27-31).

Essa hipótese que relaciona a composição de subunidades de receptores de NMDA e a atividade excitotóxica levou ao surgimento de estratégias terapêuticas que envolviam antagonistas específicos para cada subunidade. Existem evidências que demonstram que o uso de antagonistas específicos para a subunidade GluN2B, como o Ro 25-6981, possuem a capacidade de reduzir a neurotoxicidade mediada pela hiperativação de receptores de NMDA tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e que antagonistas da subunidade GluN2A exacerbam esse processo patológico (28, 31). Esses papeis distintos estão relacionados com diferenças no domínio C-terminal dessas subunidades. Em verdade, existe um corpo de evidências que mostra a capacidade de receptores compostos pela subunidade GluN2A de ativarem vias intracelulares que promovem a sobrevivência celular, como a via PI3K/Akt/CREB, CaMKIV/CREB, Ras/Erk/CREB, enquanto aqueles compostos pela subunidade GluN2B ativam vias relacionadas com a morte celular, como a via de PSD95/nNOS, DAPK1/JNK, PSD95/p38 e CaMKII/nNOS (32, 33).

Contudo, é importante destacar que essa hipótese não leva em consideração as possíveis contribuições de outros subtipos de receptores NMDA (GluN3, GluN2C, GluN2D), que, ao todo, contribuem para cerca de 50% da composição de receptores no encéfalo. De fato, alguns estudos demonstram papéis conflitantes das subunidades

GluN2C e GluN2D tanto na mediação da morte neuronal por excitotoxicidade, quanto na prevenção desse processo (34). Por fim, essa hipótese também não abarca as regulações dinâmicas temporais e espaciais entre as subunidades GluN2A e GluN2B, o que por sua vez pode ter um papel essencial na construção de terapias farmacológicas eficazes para a neuroproteção contra insultos isquêmicos.

No que se refere à hipótese que liga a disposição celular dos receptores de NMDA e diferentes papeis na mediação da atividade excitotóxica, existem evidências que apontam que os receptores dispostos na sinapse possuem atividade pró-sobrevivência celular, enquanto aqueles dispostos em sítios extra sinápticos contribuem para a morte neuronal. Essa hipótese surgiu após a descoberta de que esses receptores possuem funcionalidade distinta em relação à regulação da plasticidade sináptica mediante à sua posição celular. Enquanto receptores dispostos nas sinapses estão relacionados com o processo de potenciação de longo prazo (do inglês Long-Term Potentiation, LTP), que é caracterizado como um processo de plasticidade neuronal responsável pelo fortalecimento da transmissão sináptica, os receptores dispostos nos sítios extra sinápticos possuem a capacidade de promover o processo de depressão de longo-prazo (do inglês Long-Term Depression, LTD), caracterizado pela diminuição da atividade sináptica (35-37). É importante destacar que, enquanto receptores dispostos na sinapse são primariamente compostos de subunidades GluN2A, aqueles dispostos em sítios extra sinápticos são compostos por subunidades GluN2B.

Contudo, apesar das evidências pré-clínicas apontarem para um efeito neuroprotetor da inibição de subunidades GluN2B dispostas em sítios extra sinápticos, a translação dessa hipótese para a população humana não tem obtido êxito (38). Nesse sentido, têm ocorrido um esforço para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que modulem a atividade dos receptores de NMDA sem necessariamente atuarem como antagonistas específicos destes. Uma das estratégias emergentes está relacionada com a regulação da atividade de co-agonistas como a glicina, através da modulação dos transportadores de glicina. Desta forma, as seções a seguir discutirão sobre os diferentes tipos de transportadores de glicina, sua relação com função glutamatérgica e seu papel na atividade excitotóxica pós-isquêmica.

2.6. Pré-condicionamento isquêmico

A tolerância contra lesões cerebrais isquêmicas pode ser aumentada através

da exposição prévia a estímulos pré-condicionantes. O primeiro estudo in vivo a demonstrar esse efeito demonstrou um aumento expressivo da capacidade de cérebros de roedores de produzir energia através do processo metabólico de glicólise anaeróbica após breve período de hipóxia tecidual, o que por sua vez aumentou o tempo de sobrevivência do animal após a exposição a um longo período de anoxia (39).

De fato, os dados mais recentes têm demonstrado que a tolerância isquêmica parece se tratar de uma forma evolutivamente conservada de plasticidade cerebral que ocorre em vertebrados, incluindo humanos. Os estímulos pré-condicionantes possuem a capacidade de fundamentalmente ativar uma série de respostas adaptativas que incluem a alteração de permeabilidade de canais iônicos, fosforilação de diferentes proteínas intracelulares e ativação de genes de sobrevivência celular. De forma clara, todas essas alterações promovem a modulação de um arranjo de genes e proteínas que alteram o microambiente celular atenuando diversos mecanismos relacionados com a lesão isquêmica, incluindo o reforço das defesas antioxidantes, a prevenção de disfunção metabólica e até mesmo as vias de excitotoxicidade (40).

As diferenças entre a duração, intensidade e frequência do estímulo determina se esse possuirá a capacidade de atuar como estímulo pré-condicionante e ativar respostas adaptativas ou se irá atuar como nocivo ao sistema. Ou seja, enquanto estímulos com intensidades adequadas podem promover as respostas de sobrevivência celular e induzir o pré-condicionamento cerebral, os mesmos estímulos em intensidades altas podem promover o aumento da excitotoxicidade e da morte neuronal em decorrência da lesão isquêmica (40). Apesar de breves momentos de isquemia cerebral atuarem como estímulos pré-condicionantes, uma vasta gama de estímulos endógenos pode promover o mesmo efeito.

De fato, diversos estudos demonstraram que a neurotransmissão glutamatérgica, em especial aquela mediada pelos receptores de NMDA, possuem papel crucial no fenômeno de tolerância isquêmica e plasticidade cerebral após estímulo pré-condicionante. Em verdade, o bloqueio de receptores de NMDA em modelos in vitro e in vivo causam a interrupção dos efeitos neuroprotetores gerados pelo pré-condicionamento isquêmico (41-44). Ademais, doses sub-convulsivantes de NMDA em modelos in vivo e in vitro de isquemia cerebral são capazes de promover efeito neuroprotetor, evidenciando a importância da sinalização glutamatérgica na

indução do efeito pré-condicionante (45, 46).

Os mecanismos associados com esse efeito neuroprotetor parecem estar relacionados com a atividade de vias intracelulares de sobrevivência celular como Akt, ERK1/2 e CREB. De fato, enquanto a ativação moderada de receptores de NMDA promovem a sinalização intracelular de cálcio que ativa as vias de sobrevivência celular, a ativação exacerbada promove o acúmulo de cálcio intracelular e a atividade de excitotoxicidade. Para além disso, outras vias também são essenciais para a manutenção do efeito de pré-condicionamento isquêmico relacionado com a atividade de receptores de NMDA. A ativação de vias intracelulares que levam a produção de fatores neurotróficos, como aquelas que produzem o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento neural (FGF), em conjunto com o aumento de proteínas chaperonas e proteínas de choque térmico parecem ser cruciais para o desenvolvimento do pré-condicionamento isquêmico (47-49).

Contrabalanceando os efeitos da morte celular programada existem as vias de sobrevivência celular programada, importantes para a atividade de pré-condicionamento cerebral. Por exemplo, é sabido que diferentes estímulos pré-condicionantes podem aumentar a síntese de proteínas anti-apoptóticas como a BCL2 e BCL-X, em decorrência de aumentos significativos na atividade de CREB, bem como no aumento da estabilização do potencial de membrana mitocondrial, diminuindo a liberação do citocromo c mitocondrial e as proteínas SMAC/DIABLO (50).

De fato, esse processo de sobrevivência celular programada é caracterizado como um complexo mecanismo de plasticidade cerebral que envolve várias vias intracelulares mediadas pela ativação dos receptores de NMDA. Levando todos esses dados em conta, é justificável que se desenvolva estudos que avaliem o efeito da potencialização da função de receptores de NMDA com o intuito de induzir o pré-condicionamento isquêmico (46).

2.7. Glicina

A glicina é um dos aminoácidos mais simples presente nos mamíferos e possui diferentes papeis no sistema nervoso central, como a regulação de síntese proteica e da neurotransmissão excitatória e inibitória. A glicina pode ser produzida por duas vias distintas: a partir do aminoácido serina, através da ação da enzima serina hidroximetiltransferase, ou a partir do metabolismo de colina, que é primeiramente

transformada em sarcosina e posteriormente à glicina pela enzima sarcosina dehidrogenase (51).

Juntamente com o neurotransmissor GABA (ácido-γ-aminobutírico), a glicina atua como neurotransmissor inibitório importante para o funcionamento de áreas cerebrais distintas. Através de sua ligação no sítio A de ligação à glicina nos receptores de glicina (GlyRs), esse neurotransmissor possui a capacidade de induzir a hiperpolarização neuronal e promover potenciais pós-sinápticos inibitórios ao aumentar a condutância neuronal ao Cl^-. Essa atividade resulta em um efeito de inibição de despolarização neuronal rápida, sendo importante para o controle do balanço excitatório/inibitório no sistema nervoso (52, 53).

A hipótese de atuação da glicina como neurotransmissor se deu a partir da observação que os níveis de glicina se encontravam muito maiores na medula espinhal do que em outros locais do sistema nervoso central. A partir disso, diferentes estudos demonstraram que a glicina era distribuída de forma a se colocalizar com interneurônios inibitórios da medula espinhal, sendo sintetizada e liberada por estes após a estimulação elétrica. Essas observações levaram ao entendimento da glicina como um neurotransmissor inibitório que atua em conjunto com terminais gabaérgicos (54-57).

Os receptores de glicina pertencem à família de receptores que possuem poro seletivo para o íon cloreto. Estes são estruturas pentaméricas compostas por subunidades alfa (alfa 1-4) e beta, responsáveis pela ancoragem na membrana plasmática. Existem dois tipos distintos de receptores de glicina no SNC: os receptores sensíveis à estricnina, que possuem a capacidade de produzir um potencial pós-sináptico inibitório rápido, estando principalmente localizados na medula espinhal, tronco encefálico e cerebelo, e os receptores insensíveis à estricnina, colocalizados com receptores de NMDA, atuando de forma direta na regulação da neurotransmissão excitatória glutamatérgica, distribuídos no córtex e hipocampo (58, 59).

De fato, como mencionado anteriormente, para além da atuação da glicina sobre os receptores de glicina insensíveis à estricnina, ela também atua como co-agonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, ligando-se em seu sítio de ligação e promovendo a ativação desses receptores. Johnson e Ascher (60) foram os primeiros a demonstrarem que a glicina potencializava a resposta dos receptores de NMDA em culturas de neurônios corticais de roedores, enquanto Kleckner e Dingledine (61) reportaram a obrigatoriedade de atuação da glicina como co-agonista

desses receptores.

2.8. Transportadores de Glicina

Os transportadores são proteínas ligadas a membranas que facilitam o transporte de uma ampla gama de moléculas através de membranas biológicas, sendo expressas em quase todos os epitélios dos principais órgãos. A transmissão sináptica requer a atividade de transportadores de alta afinidade. Eles removem neurotransmissores previamente liberados na fenda sináptica, transportando-os de volta para os terminais sinápticos, ou para as células gliais circundantes, para manter um equilíbrio rigoroso da atividade pré e pós-sináptica, o que contribui para a função neuronal normal (62).

O sistema de classificação de proteínas divide os transportadores em duas superfamílias: Cassete de ligação de ATP (ABC) e transportadores de soluto (SLC). A primeira atua principalmente como transportador de efluxo utilizando a energia da hidrólise de ATP para regular sua função; a segunda atua geralmente regulando a entrada de pequenas moléculas nas células, por exemplo, aminoácidos e neurotransmissores, utilizando gradientes eletroquímicos para impulsionar o transporte de seus substratos através das membranas (63, 64).

Os transportadores de neurotransmissores fazem parte da superfamília SLC, dividida em duas subfamílias diferentes: 1. Transporte de aminoácidos excitatórios dependentes de Na+; estes transportadores incluem glutamato e aspartato; 2. Transporte dependente de Na+/Cl- de transmissores inibitórios como GABA e glicina (65-67).

Existem dois tipos distintos de transportadores de glicina dispostos pelo encéfalo: o transportador de glicina do tipo 1 (GlyT1) e o transportador de glicina do tipo 2. Ambos são membros da família SLC6 de transportadores de neurotransmissores dependentes de sódio/cloreto. Como observado em outros membros da família SLC6, o transporte de glicina mediado por GlyTs é energeticamente acoplado a um gradiente de sódio que é estritamente mantido por Na+/K+ ATPase. A ligação de substratos (sódio, cloreto e glicina) induz uma mudança conformacional nos GlyTs que muda os transportadores de um estado "para fora" para um estado "para dentro". Ao fazer isso, o local de ligação da glicina é exposto ao citosol e libera sódio, cloreto e glicina (68, 69). A estequiometria para GlyT1 e GlyT2

revela que GlyT1 transporta dois íons de sódio em troca de um cloreto e uma glicina, enquanto GlyT2 usa três íons de sódio em troca de glicina e cloreto.

Esta diferença é responsável por uma força motriz de glicina em GlyT2 maior que GlyT1, tornando-o mais capaz de manter os níveis extra e intracelulares de glicina. Além disso, essa característica também dá ao GlyT1 a capacidade de operar em modo de captação reversa, liberando glicina para o espaço extracelular para equilibrar a tendência intracelular, levando a uma liberação de glicina independente do cálcio em regiões sinápticas (70).

A distribuição neuroanatômica dos GlyTs é essencialmente impulsionada pelo papel da L-glicina na neurotransmissão inibitória ou excitatória. De modo geral, a expressão do RNA mensageiro do GlyT1 foi encontrada em células gliais do hipotálamo, tálamo, diencéfalo, retina, bulbo olfativo, bem como em áreas correlacionadas com terminais glutamatérgicos como o neocórtex e hipocampo(71, 72). Além disso, no que se refere à expressão de GlyT2, a literatura aponta uma expressão mais elevada na medula espinhal, tronco cerebral e cerebelo, estando este mais associado à neurotransmissão inibitória glicinérgica/gabaérgica (73, 74) (Figura 3).

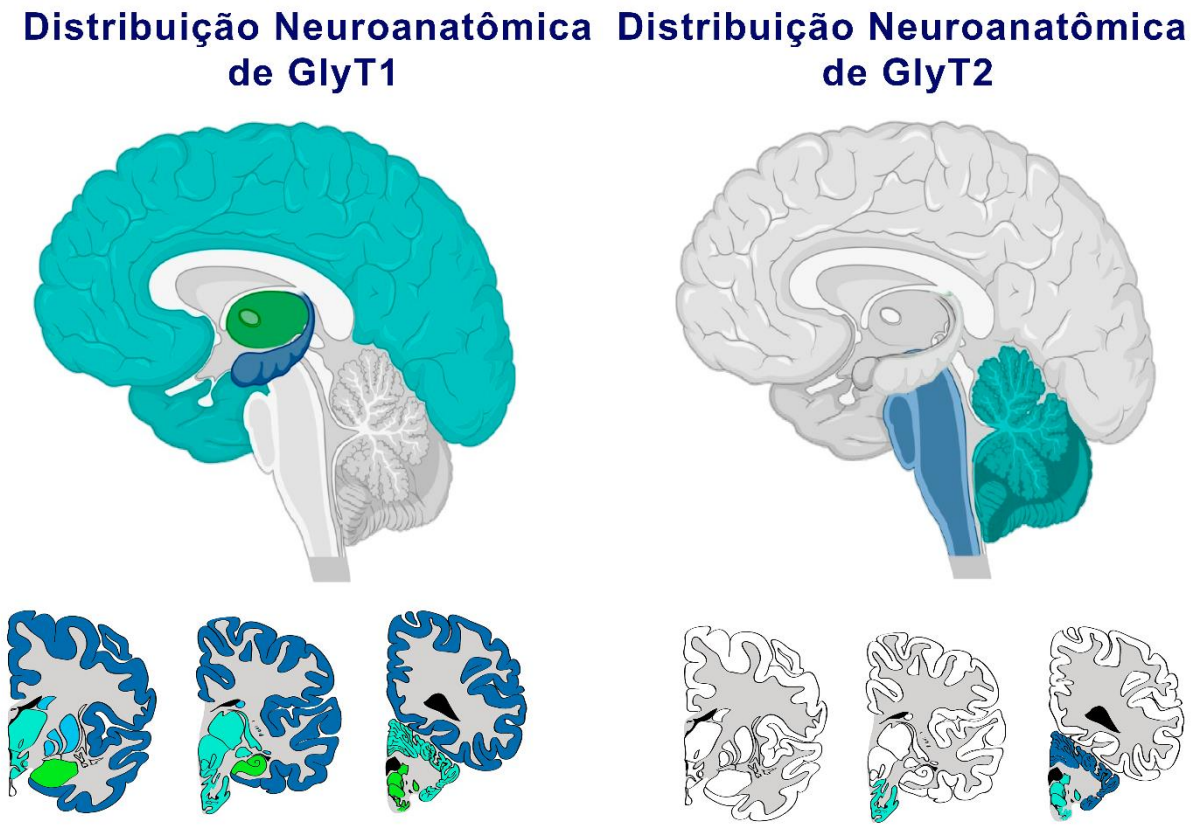

Figura 4. Distribuição neuroanatômica dos transportadores de glicina tipo 1 e 2. A figura mostra estruturas coloridas para demonstrar áreas em que a expressão do respectivo transportador é abundante, enquanto as estruturas cinzas demonstram áreas em que a expressão é baixa. O transportador de glicina tipo 1 (GlyT1) é abundante expresso no neocórtex, tálamo e hipocampo, enquanto o transportador de glicina tipo 2 (GlyT2) é marcadamente expresso no tronco cerebral, medula espinhal e cerebelo. Fonte: Autoria própria, utilizando os recursos do site Biorender.com

É importante destacar que para além dessas diferenças regionais, existem diferenças na disposição celular desses dois transportadores de glicina. De fato, dados recentes mostram que o GlyT1 é abundantemente expresso em células astrocitárias adjacentes às sinapses glutamatérgicas e glicinérgicas, enquanto o GlyT2 é majoritariamente expresso em terminais pré-sinápticos glicinérgicos. Contudo, GlyT1 também pode ser encontrado em terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, tendo funções distintas dependendo dos níveis extracelulares de glicina (75).

Os transportadores de glicina do tipo 1 localizados nas células gliais são responsáveis pela recaptação de glicina da fenda sináptica, a fim de promover o término da transmissão sináptica mediada por esse transmissor. Em sinapses

glutamatérgicas, o GlyT1 é crucial para a manutenção de níveis subsaturados de glicina, o que por sua vez medeia a função dos receptores pós-sinápticos de NMDA e por consequência toda a atividade glutamatérgica (Figura 4) (76, 77).

Nesse sentido, dada a importância desses transportadores para a regulação fina da atividade glutamatérgica, diversos grupos de pesquisa começaram a aventar a possibilidade de utilização dessas proteínas como alvos farmacológicos úteis para o manejo do processo de excitotoxicidade e, possivelmente, para a promoção de neuroproteção contra insultos isquêmicos e doenças neurodegenerativas. Dessa forma, na próxima seção iremos abordar sobre o desenvolvimento de inibidores dos transportadores de glicina do tipo 1 e sua potencial atividade neuroprotetora.

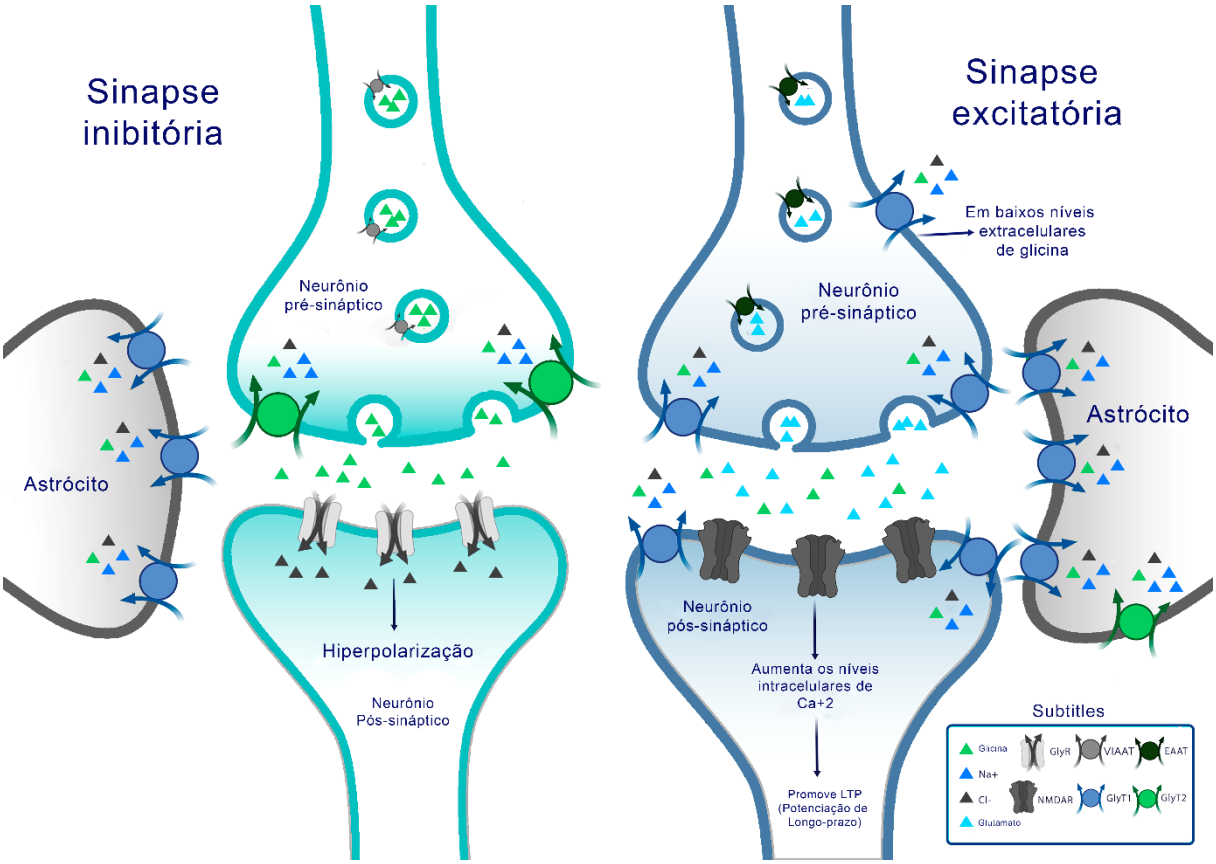

Figura 5. Distribuição celular dos transportadores de glicina. Para neurotransmissão inibitória (por exemplo, glicinérgica), GlyT1 é expresso principalmente por astrócitos, sendo importante para a liberação da glicina da fenda sináptica, enquanto GlyT2 é expresso em neurônios pré-sinápticos, sendo responsável pela recaptação da glicina através da membrana pré-sináptica, elevando assim os níveis intracelulares de glicina a fim de reabastecer as vesículas neuronais. Para as neurotransmissões excitatórias (por exemplo, glutamatérgicas), GlyT1 é expresso em neurônios pré-sinápticos e astrócitos circundantes. Nos astrócitos, GlyT1 é responsável pela reabsorção da glicina, mantendo os níveis subaturados deste co-agonista NMDAR. Em neurônios pré-sinápticos, GlyT1 pode realizar o transporte inverso de glicina (quando o nível extracelular de glicina é inferior ao intracelular), assim, pode administrar o equilíbrio estrito da atividade NMDA. GlyR= Receptor de glicina; GlyT= Transportador de

glicina; VIAAT= Transportador de aminoácidos inibitórios vesiculares; EAAT= Transportador de aminoácidos excitatórios. Fonte: Autoria própria, utilizando os recursos do site Biorender.com

2.9. Inibidores dos transportadores de glicina do tipo 1

Os inibidores dos transportadores de glicina do tipo 1 são uma classe farmacológica de drogas capazes de seletivamente inibir GlyT1 e promover o aumento significativo nos níveis extracelulares de glicina no encéfalo. Essa classe surgiu com o avanço do entendimento da fisiopatologia da esquizofrenia e sua correlação com a hipofunção de receptores de NMDA. De forma interessante, foi demonstrado que a inibição desses receptores com drogas como a cetamina ou a fenciclidina (PCP) é capaz de promover sintomas psíquicos relacionados com aqueles presentes na esquizofrenia. Tendo em vista que a glicina pode potencializar a atividade glutamatérgica, postulou-se que o aumento nos níveis extracelulares de glicina, através da inibição de GlyT1, pudesse ser capaz de atenuar os sintomas ao resultar em uma melhoria de atividade dos receptores de NMDA (78-80).

Uma das primeiras moléculas inibidoras de GlyT1 testadas foi a glicildodecilamida (GDA), uma molécula derivada da glicina que possui a capacidade de reverter a hiperatividade induzida por injeções de fenciclidina em modelos animais de esquizofrenia. É interessante destacar que esses primeiros estudos demonstraram uma eficácia marcadamente maior da GDA na redução dos sintomas relacionados com a esquizofrenia, quando comparada à eficácia da terapia exógena de glicina. Nesse sentido, postula-se que a modulação endógena dos níveis de glicina, isto é, a modulação da atividade dos transportadores de glicina, se mostra mais útil terapeuticamente do que apenas a terapia de glicina exógena (81, 82).

A partir disso, começou-se a buscar o desenvolvimento de moléculas análogas à glicina que possuíssem a capacidade de inibir seletivamente os transportadores de glicina do tipo 1 para o manejo dos sintomas esquizofrênicos relacionados com a hipofunção de NMDA. O primeiro fármaco inibidor de GlyT1 que foi amplamente usado nos testes pré-clínicos e clínicos foi a sarcosina, um derivado direto da glicina que possui a capacidade de inibir competitivamente o transportador de glicina do tipo 1 de forma seletiva. De forma interessante, a sarcosina foi capaz de reduzir significativamente tanto os sintomas negativos quanto os sintomas cognitivos da esquizofrenia, demonstrando-se eficaz no manejo da hipofunção glutamatérgica (83).

Contudo, ao longo do desenvolvimento dessa classe de fármacos, as diferentes estratégias utilizadas para a inibição de GlyT1 não se mostraram tão eficazes na grande maioria dos estudos clínicos de fase III. Em sua essência, apesar de se mostrarem promissores durante os estudos pré-clínicos, nenhum fármaco inibidor de GlyT1, até o presente momento, mostrou-se eficaz na redução dos sintomas negativos e cognitivos relatados pelos pacientes com esquizofrenia, quando este foi comparado com o tratamento placebo em estudos randomizados e duplo-cegos (84-86).

Apesar dos resultados desanimadoras dos inibidores de GlyT1 no contexto da esquizofrenia, estudos recentes têm demonstrado que essa classe farmacológica pode ser útil para o manejo da excitotoxicidade no contexto de doenças neurodegenerativas e na isquemia cerebral. De fato, recentemente foi demonstrado que o tratamento com baixas doses de L-glicina apresentou efeitos neuroprotetores em um modelo animal de isquemia cerebral focal, reduzindo o volume de infarto e os escores de déficit neurológico. Por outro lado, o tratamento com altas doses de glicina exerceu efeitos opostos no mesmo modelo, aumentando o dano cerebral (87). Esta diferença possivelmente é resultado do tipo de receptores NMDA ativados pela glicina. Aparentemente, o tratamento com baixas doses de glicina induz a neuroproteção dependente de CREB, que está associada à ativação de receptores NMDA contendo a subunidade GluN2A.

Para além disso, resultados recentes demonstraram a eficácia do pré-tratamento com sarcosina na indução de neuroproteção *in vitro* em um modelo isquêmico de privação de oxigênio e glicose. Os dados mostram que a sarcosina é capaz de alterar vias de sinalização importantes para a sobrevivência celular, como aquelas relacionadas com a via de BDNF/CREB e outras neurotrofinas, além da modulação da composição de receptores de NMDA, favorecendo uma diminuição da expressão da subunidade GluN2B (88).

Ademais, em um estudo subsequente, foi demonstrado que o pré-tratamento com NFPS, um inibidor não-competitivo e seletivo para GlyT1, é capaz de promover neuroproteção contra danos hipocampais relacionados com a excitotoxicidade mediada pela administração de NMDA (89). Em verdade, até o presente momento, a estratégia terapêutica de modulação dos transportadores de glicina do tipo 1 com o intuito de diminuir a atividade excitotóxica mediada pela hiperativação de receptores de NMDA se mostra promissora.

2.10. Reparo tecidual após isquemia

As alterações causadas pela lesão isquêmica levam à ativação de diferentes mecanismos de reparo tecidual e recuperação da funcionalidade da área afetada. Por exemplo, lesões isquêmicas subcorticais tendem a aumentar a ativação cortical bilateral em decorrência da estimulação sensorial ou motora do membro afetado. Esse padrão de resposta bilateral se torna, após o avanço na recuperação do paciente, focalizada no córtex contralateral ao membro afetado (o córtex afetado pela lesão isquêmica), ocorrendo um aumento de conexões e atividade neuronal de regiões pré-motoras e motoras suplementares (90, 91). De fato, aparentemente a recuperação funcional após a isquemia depende diretamente da reorganização neuronal, reorganização da atividade cortical adjacente ao sítio de lesão isquêmica e a estimulação de reparo tecidual.

Dentre os mecanismos de reparo tecidual que ocorrem após o evento isquêmico, a neurogênese assume papel importante na reorganização neural e recuperação funcional. Em situações fisiológicas, a neurogênese adulta ocorre através da formação de novos neurônios nos nichos neurogênicos (zona subventricular e zona subgranular do giro denteado) e sua migração através da corrente de migração rostral (do inglês Rostral Migration Stream) que leva os novos neurônios para o bulbo ofatório(92, 93).

De forma surpreendente, o próprio evento isquêmico causa um aumento de sinalização nos sítios de células tronco neurais residentes nos nichos neurogênicos, promovendo a migração de neuroblastos (neurônios imaturos recém-formados) para áreas de lesão isquêmica. De fato, em experimentos realizados em camundongos, inúmeros neuroblastos migram-se de sua origem subventricular até áreas de peri-infarto cortical. A migração ectópica dos precursores neurais é um processo descrito em diferentes modelos animais de isquemia cerebral, bem como em humanos. Dependendo da área de lesão isquêmica, as rotas de migração ectópicas podem seguir caminhos distintos: enquanto as células precursoras neurais migrando para o estriado realizam essa rota diretamente através da zona subventricular, as células que estão se transportando para o córtex isquemiado utilizam como rota o corpo caloso Essa migração ocorre em ondas e pode se estender durante dias, sendo caracterizado como um processo dinâmico responsável pela recuperação funcional e o reparo tecidual após isquemia (94-96).

As contribuições da neurogênese pós-isquemia para a indução do reparo neuronal foram avaliadas em estudos envolvendo a ablação transgênica das células precursoras neurais. Esses estudos relatam que o bloqueio dos nichos neurogênicos pode afetar significativamente a recuperação neurológica após evento isquêmico. Enquanto isso, estudos que utilizam o transplante de células precursoras neurais demonstram um aumento na capacidade de recuperação tecidual e funcional, aumentando também a sobrevivência neuronal após a isquemia, indicando, portanto, que o processo neurogênico é crucial para o reparo neural (97-99).

A angiogênese é outro processo crucial que, em conjunto com a neurogênese pós-isquemia, promove o reparo neural e a recuperação funcional das habilidades motoras e sensoriais. Esse processo é caracterizado pela formação de novos vasos através da atividade de células endoteliais maduras (onde ocorre o crescimento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes) e células progenitoras endoteliais. Ambos os processos ocorrem de maneira intrincada, uma vez que os sítios neurogênicos estão anatomicamente sobrepostos aos nichos angiogênicos. Em verdade, a literatura recente tem demonstrado que o microambiente vascular está intimamente ligado com a atividade das células progenitoras neurais, de modo que o processo angiogênico influencia a atividade do processo neurogênico, em um ciclo que é crucial para a instauração de um processo de reparo de lesão isquêmica (100, 101).

O grande benefício dessa relação intrincada reside no fato de que o microambiente vascular é especialmente importante para garantir o acesso das células progenitoras neurais a moléculas sinalizadoras que vão culminar em sua proliferação e no início do processo neurogênico (102).

Dentre as várias moléculas importantes para o estímulo angiogênico, o fator de crescimento vascular endotelial (do inglês Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) é um dos mais pesquisados. O VEGF é uma proteína angiogênica que possui baixa expressão em níveis fisiológicos. Contudo, lesões isquêmicas promovem o aumento de sua expressão com o intuito de propiciar as alterações do microambiente vascular necessárias para a promoção da angiogênese. De forma geral, o VEGF atua através da ligação com dois receptores distintos: VEGFR1 e VEGFR2. Enquanto o receptor VEGF1 é um importante regulador negativo da neurogênese, o VEGFR2, através da ligação com o subtipo VEGF-A, promove a proliferação vascular e a neurgoênese, ambos os receptores atuando em um equilíbrio dinâmico importante

para a manutenção da homeostase vascular e neurogênica (103-106).

Diversas terapias focadas no aumento da expressão de fatores de crescimento associados à neurogênese e angiogênese têm sido desenvolvidas nas últimas décadas. De fato, tanto a aplicação exógena de fatores de crescimento como o VEGF e BDNF, como a promoção do aumento de expressão de ambos através da modulação farmacológica de diferentes alvos, têm sido amplamente testadas em ensaios pré-clínicos para o desenvolvimento de terapias eficazes para a isquemia cerebral. Em verdade, dada a natureza intrincada da relação dinâmica entre o processo angiogênico e neurogênico, estratégias terapêuticas que incluam a modulação desses processos são cruciais para o desenvolvimento de uma terapia de reparo neuronal e recuperação funcional eficazes (107, 108)

3. Objetivos
3.1. Objetivo geral

Estudar o potencial efeito neuroprotetor da inibição farmacológica dos transportadores de glicina do tipo 1 (GlyT1) no modelo de isquemia cerebral por oclusão da artéria cerebral média em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

1. Analisar o efeito da inibição farmacológica de GlyT1 na morte neuronal induzida pelo modelo de isquemia cerebral por oclusão permanente da artéria cerebral média (MCAO) em camundongos.
2. Analisar o efeito da inibição farmacológica de GlyT1 no déficit motor causado pelo modelo de isquemia cerebral por MCAO em camundongos.
3. Analisar o efeito da inibição farmacológica de GlyT1 sobre expressão proteica dos receptores glutamatérgicos e glicinérgicos em modelo animal de MCAO, através da técnica de Western Blotting.
4. Analisar o mecanismo de ação do provável efeito neuroprotetor da inibição farmacológica de GlyT1 em camundongos submetidos ao modelo de MCAO.
5. Analisar o impacto da inibição farmacológica de GlyT1 no processo angiogênico em animais submetidos ao modelo de MCAO, através da técnica de imunohistoquímica.
6. Analisar o efeito da inibição farmacológica de GlyT1 sobre a ativação de vias intracelulares (PI3K/Akt/mTOR; BDNF/TrkB; CamKII; CamKIV; VEGF-A/VEGFR2; ERK 1/2) em modelo de MCAO através da técnica de Western Blotting.

4. Materiais e Métodos
4.1. Animais experimentais

Os animais utilizados para os procedimentos experimentais foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Goiás-UFG. Os animais foram mantidos no biotério experimental dos Departamentos de Ciências Fisiológicas e Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, Biotério DCiF/DFAR. Para a avaliação do efeito neuroprotetor no modelo de isquemia cerebral focal foram utilizados animais swiss machos, pesando entre 40 e 50 gramas. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração e água. Este projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA (PROTOCOLO Nº. 041/19).

4.2. Desenho experimental

Foram utilizados dois desenhos experimentais distintos: uma rodada de experimentos foi realizada para analisar o possível efeito neuroprotetor da inibição farmacológica de GlyT1 na isquemia cerebral focal, enquanto outra rodada foi realizada para analisar o potencial efeito de reparo tecidual da inibição farmacológica de GlyT1.

No primeiro cronograma de experimentos os animais foram randomicamente selecionados para 5 grupos distintos: grupo controle, grupo sham tratado com solução salina, MCAO+125 mg/kg Sarcosina, MCAO+250 mg/kg Sarcosina, MCAO+500 mg/kg Sarcosina (injeção intraperitoneal). Todos os animais foram pré-tratados por 5 dias antes do procedimento cirúrgico. Já no segundo cronograma de experimentos os animais também foram aleatoriamente divididos nos mesmos grupos, porém estes foram tratados por 5 dias após o procedimento cirúrgico de indução de isquemia cerebral.

4.3. Modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO)

O modelo de oclusão permanente da artéria cerebral média (ACM) distal foi realizado como estabelecido previamente (109). Resumidamente, os camundongos

foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina/cetamina (i.p.). Uma incisão cutânea central de 2cm na linha média do pescoço foi feita com auxílio de um bisturi. Para expor a artéria carótida comum (ACC), as glândulas salivares foram gentilmente afastadas com fórceps, dando visão à ACC e ao nervo vago. A ACC foi então cuidadosamente dissecada do nervo vago com finos fórceps e ocluída com sutura de seda não absorvível. A incisão na linha média do pescoço foi cuidadosamente fechada com linha de sutura de nylon 0-6. Após a oclusão da ACC, os camundongos foram colocados na mesa cirúrgica com a parte contralateral da cabeça, para expor o hemisfério contralateral. Uma incisão de 1 cm entre o seio retro-orbital e o canal auditivo externo foi feita, expondo o músculo temporal. Então, o músculo temporal foi cuidadosamente dissecado, para revelar o crânio e a artéria cerebral média. Depois disso, realizamos uma craniotomia na região exposta usando uma broca odontológica perfuração com revestimento de 1,6 mm a aproximadamente 8.000 rpm. Uma vez que o osso ficou fino o suficiente para vê-lo como se fosse transparente, nós o removemos usando uma pinça fina. Por fim, a ACM foi ocluída permanentemente com um cauterizador com 3W de voltagem (Cautermax®). Após os procedimentos cirúrgicos, os camundongos se recuperam da anestesia a uma temperatura de 25 a 27 ºC.

Após o tratamento, os camundongos foram eutanasiados, e seus cérebros foram removidos e cortados em secções consecutivas de 1 mm de espessura. Depois disto, as secções foram coradas com 2% de cloreto de 5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC, Sigma, T8877) (110). O software Image J foi utilizado para analisar a área de infarto. Área de infarto (%) = (área pálida isquêmica / área do córtex esquerdo + área do córtex direito) × 100.

4.4. Avaliação motora dos animais
4.4.1. Teste do Cilindro

O teste do cilindro é um teste comportamental usado para avaliar os parâmetros de assimetria e coordenação motora em modelos de roedores com AVE. Como descrito por (111), o uso da pata dianteira durante a atividade exploratória foi analisado por meio de filmagem de camundongos em um cilindro transparente (20 cm de diâmetro e 30 cm de altura) por 5 min. Essencialmente, este teste usa a forma cilíndrica para incentivar a exploração vertical das paredes, levando os camundongos

a usar as patas dianteiras para contatá-los. Para avaliar o uso da pata dianteira comprometida, contamos o contato dos animais nas paredes do cilindro usando a pata dianteira comprometida (contralateral do hemisfério da cirurgia). Nos animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral focal espera-se uma diminuição da utilização da pata contralateral ao hemisfério cerebral que sofreu a isquemia. Nesse sentido, espera-se uma diminuição da razão entre o uso das patas dianteiras ipsi e contralateral, demonstrando uma preferência pelo uso da pata ipsilateral e, portanto, um déficit motor observável em decorrência do dano neuronal.

4.4.2. Teste de Limb Clasping

O teste Limb Clasping é um teste comportamental usado para avaliar a atividade motora funcional em modelos de murinos com AVE. Como descrito por Miedel, Patton et al. (2017), a suspensão de camundongos pela cauda induz uma resposta de escape, e este teste usa esse instinto para avaliar os déficits motores correlacionados com a perda da capacidade de estender as patas traseiras e dianteiras. Resumidamente, os camundongos foram suspensos pela cauda por 10s, e as patas traseiras e dianteiras foram gravadas com uma câmera de resolução HD. Em seguida, a pontuação de clasping dos vídeos foi atribuída com base nos critérios previamente estabelecidos (112).

4.4.3. Western Blotting

Os animais foram eutanasiados e tiveram seus córtices cerebrais removidos e processados para a análise proteica. Esses córtices foram processados com um tampão de lise produzido da seguinte forma: utilizamos o coquetel de inibidores de proteases Sigma-FAST® (St. Louis, MO, EUA) contendo 2 mmol/L de fluoreto de 4-(2-aminoetil)- sulfonil benzeno, 1 mmol/L de fosfoamidona, 130 mmol/L de bestatina, 14 mmol/L E-64, 1.0 mmol/L de leupeptina, 0.2 mmol/L de aprotinina, e 10 mmol/L de pepstatina A. Foram adicionados 50 mmol/L de fluoreto de sódio e 1 mmol/L de ortovanato de sódio. O pH foi ajustado para 7,4. Após a quantificação de proteína das amostras obtidas, 40µg de proteína foi aplicada em cada poço do gel Bis-Tris NuPAGE 4-12%, juntamente com o tampão de amostra NuPAGE LDS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 10% de β-mercaptoetanol, sendo incubadas a

70°C por 10 minutos. As amostras foram aplicadas nos géis e submetidas à eletroforese como recomendado pelo fabricante.

Após essa etapa, as proteínas foram submetidas ao processo de transferência para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham, GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ). As membranas foram então bloqueadas por 45 min em tampão TBST (tampão salina com Tris-base, pH 7.4) Tween 20 0,1% e albumina de soro bovino 5%. Após etapas de lavagem com TBST, as membranas foram incubadas overnight à 4°C com anticorpos primários diluídos em TBST. Após essa etapa as membranas foram incubadas em temperatura ambiente por 1h em anticorpos secundários diluídos em TBST.

Os anticorpos primários utilizados foram: NMDAζ1 (sc-1467, 1:400), NMDAε1 (sc-1468, 1:400), NMDAε2 (sc-1469, 1:400), GlyR β (sc-20134, 1:400), GlyT1 (sc-16701, 1:400); GlyT2 (sc-30129, 1:400), p-CaMKIIα (sc-32289, 1:500), CaMKIIα (MA1-048, 1:500), p-CaMKIV (sc-28443, 1:500), CaMKIV(sc-136249, 1:500), p-AKT (PA5-36780, 1:500), AKT (#44-6096, 1:500), PI3K (4292s, 1:500), p-ERK1/2 (05-797R, 1:500), ERK1/2(4695, 1:500), p-mTOR(44-1125G, 1:500), mTOR(PA5-20123, 1:500), BDNF (SAB-1405514, 1:500), p-CREB (sc-101663, 1:500), CREB (sc-25785, 1:500), pTRKB (SAB-4300255, 1:500), TRKB (SAB-4300702, 1:500), p-VEGFR2 (194806, 1:500), VEGFR2 (11939, 1:500), VEGF-A (sc-7269, 1:500) e anti-β-actin (MAB1501R, 1:1000). Os seguintes anticorpos secundários foram utilizados: goat anti-rabbit IgG (1:1000), goat anti-mouse IgG (1:1000) (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e donkey anti-goat IgG (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

As membranas foram submetidas à detecção por quimioluminescência com ECL Plus (Amersham, GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA) como descrito pelo fabricante e visualizadas pelo aparelho ImageQuant.

A análise densitométrica foi realizada com auxílio do software ImageJ. Todos os dados foram normalizados primeiramente com a densitometria de beta-actina (marcador endógeno). Os dados que apresentam a razão entre a proteína fosforilada e a proteína total também foram normalizados pela densitometria da beta-actina.

4.4.4. Imunofluorescência

Nós realizamos o protocolo descrito previamente por Oliveira-Lima et al. (113). As secções de 14µm (free-floating) de cérebros animais foram incubadas com o anticorpo primário específico para CD31 (#102507, Biolegend, 1:500) por 2 dias na temperatura de 4°C. Após essa etapa, as secções foram lavadas e montadas com Vectashield (Vector Labs) e examinadas em um microscópio confocal Leica TCS (Leica Microsystems). A imunofluorescência de CD31 foi adquirida e analisada usando três cortes por animal de forma cega.

4.4.5. Análise Estatística

Para análise de dados paramétricos, a análise de variância one-way (ANOVA) seguida por pós-teste de Dunnet foi conduzida, considerando valores de $P<0,05$ estatisticamente significantes. Para dados não-paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi conduzido, considerando valores de $P<0.05$ como estatisticamente significantes. Os dados foram expressos como média ± Erro padrão de Média (EPM).

5. Resultados

5.1. Sarcosina promove efeito neuroprotetor em modelo animal de isquemia cerebral

A fim de investigar o potencial neuroprotetor do pré-tratamento com sarcosina, nós induzimos isquemia cerebral focal através do modelo animal de oclusão distal da artéria cerebral média (MCAO). Enquanto esse modelo promoveu uma extensa área de infarto e déficits motores quando comparado com o grupo controle, os grupos pré-tratados com as doses de 250 e 500mg/kg de Sarcosina demonstraram uma redução significativa da área de infarto em uma forma dose-dependente (Fig.5).

Além disso, o pré-tratamento com as doses de 250 e 500 mg/kg de Sarcosina promoveram um efeito neuroprotetor contra os déficits motores induzidos pelo modelo distal de isquemia cerebral focal analisados nos testes do cilindro e de limb clasping, quando estes foram comparados com o grupo tratado com solução salina. Nesse sentido, estes resultados demonstram que a inibição farmacológica de GlyT1 possui efeitos neuroprotetores contra os danos teciduais e déficits motores causados pela isquemia.

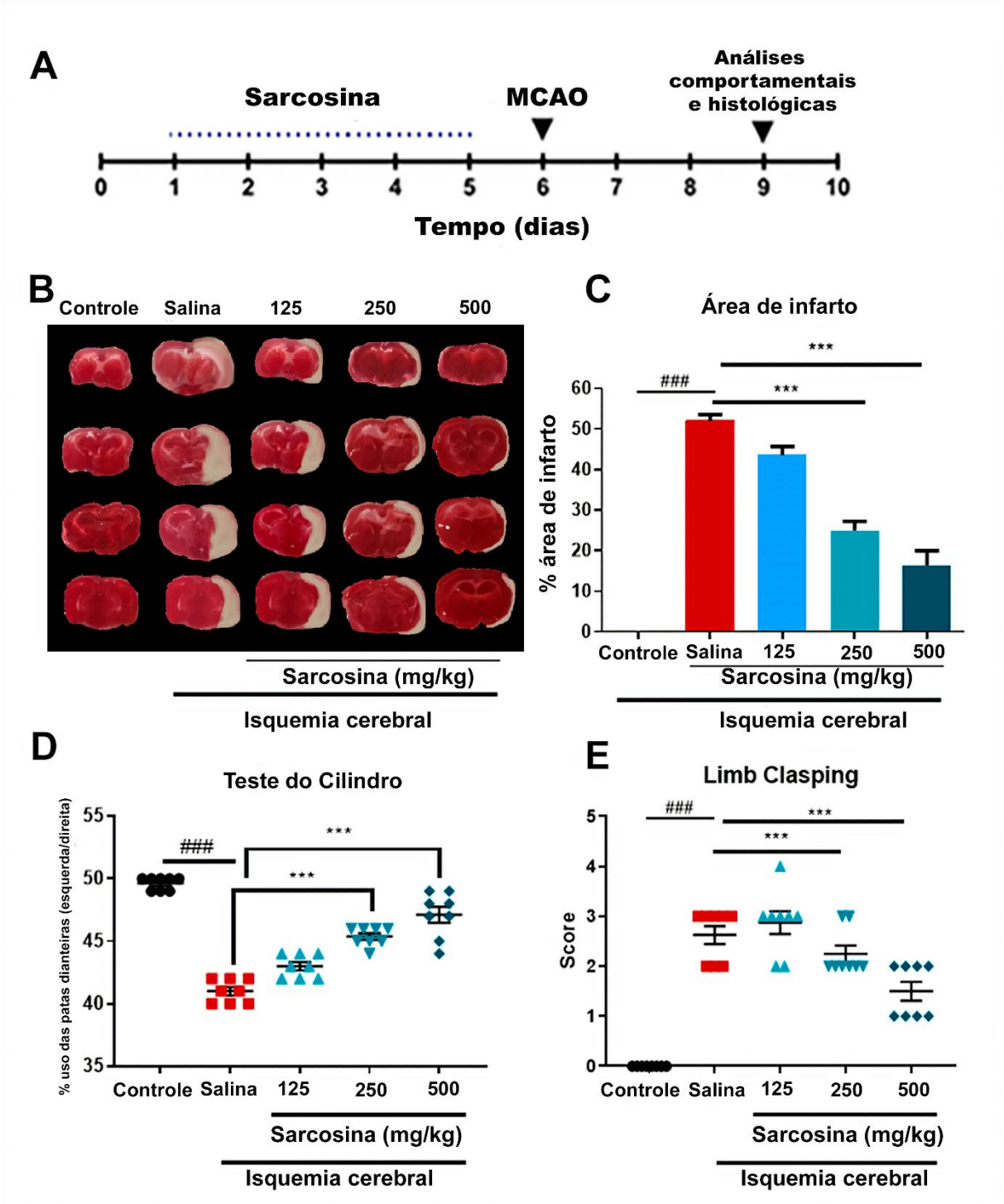

Figura 6. Efeitos neuroprotetores da Sarcosina em modelo animal de isquemia cerebral. A. Desenho esquemático da linha do tempo do tratamento farmacológico, indução do modelo e análise bioquímica e comportamental. **B.** Imagens representativas da coloração com TTC. **C.** Análise da área de infarto obtida com TTC. **D.** Análise do Teste do Cilindro. **E.** Análise do Teste de Limb Clasping. Dados estão sendo apresentados como média ± Erro padrão de Média (EPM) de cada grupo com 8 animais cada (*P<0.05 vs. Grupo salina, *** P<0.01 vs. Grupo salina, ### P<0.05 vs. Grupo controle), One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet, ou Teste de Kruskal-Wallis.

5.2. Pré-tratamento com Sarcosina promove mudanças na expressão dos transportadores de glicina e do receptor de glicina

Uma vez que observamos que o pré-tratamento com sarcosina promove efeito neuroprotetor no modelo de MCAO, nós começamos a investigar o impacto da inibição farmacológica de GlyT1 na transmissão glicinérgica no córtex cerebral (Fig. Encontramos que o pré-tratamento com Sarcosina, nas doses de 250 e 500 mg/kg induz uma diminuição significativa na expressão de GlyT1, quando comparamos com o grupo controle tratado com salina. Além disso, todas as três doses de Sarcosina promoveram um aumento significativo na expressão de GlyT2, quando comparados com o grupo controle. No que se refere à expressão do receptor de glicina (GlyR), sua expressão se encontrou aumentada no grupo tratado com a maior dose de Sarcosina (500 mg/kg), quando comparamos com a expressão encontrada no grupo controle tratado com salina.

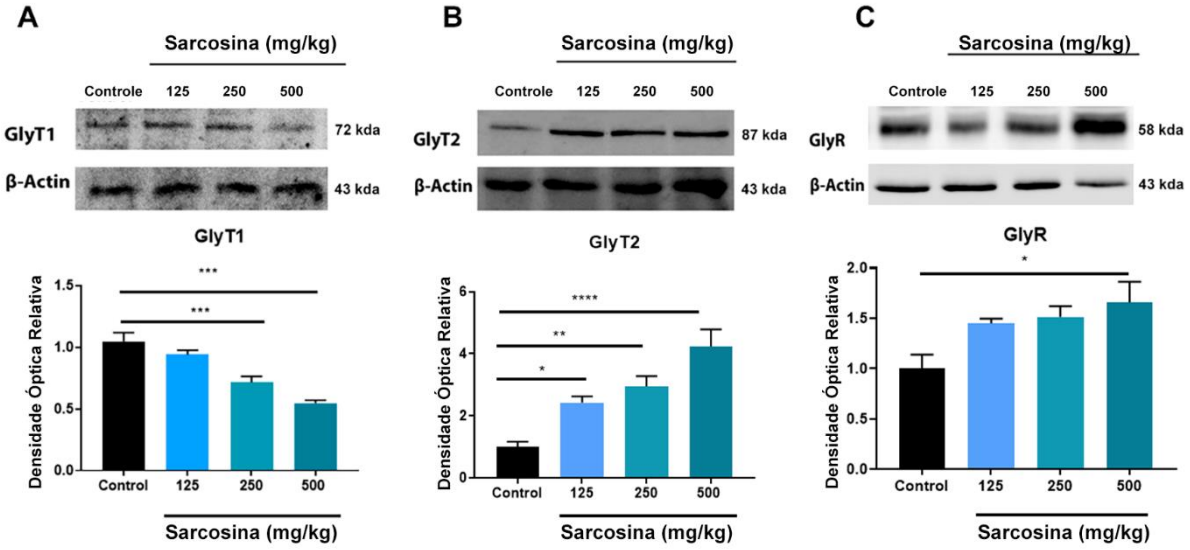

Figura 7. Pré-tratamento com Sarcosina promove alteração na transmissão glicinérgica e na recaptação de glicina no córtex cerebral. A. Expressão de GlyT1 **B.** Expressão de GlyT2 **C.** Expressão de GlyR. Dados estão sendo apresentados como média ± Erro padrão de Média (EPM) de cada grupo com 8 animais cada (*P<0.05 vs. Grupo salina, *** P<0.01 vs. Grupo salina, ### P<0.05 vs. Grupo controle), One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet.

5.3. Pré-tratamento com Sarcosina promove alteração na expressão de receptores de NMDA e suas sinalizações intracelulares

Tendo em vista as mudanças na sinalização glicinérgica que observamos, nós

teorizamos que esse impacto poderia se estender sobre a sinalização glutamatérgica. Nesse sentido, nós buscamos analisar o impacto da inibição farmacológica de GlyT1 sobre a expressão de diferentes subunidades do receptor de NMDA e de suas vias intracelulares dependentes de cálcio (Fig. 7). Nós realizamos a análise da expressão das subunidades GluN1, GluN2A e GluN2B dos receptores de NMDA, bem como a expressão da cálcio/calmodulina-dependente proteína quinase IIα (CaMKIIα), cálcio/calmodulina-dependente proteína quinase IV (CaMKIV) e a proteína de ligação da resposta ao AMPc (CREB).

A expressão de GluN1 seguiu-se inalterada após o pré-tratamento com todas as diferentes doses de Sarcosina, quando comparados com o grupo controle tratado com salina. Além disso, a expressão da subunidade GluN2A foi marcadamente aumentada no grupo tratado com 500 mg/kg de Sarcosina, quando este foi comparado com o grupo controle. Em contraste, as menores doses não demonstraram mudanças significativas na expressão de GluN2A. Por outro lado, a expressão da subunidade GluN2B foi significativamente diminuída nos grupos tratados com 250 e 500 mg/kg de Sarcosina, quando estes foram comparados com o grupo controle tratado com salina.

Tendo em vista que o pré-tratamento alterou a composição das subunidades dos receptores de NMDA, nós focamos nossas análises nas suas respectivas vias intracelulares dependentes de cálcio, focando na fosforilação e expressão de CaMKIIα, CaMKIV e CREB. Nós encontramos que os níveis de fosforilação de CaMKIIα foram significativamente diminuídos no grupo pré-tratado com 250 e 500 mg/kg de Sarcosina, quando estes foram comparados com o grupo controle, ao passo que os níveis de fosforilação de CaMKIV foram drasticamente aumentados no grupo pré-tratado com a maior dose de Sarcosina, quando este é comparado com o grupo salina. Ademais, a fosforilação de CREB foi marcadamente aumentada nos grupos pré-tratados com 250 e 500 mg/kg de Sarcosina, quando estes foram comparados com o grupo salina.

Estes resultados indicam que a inibição farmacológica de GlyT1 pode promover mudanças significativas tanto na composição de receptores de NMDA como em suas respectivas vias intracelulares dependentes de cálcio, diminuindo a atividade de CaMKIIα, e aumentando a atividade de CaMKIV e CREB.

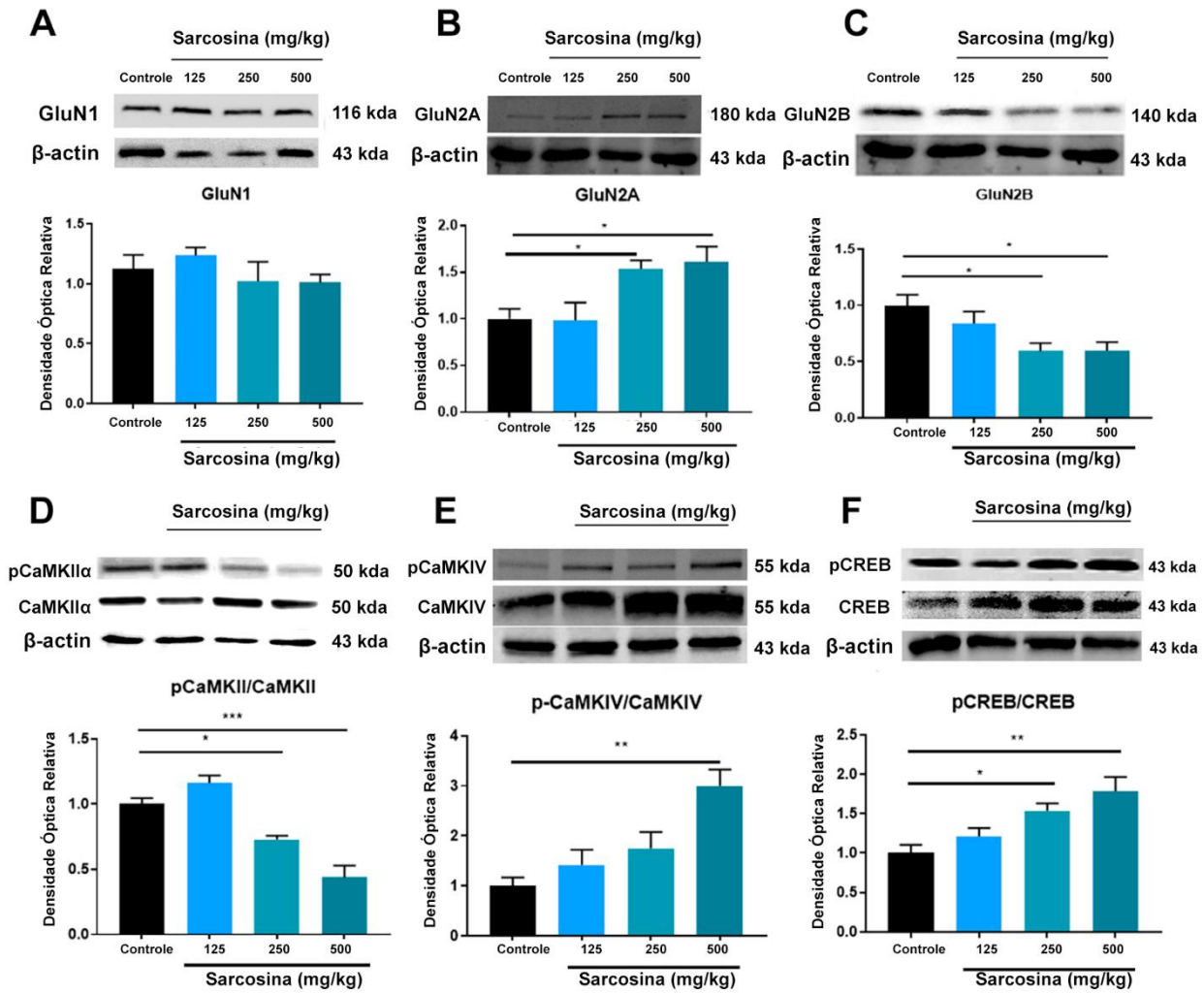

Figura 8. Pré-tratamento com Sarcosina promove alteração na composição de subunidades do receptor NMDA e nas vias de CaMKIIα/CaMKIV/CREB. A. Expressão da subunidade GluN1 **B.** Expressão da subunidade GluN2A **C.** Expressão da subunidade GluN2B **D.** Níveis de fosforilação de CaMKIIα **E.** Níveis de fosforilação de CaMKIV **F.** Níveis de fosforilação de CREB. Dados estão sendo apresentados como média ± Erro padrão de Média (EPM) de cada grupo com 8 animais cada (*P<0.05 vs. Grupo salina, *** P<0.01 vs. Grupo salina, ### P<0.05 vs. Grupo controle), One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet.

5.4. Pré-tratamento com Sarcosina promove aumenta de expressão de BDNF e aumento de atividade da via de sinalização TrkB/Akt/mTOR

Baseado na evidência de níveis elevados de fosforilação de CREB e sua correlação com a expressão de fatores neurotróficos, nós decidimos analisar a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do receptor tirosina quinase B (TrkB) (Fig.8). Nós também focamos na análise das vias intracelulares

relacionadas com a atividade do receptor TrkB, como a via PI3K/Akt/mTOR.

Encontramos a expressão de BDNF aumentada significativamente no grupo pré-tratado com 500 mg/kg de Sarcosina, quando este foi comparado com o grupo controle, enquanto a fosforilação de TrkB se encontrou aumentada tanto no grupo tratado com a dose de 250 quanto no grupo tratado com a dose de 500 mg/kg de Sarcosina. Além disso, enquanto a expressão de PI3K não se mostrou alterada pelo pré-tratamento com Sarcosina, a fosforilação de Akt e mTOR foram significativamente aumentadas em todos os grupos pré-tratados. Esses dados nos mostram que o pré-tratamento com Sarcosina promove um aumento significativo na expressão de BDNF no córtex cerebral, o que por sua vez leva a um aumento da atividade do receptor TrkB e suas vias de sinalização intracelular PI3K/Akt/mTOR, estando isso diretamente relacionado com modificações que promovem um efeito neuroprotetor.

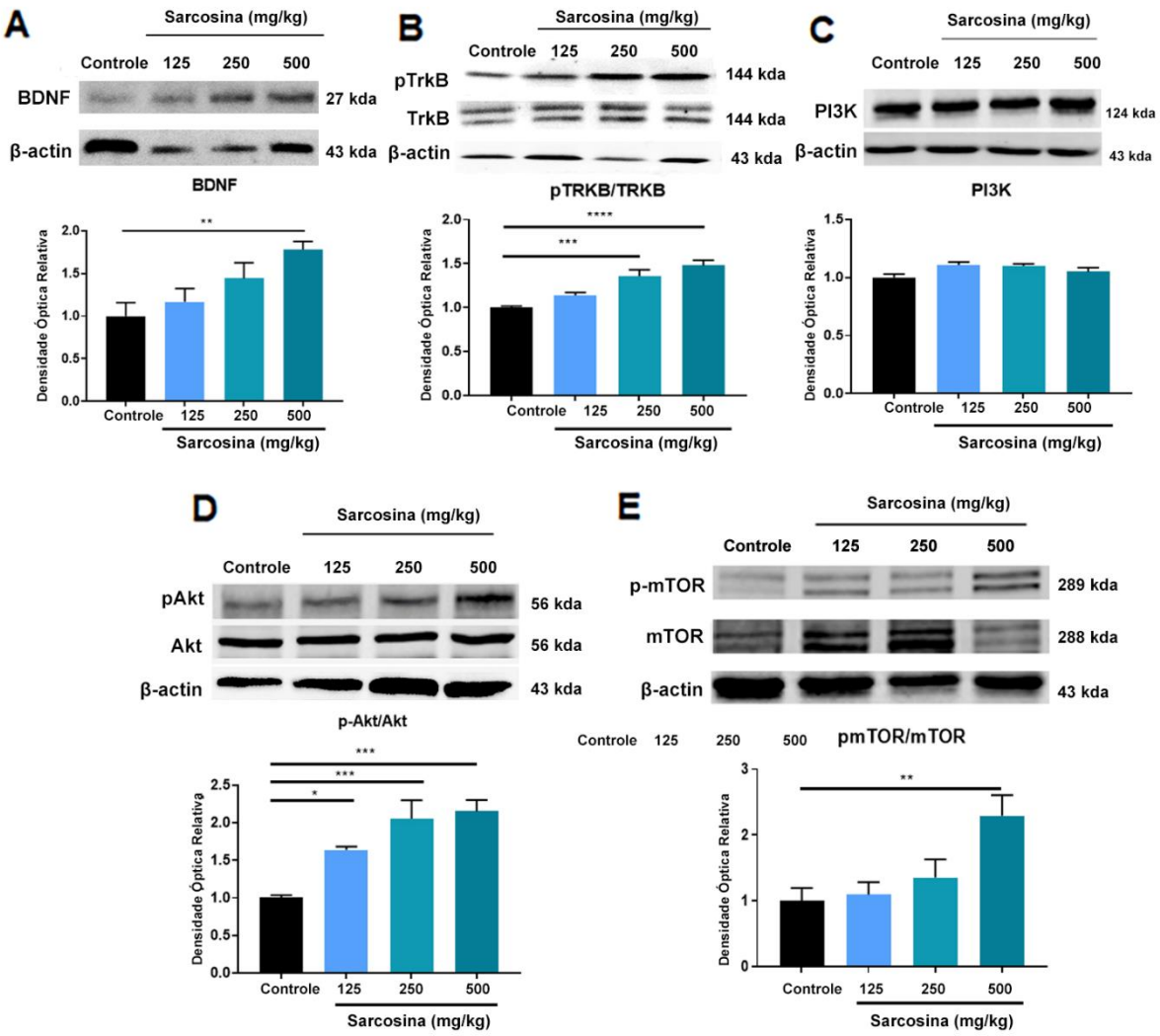

Figura 9. Pré-tratamento com Sarcosina promove aumento da expressão de BDNF, estimula a atividade de TrkB, e aumenta a sinalização intracelular de PI3K/Akt/mTOR. A. Expressão de BDNF

B. Níveis de fosforilação de TrkB **C.** Expressão de PI3K **D.** Níveis de fosforilação de Akt **E.** Níveis de fosforilação de mTOR. Dados estão sendo apresentados como média ± Erro padrão de Média (EPM) de cada grupo com 8 animais cada (*P<0.05 vs. Grupo salina, *** P<0.01 vs. Grupo salina, ### P<0.05 vs. Grupo controle, One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet.

5.5. Pré-tratamento com Sarcosina não altera a sinalização do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Tendo em vista que a inibição farmacológica de GlyT1 promove o aumento dos níveis de BDNF e da ativação do receptor TrkB, nós buscamos analisar o impacto dessa inibição sobre a sinalização de VEGF, uma vez que a angiogênese induzida pela atividade de desse fator de crescimento possui papel neuroprotetor importante contra a isquemia cerebral. Para fazer isso, nós analisamos a expressão de VEGF-A, os níveis de fosforilação de seu receptor, VEGFR2, e os níveis de fosforilação de sua via de sinalização intracelular ERK1/2 (Fig. 9). A expressão de VEGF-A não se alterou em nenhuma das três doses de Sarcosina, quando estas foram comparadas com o grupo controle tratado com salina. Além disso, os níveis de fosforilação de VEGFR2 e ERK1/2 não foram afetados pelo pré-tratamento com Sarcosina em nenhuma das três doses. Diante disso, podemos inferir que a neuroproteção observada no pré-tratamento com Sarcosina não está relacionada com a produção de efeitos pró-angiogênicos mediados pela sinalização de VEGF.

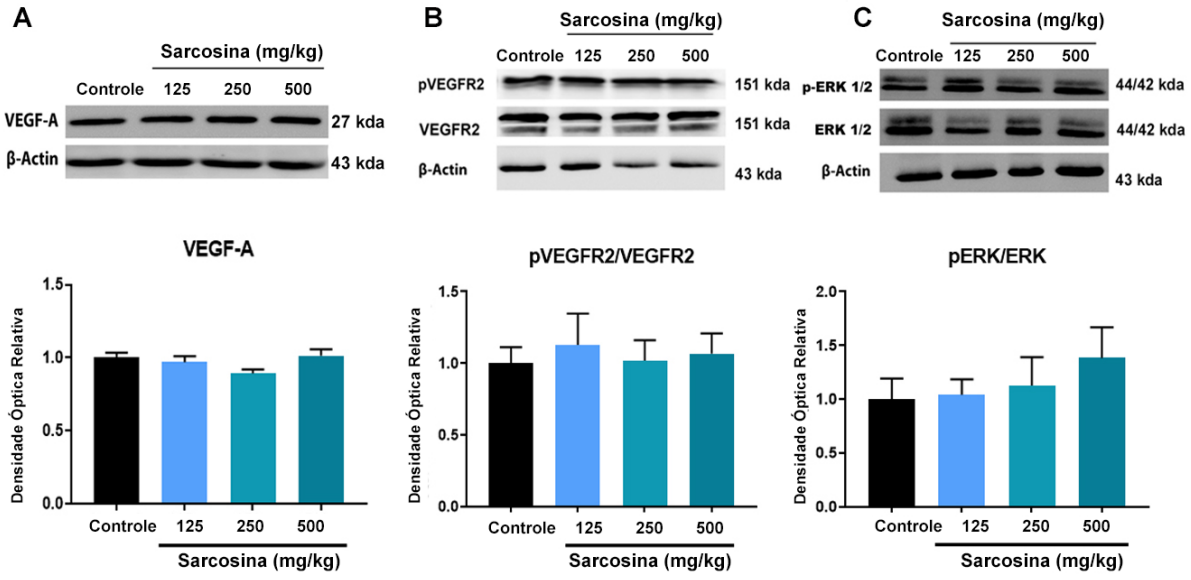

Figura 10. O pré-tratamento com Sarcosina não altera a expressão de VEGF e sua respectiva sinalização intracelular. A. Expressão de VEGF-A **B.** Níveis de fosforilação de VEGFR2 **C.** Níveis de fosforilação de ERK 1/2. Dados estão sendo apresentados como média ± Erro padrão de Média (EPM)

de cada grupo com 8 animais cada (*P<0.05 vs. Grupo salina, *** P<0.01 vs. Grupo salina, ### P<0.05 vs. Grupo controle), One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet.

6. Discussão

A primeira evidência de neuroproteção induzida pela administração com Sarcosina foi obtida no modelo celular de privação de oxigênio e glicose (do inglês OGD- oxygen glucose deprivation) em fatias de hipocampo, onde foi observado uma diminuição na liberação de glutamato, na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, bem como no dano celular após 7 dias de pré-tratamento com sarcosina (88). Além disso, o pré-tratamento com Sarcosina por 7 dias se demonstrou neuroprotetor contra isquemia cerebral global induzida por modelo de oclusão de 4 vasos, estando esse feito diretamente associado com mudanças no sistema de transporte de glicina e a redução da expressão da subunidade GluN2B dos receptores de NMDA (114).

Nesse trabalho nós confirmamos que a Sarcosina de fato promove um efeito neuroprotetor em um modelo animal de isquemia cerebral focal, prevenindo os déficits motores induzidos pelo dano cerebral causado no modelo. De forma interessante, aqui também observamos que o tratamento pós-isquemia tem um efeito de reparo tecidual consistente com a diminuição dos déficits motores, abrindo a possibilidade de investigação da inibição farmacológica de GlyT1 como possível alvo terapêutico para os AVEs isquêmicos.

Devido ao acoplamento funcional dos receptores NMDA e GlyT1, analisamos o impacto do pré-tratamento com a Sarcosina nos subtipos de receptores NMDA. Neste estudo, o pré-tratamento com Sarcosina aumentou a expressão de GluN2A e reduziu a expressão de GluN2B no córtex, sem alterar a expressão de GluN1. Este resultado é ligeiramente diferente do observado no hipocampo do rato, onde apenas se observa uma redução na subunidade GluN2B (114). De forma interessante, a principal razão para essas diferenças de sinalização intracelular é baseada no fato de que as subunidades GluN2A e GluN2B possuem uma baixa homologia em seus domínios intracelulares C-terminal (115). De fato, enquanto a subunidade GluN2B é diretamente associada com a sinalização celular que promove a morte neuronal, como aquelas associadas com a DAPK1(Death Associated Protein Kinase 1), CaMKIIα/calpaína, e MAPK, a subunidade GluN2A é associada com vias de sinalização pró-sobrevivência celular como Ras/Raf/ERK e CaMKIV/CREB (30, 33, 116, 117).

Nesse trabalho nós investigamos as vias de sinalização relacionadas com as subunidades GluN2A e GluN2B baseando-nos nessa informação. Observamos que os níveis de fosforilação de CaMKIIα após o pré-tratamento com Sarcosina sofreram uma diminuição significativa, o que pode estar relacionado com a diminuição da atividade de receptores de NMDA compostos pela subunidade GluN2B. Por outro lado, o pré-tratamento com Sarcosina foi capaz de promover um aumento significativo nos níveis de fosforilação de CaMKIV e CREB, o que por sua vez pode estar relacionado com o aumento da estimulação de receptores NMDA contendo a subunidade GluN2A. Nesse contexto, os nossos resultados indicam que a administração de sarcosina promove um processo de neuromodulação que é capaz de promover a proteção neuronal, e que isso se relacionada com os diferentes papéis que as subunidades GluN2A e GluN2B têm no processo de excitotoxicidade.

Existe uma extensa literatura que demonstra o papel crucial da sinalização de BDNF em diversas doenças neurológicas, possuindo efeito neuroprotetor que media efeitos de sobrevivência celular através da estimulação de receptores de neurotrofinas (118-122). O BDNF age ao se ligar ao receptor TrkB, que é amplamente expresso no sistema nervoso central e age por intermédio da fosforilação de diferentes quinases intracelulares.

A via de PI3K/Akt é uma das mais importantes vias intracelulares ativadas pela fosforilação de TrkB mediada pela ligação com BDNF. Enquanto a Akt por si só é capaz de induzir um estado de sobrevivência celular pela modificação do microambiente celular relacionada com a supressão de atividade apoptótica e regulação do metabolismo celular, ela também pode promover a fosforilação de CREB e mTOR (do inglês Mammalian Target of Rapamycin) (123). De forma interessante, enquanto alguns estudos demonstram que a estimulação de Akt/mTOR promove um efeito de pré-condicionamento contra a isquemia cerebral, outros sugerem que ela não promove um efeito de reparo tecidual eficaz após a lesão cerebral induzida pela isquemia (124-126).

De fato, nossos resultados indicam que o pré-tratamento com Sarcosina pode de fato aumentar a expressão de BDNF e os níveis de fosforilação de TrkB, Akt e mTOR. Nesse sentido, este estudo demonstra que o pré-tratamento com Sarcosina é eficaz na indução de efeito neuroprotetor e que isso está diretamente associado com o aumento na produção de neurotrofinas como o BDNF e sua sinalização intracelular

mediada pelo receptor TrkB.

A literatura recente demonstra que existe uma controvérsia no que se refere ao papel das subunidades GluN2A e GluN2B após a isquemia cerebral. Enquanto alguns estudos propõem que a inibição de receptores de NMDA contendo a subunidade GluN2B é fundamental para indução de efeitos neuroprotetores e reparadores após a isquemia cerebral, existem outros que propõem que a ativação da subunidade GluN2A é crucial para o agravamento da lesão cerebral após isquemia (127-130). Uma interpretação prudente é que o equilíbrio dinâmico dessas duas subunidades se altera durante o processo de reparo tecidual, com a sarcosina promovendo a ativação de vias de sobrevivência celular através do aumento da atividade de GluN2A ou pela redução da atividade de GluN2B.

7.Conclusão

Em conclusão, os nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com sarcosina pode prevenir danos cerebrais causados pelo modelo de MCAO. A administração de sarcosina induz alterações na neurotransmissão glicinérgica e glutamatergica e reduz a expressão da subunidade GluN2B, o que é essencial para prevenir o dano neuronal. Consistente com a sinalização aumentada de GluN2A/CaMKIV/CREB, observamos um aumento na sinalização de BDNF/TRKB após a administração de sarcosina, o que pode ativar a sinalização pró-sobrevivência. São necessários mais estudos para investigar o potencial neuroprotetor e de reparo

tecidual da inibição farmacológica de GlyT1.

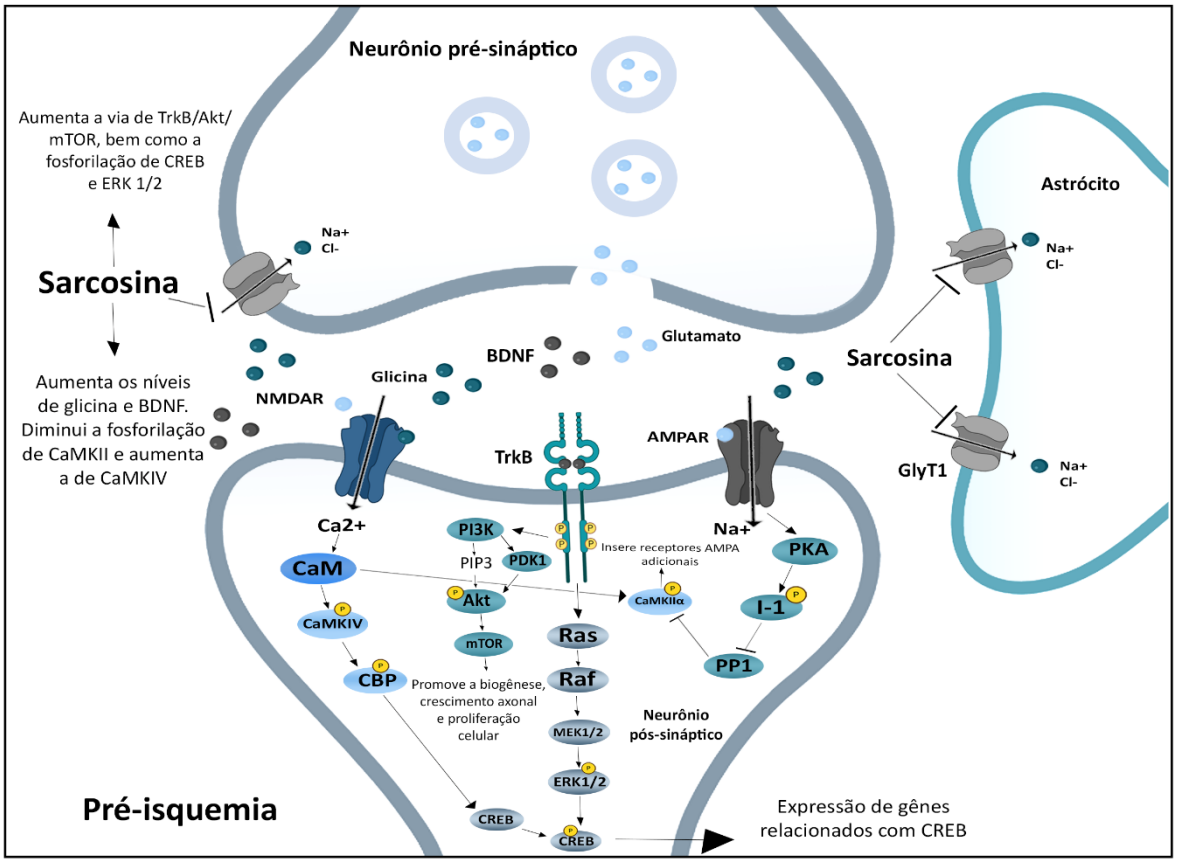

Figura 11. Sarcosina promove efeito neuroprotetor e de reparo tecidual pós-isquemia por vias diferentes. A. Desenho esquemático da indução do efeito neuroprotetor da Sarcosina e suas vias intracelulares relacionadas. (Fonte: autoria própria)

8.Referências

1. Hinkle JL, Guanci MM. Acute ischemic stroke review. Journal of neuroscience nursing. 2007;39(5):285-93.
2. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives. International journal of molecular sciences. 2020;21(20):7609.
3. Jeffrey S, Saver MD. Time is brain—quantified. Stroke. 2006;37(1):263-6.
4. Kelmanson IV, Shokhina AG, Kotova DA, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, et al. In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model. Redox biology. 2021;48:102178.
5. Hu H-J, Song M. Disrupted ionic homeostasis in ischemic stroke and new therapeutic targets. Journal of stroke and cerebrovascular diseases. 2017;26(12):2706-19.
6. Wu L, Xiong X, Wu X, Ye Y, Jian Z, Zhi Z, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury. Frontiers in molecular neuroscience. 2020;13:28.
7. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. Journal of neuroinflammation. 2019;16(1):1-24.
8. Fugate JE, Rabinstein AA. Absolute and relative contraindications to IV rt-PA for acute ischemic stroke. The Neurohospitalist. 2015;5(3):110-21.
9. Atlantis T. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. The Lancet. 2004;363(9411):768-74.
10. Warach SJ, Dula AN, Milling Jr TJ. Tenecteplase thrombolysis for acute ischemic stroke. Stroke. 2020;51(11):3440-51.
11. Gorelick PB, Weisman SM. Risk of hemorrhagic stroke with aspirin use: an update. Stroke. 2005;36(8):1801-7.
12. Russo NW, Petrucci G, Rocca B. Aspirin, stroke and drug-drug interactions. Vascular Pharmacology. 2016;87:14-22.
13. Simon R, Shiraishi K. N-methyl-D-aspartate antagonist reduces stroke size and regional glucose metabolism. Annals of neurology. 1990;27(6):606-11.
14. Graham SH, Chen J, Sharp FR, Simon RP. Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 1993;13(1):88-97.
15. Germano IM, Pitts LH, Meldrum BS, Bartkowski HM, Simon RP. Kynurenate inhibition of cell excitation decreases stroke size and deficits. Annals of neurology. 1987;22(6):730-4.
16. Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD. The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. Current molecular medicine. 2004;4(2):131-6.
17. Mayor-Nunez D, Ji Z, Sun X, Teves L, Garman JD, Tymianski M. Plasmin-resistant PSD-95 inhibitors resolve effect-modifying drug-drug interactions between alteplase and nerinetide in acute stroke. Science Translational Medicine. 2021;13(588):eabb1498.
18. Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, et al. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. Science. 2002;298(5594):846-50.
19. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacological reviews. 2010;62(3):405-96.
20. Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Menniti FS, Traynelis SF. NMDA receptors in the central nervous system. NMDA Receptors: Springer; 2017. p. 1-80.
21. Hestrin S, Nicoll RA, Perkel DJ, Sah P. Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. The Journal of Physiology. 1990;422(1):203-25.
22. Sah P, Hestrin S, Nicoll RA. Properties of excitatory postsynaptic currents recorded in vitro from rat hippocampal interneurones. The Journal of Physiology. 1990;430(1):605-16.
23. Zorumski CF, Izumi Y. NMDA receptors and metaplasticity: mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2012;36(3):989-1000.

24. Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Current opinion in pharmacology. 2007;7(1):39-47.
25. Hollmann M. Heinemann s. Annu Rev Neurosci. 1994;17:723-60.
26. Mayer ML, MacDermott AB, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. Agonist- and voltage-gated calcium entry in cultured mouse spinal cord neurons under voltage clamp measured using arsenazo III. J Neurosci. 1987;7(10):3230-44.
27. Ge Y, Chen W, Axerio-Cilies P, Wang YT. NMDARs in cell survival and death: implications in stroke pathogenesis and treatment. Trends in molecular medicine. 2020;26(6):533-51.
28. von Engelhardt J, Coserea I, Pawlak V, Fuchs EC, Köhr G, Seeburg PH, et al. Excitotoxicity in vitro by NR2A-and NR2B-containing NMDA receptors. Neuropharmacology. 2007;53(1):10-7.
29. Zhou M, Baudry M. Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. Journal of Neuroscience. 2006;26(11):2956-63.
30. Chen M, Lu T-J, Chen X-J, Zhou Y, Chen Q, Feng X-Y, et al. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. Stroke. 2008;39(11):3042-8.
31. Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW, et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. Journal of Neuroscience. 2007;27(11):2846-57.
32. Sun Y, Zhang L, Chen Y, Zhan L, Gao Z. Therapeutic targets for cerebral ischemia based on the signaling pathways of the GluN2B C terminus. Stroke. 2015;46(8):2347-53.
33. Sun Y, Xu Y, Cheng X, Chen X, Xie Y, Zhang L, et al. The differences between GluN2A and GluN2B signaling in the brain. Journal of neuroscience research. 2018;96(8):1430-43.
34. Doyle S, Hansen DB, Vella J, Bond P, Harper G, Zammit C, et al. Vesicular glutamate release from central axons contributes to myelin damage. Nature communications. 2018;9(1):1-15.
35. Wu QJ, Tymianski M. Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. Molecular brain. 2018;11(1):1-14.
36. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. Nature Reviews Neuroscience. 2010;11(10):682-96.
37. Lai TW, Shyu W-C, Wang YT. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. Trends in molecular medicine. 2011;17(5):266-75.
38. Bading H. Therapeutic targeting of the pathological triad of extrasynaptic NMDA receptor signaling in neurodegenerations. Journal of Experimental Medicine. 2017;214(3):569-78.
39. Dahl NA, Balfour WM. Prolonged anoxic survival due to anoxia pre-exposure: brain ATP, lactate, and pyruvate. American Journal of Physiology-Legacy Content. 1964;207(2):452-6.
40. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. Nature Reviews Neuroscience. 2006;7(6):437-48.
41. Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. Neuroscience letters. 1992;139(1):118-21.
42. Kasischke K, Ludolph AC, Riepe MW. NMDA-antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. Neuroscience letters. 1996;214(2-3):175-8.
43. Turovskaya MV, Turovsky EA, Zinchenko VP, Levin SG, Shamsutdinova AA, Godukhin OV. Repeated brief episodes of hypoxia modulate the calcium responses of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons. Neuroscience letters. 2011;496(1):11-4.
44. Chu K, Lee S-T, Sinn D-I, Ko S-Y, Kim E-H, Kim J-M, et al. Pharmacological induction of ischemic tolerance by glutamate transporter-1 (EAAT2) upregulation. Stroke. 2007;38(1):177-82.
45. Ogita K, Okuda H, Yamamoto Y, Nishiyama N, Yoneda Y. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. Journal of neurochemistry. 2003;85(5):1336-46.
46. Soriano FX, Papadia S, Hofmann F, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE. Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. Journal of Neuroscience. 2006;26(17):4509-18.
47. Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simão F, Nassif M, et al.

Protective effect of resveratrol against oxygen–glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of PI3-K pathway. Neurobiology of disease. 2006;24(1):170-82.
48. Raval AP, Dave KR, Pérez-Pinzon MA. Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2006;26(9):1141-7.
49. Thompson JW, Dave KR, Saul I, Narayanan SV, Perez-Pinzon MA. Epsilon PKC increases brain mitochondrial SIRT1 protein levels via heat shock protein 90 following ischemic preconditioning in rats. PloS one. 2013;8(9):e75753.
50. Zhan R-Z, Wu C, Fujihara H, Taga K, Qi S, Naito M, et al. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2001;21(5):529-40.
51. Danysz W, Parsons CG. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. Pharmacological reviews. 1998;50(4):597-664.
52. Hernandes MS, Troncone LRP. Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. Journal of neural transmission. 2009;116(12):1551-60.
53. Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. British journal of pharmacology. 2006;147(S1):S109-S19.
54. Shank R, Aprison M. THE METABOLISM IN VIVO OF GLYCINE AND SERINE IN EIGHT AREAS OF THE RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM 1. Journal of neurochemistry. 1970;17(10):1461-75.
55. Hopkin J, Neal M. Thr release of 14C-glycine from electrically stimulated rat spinal cord slices. British Journal of Pharmacology. 1970;40(1):136P+.
56. Werman R, Davidoff R, Aprison M. Inhibitory of glycine on spinal neurons in the cat. Journal of neurophysiology. 1968;31(1):81-95.
57. Aprison M, Werman R. The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. Life sciences. 1965;4(21):2075-83.
58. Waseem TV, Fedorovich SV. Presynaptic glycine receptors influence plasma membrane potential and glutamate release. Neurochemical research. 2010;35(8):1188-95.
59. Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. Physiological reviews. 2004;84(4):1051-95.
60. Johnson J, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature. 1987;325(6104):529-31.
61. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in Xenopus oocytes. Science. 1988;241(4867):835-7.
62. Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. Nature reviews Drug discovery. 2015;14(8):543-60.
63. Giacomini KM, Huang SM. Transporters in drug development and clinical pharmacology. Wiley Online Library; 2013. p. 3-9.
64. Schlessinger A, Yee SW, Sali A, Giacomini KM. SLC classification: an update. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2013;94(1):19-23.
65. Borden LA, Smith KE, Gustafson EL, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. Journal of neurochemistry. 1995;64(3):977-84.
66. Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2005;78(3):260-77.
67. Kanai Y, Hediger MA. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. Pflügers Archiv. 2004;447(5):469-79.
68. López-Corcuera B, Martínez-Maza R, Núñez E, Roux M, Supplisson S, Aragón C. Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. Journal of neurochemistry. 1998;71(5):2211-9.
69. Herdon HJ, Godfrey FM, Brown AM, Coulton S, Evans JR, Cairns WJ. Pharmacological assessment of the role of the glycine transporter GlyT-1 in mediating high-affinity glycine uptake by rat cerebral cortex and cerebellum synaptosomes. Neuropharmacology. 2001;41(1):88-96.
70. Roux MJ, Supplisson S. Neuronal and glial glycine transporters have different

stoichiometries. Neuron. 2000;25(2):373-83.
71. Zafra F, Aragon C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C, Storm-Mathisen J. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. Journal of Neuroscience. 1995;15(5):3952-69.
72. Cubelos B, Giménez C, Zafra F. Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. Cerebral cortex. 2005;15(4):448-59.
73. Jursky F, Nelson N. Localization of glycine neurotransmitter transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor. Journal of neurochemistry. 1995;64(3):1026-33.
74. Zafra F, Gomeza J, Olivares L, Aragón C, Giménez C. Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. European Journal of Neuroscience. 1995;7(6):1342-52.
75. Marques BL, Oliveira-Lima OC, Carvalho GA, de Almeida Chiarelli R, Ribeiro RI, Parreira RC, et al. Neurobiology of glycine transporters: From molecules to behavior. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2020;118:97-110.
76. Zafra F, Ibáñez I, Bartolomé-Martín D, Piniella D, Arribas-Blázquez M, Giménez C. Glycine transporters and its coupling with NMDA receptors. Glial Amino Acid Transporters. 2017:55-83.
77. Eulenburg V, Gomeza J. Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. Brain research reviews. 2010;63(1-2):103-12.
78. Gabernet L, Pauly-Evers M, Schwerdel C, Lentz M, Bluethmann H, Vogt K, et al. Enhancement of the NMDA receptor function by reduction of glycine transporter-1 expression. Neuroscience letters. 2004;373(1):79-84.
79. Black MD, Varty GB, Arad M, Barak S, De Levie A, Boulay D, et al. Procognitive and antipsychotic efficacy of glycine transport 1 inhibitors (GlyT1) in acute and neurodevelopmental models of schizophrenia: latent inhibition studies in the rat. Psychopharmacology. 2009;202(1):385-96.
80. Coyle JT, Tsai G. The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. Psychopharmacology. 2004;174(1):32-8.
81. Moghaddam B, Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. Neuropsychopharmacology. 2012;37(1):4-15.
82. Javitt DC, Frusciante M. Glycyldodecylamide, a phencyclidine behavioral antagonist, blocks cortical glycine uptake: implications for schizophrenia and substance abuse. Psychopharmacology. 1997;129(1):96-8.
83. Lane H-Y, Liu Y-C, Huang C-L, Chang Y-C, Liau C-H, Perng C-H, et al. Sarcosine (N-methylglycine) treatment for acute schizophrenia: a randomized, double-blind study. Biological psychiatry. 2008;63(1):9-12.
84. Zakowicz P, Pawlak J. Glycine transporters in schizophrenia. A new hope or informational noise?
85. Goh KK, Wu T-H, Chen C-H, Lu M-L. Efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor modulator augmentation in schizophrenia: a meta-analysis of randomised, placebo-controlled trials. Journal of Psychopharmacology. 2021;35(3):236-52.
86. Marchi M, Galli G, Magarini FM, Mattei G, Galeazzi GM. Sarcosine as an add-on treatment to antipsychotic medication for people with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2021;17(4):483-93.
87. Chen Z, Hu B, Wang F, Du L, Huang B, Li L, et al. Glycine bidirectionally regulates ischemic tolerance via different mechanisms including NR2A-dependent CREB phosphorylation. Journal of Neurochemistry. 2015;133(3):397-408.
88. Pinto MCX, Mourão FAG, Binda NS, Leite HR, Gomez MV, Massensini AR, et al. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning. Neurochemistry international. 2012;61(5):713-20.
89. Cunha Xavier Pinto M, Lima IVdA, Pessoa da Costa FL, Rosa DV, Mendes-Goulart VA, Resende RR, et al. Glycine transporters type 1 inhibitor promotes brain preconditioning against

NMDA-induced excitotoxicity. Neuropharmacology. 2015;89:274-81.
90. Calautti C, Leroy F, Guincestre J-Y, Marie R-M, Baron J-C. Sequential activation brain mapping after subcortical stroke: changes in hemispheric balance and recovery. Neuroreport. 2001;12(18):3883-6.
91. Tombari D, Loubinoux I, Pariente J, Gerdelat A, Albucher J-F, Tardy J, et al. A longitudinal fMRI study: in recovering and then in clinically stable sub-cortical stroke patients. Neuroimage. 2004;23(3):827-39.
92. Ming G-l, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron. 2011;70(4):687-702.
93. Alvarez-Buylla A, Garcıa-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. Journal of Neuroscience. 2002;22(3):629-34.
94. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. Journal of Neuroscience. 2006;26(4):1269-74.
95. Lichtenwalner RJ, Parent JM. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2006;26(1):1-20.
96. Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy. The Neuroscientist. 2005;11(5):408-16.
97. Marques BL, Carvalho GA, Freitas EMM, Chiareli RA, Barbosa TG, Di Araújo AGP, et al. The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2019;95:98-110.
98. Bacigaluppi M, Pluchino S, Jametti LP, Kilic E, Kilic Ü, Salani G, et al. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. Brain. 2009;132(8):2239-51.
99. Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Transgenic ablation of doublecortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107(17):7993-8.
100. Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, et al. Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. Hippocampus. 2004;14(7):861-75.
101. Yang X-T, Bi Y-Y, Feng D-F. From the vascular microenvironment to neurogenesis. Brain research bulletin. 2011;84(1):1-7.
102. Emsley JG, Hagg T. α6β1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. Experimental neurology. 2003;183(2):273-85.
103. Li Q, Ford MC, Lavik EB, Madri JA. Modeling the neurovascular niche: VEGF-and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. Journal of neuroscience research. 2006;84(8):1656-68.
104. Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. Molecular and Cellular Neuroscience. 1999;13(6):450-64.
105. Lee HJ, Kim KS, Park IH, Kim SU. Human neural stem cells over-expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model. PloS one. 2007;2(1):e156.
106. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(18):11946-50.
107. Feng W, Belagaje SR, editors. Recent advances in stroke recovery and rehabilitation. Seminars in neurology; 2013: Thieme Medical Publishers.
108. Detante O, Jaillard A, Moisan A, Barbieux M, Favre IM, Garambois K, et al. Biotherapies in stroke. Revue Neurologique. 2014;170(12):779-98.
109. Wayman C, Duricki DA, Roy LA, Haenzi B, Tsai S-Y, Kartje G, et al. Performing permanent distal middle cerebral with common carotid artery occlusion in aged rats to study cortical ischemia with sustained disability. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2016(108):e53106.
110. Joshi CN, Jain SK, Murthy PSR. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. Brain research protocols. 2004;13(1):11-7.

111. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. Neuropharmacology. 2000;39(5):777-87.
112. Miedel CJ, Patton JM, Miedel AN, Miedel ES, Levenson JM. Assessment of Spontaneous Alternation, Novel Object Recognition and Limb Clasping in Transgenic Mouse Models of Amyloid-β and Tau Neuropathology. J Vis Exp. 2017(123).
113. Oliveira-Lima OC, Pinto MCX, Duchene J, Qadri F, Souza LL, Alenina N, et al. Mas receptor deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced cerebral and systemic inflammation in mice. Immunobiology. 2015;220(12):1311-21.
114. Pinto MCX, Simão F, da Costa FLP, Rosa DV, de Paiva MJN, Resende RR, et al. Sarcosine preconditioning induces ischemic tolerance against global cerebral ischemia. Neuroscience. 2014;271:160-9.
115. Ryan TJ, Emes RD, Grant SG, Komiyama NH. Evolution of NMDA receptor cytoplasmic interaction domains: implications for organisation of synaptic signalling complexes. BMC neuroscience. 2008;9:6.
116. Terasaki Y, Sasaki T, Yagita Y, Okazaki S, Sugiyama Y, Oyama N, et al. Activation of NR2A Receptors Induces Ischemic Tolerance through CREB Signaling. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2010;30(8):1441-9.
117. Gardoni F, Bellone C, Viviani B, Marinovich M, Meli E, Pellegrini-Giampietro DE, et al. Lack of PSD-95 drives hippocampal neuronal cell death through activation of an alpha CaMKII transduction pathway. The European journal of neuroscience. 2002;16(5):777-86.
118. Buttenschøn HN, Foldager L, Elfving B, Poulsen PHP, Uher R, Mors O. Neurotrophic factors in depression in response to treatment. Journal of affective disorders. 2015;183:287-94.
119. Wu C-H, Hung T-H, Chen C-C, Ke C-H, Lee C-Y, Wang P-Y, et al. Post-injury treatment with 7, 8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, protects against experimental traumatic brain injury via PI3K/Akt signaling. PloS one. 2014;9(11):e113397.
120. Massa SM, Yang T, Xie Y, Shi J, Bilgen M, Joyce JN, et al. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. The Journal of clinical investigation. 2010;120(5):1774-85.
121. Schmid DA, Yang T, Ogier M, Adams I, Mirakhur Y, Wang Q, et al. A TrkB small molecule partial agonist rescues TrkB phosphorylation deficits and improves respiratory function in a mouse model of Rett syndrome. Journal of Neuroscience. 2012;32(5):1803-10.
122. Yang J, Yan H, Li S, Zhang M. Berberine ameliorates MCAO induced cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of the BDNF–TrkB–PI3K/Akt signaling pathway. Neurochemical research. 2018;43(3):702-10.
123. Rafalski VA, Brunet AJPiN. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. 2011;93:182-203.
124. Namura S, Nagata I, Kikuchi H, Andreucci M, Alessandrini A. Serine-threonine protein kinase Akt does not mediate ischemic tolerance after global ischemia in the gerbil. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2000;20(9):1301-5.
125. García L, Burda J, Hrehorovská M, Burda R, Martín ME, Salinas M. Ischaemic preconditioning in the rat brain: effect on the activity of several initiation factors, Akt and extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation, and GRP78 and GADD34 expression. Journal of neurochemistry. 2004;88(1):136-47.
126. Gao X, Zhang H, Steinberg G, Zhao H. The Akt pathway is involved in rapid ischemic tolerance in focal ischemia in Rats. Translational stroke research. 2010;1(3):202-9.
127. Sun Y, Cheng X, Zhang L, Hu J, Chen Y, Zhan L, et al. The Functional and Molecular Properties, Physiological Functions, and Pathophysiological Roles of GluN2A in the Central Nervous System. Molecular neurobiology. 2017;54(2):1008-21.
128. Yao H, Liu W, Liao H, Sheng T, Chen P, Zhou H, et al. Geniposide attenuates postischemic long-term potentiation via GluN2A. Pakistan journal of pharmaceutical sciences. 2021;34(3):909-14.
129. Sasaki-Hamada S, Suzuki A, Sanai E, Matsumoto K, Oka JI. Neuroprotection by chotosan, a

Kampo formula, against glutamate excitotoxicity involves the inhibition of GluN2B-, but not GluN2A-containing NMDA receptor-mediated responses in primary cultured cortical neurons. Journal of pharmacological sciences. 2017;135(3):134-7.
130. Jindal A, Rajagopal S, Winter L, Miller JW, Jacobsen DW, Brigman J, et al. Hyperhomocysteinemia leads to exacerbation of ischemic brain damage: Role of GluN2A NMDA receptors. Neurobiol Dis. 2019;127:287-302.

9.Anexos

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

UFG

C E RT I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **"Desenvolvimento de novos protótipos de fármacos neuroprotetores em modelos de isquemia cerebral"**, registrada com o protocolo **nº 041/19**, sob a responsabilidade de **Mauro Cunha Xavier Pinto** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 04/11/2019.

- Finalidade: ( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 04/11/2019 a 30/11/2024
- Espécie/linhagem/raça: camundongos das linhagens Swiss e C57BL/6
- Nº de animais autorizados: 640 animais
- Peso/Idade: 40-50 gramas/8-12 semanas
- Sexo: machos
- Origem (fornecedor): Biotério Central/ICB e Biotério do IPTSP

[redacted]
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

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