



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Efeito Neuroprotetor do Inibidor do Transportador de
Prolina (LQFM164) em Modelo Animal de Isquemia Cerebral**

JOÃO ELIAS PINHEIRO SOUSA DE PAULA

Goiânia-GO

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

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

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

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

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

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

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

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

2. Nome completo do autor

JOÃO ELIAS PINHEIRO SOUSA DE PAULA

3. Título do trabalho

Efeito Neuroprotetor do Inibidor do Transportador de Prolina (LQFM164) em Modelo Animal de Isquemia Cerebral

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

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 25/06/2025, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Elias Pinheiro Sousa De Paula, Discente**, em 25/06/2025, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5456415** e o código CRC **1DAFF9FD**.

JOÃO ELIAS PINHEIRO SOUSA DE PAULA

**Efeito Neuroprotetor do Inibidor do Transportador
de Prolina (LQFM164) em Modelo Animal de
Isquemia Cerebral**

Dissertação de mestrado apresentada ao
programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas: Área de concentração em
Fármacos e Medicamentos da Faculdade de
Farmácia, da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto

Goiânia-GO

2025

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

Paula, João Elias Pinheiro Sousa De
Efeito Neuroprotetor do Inibidor do Transportador de Prolina
(LQFM164) em Modelo Animal de Isquemia Cerebral [manuscrito] /
João Elias Pinheiro Sousa De Paula. - 2025.
LXXIV, 74 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Mauro Cunha Xavier Pinto; co-orientadora
Dra. Onésia Cristina de Oliveira-Lima.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Goiânia, 2025.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

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

1. L-prolina. 2. MCAO. 3. Neuroproteção. 4. PROT. 5. SLC6A7. I.
Pinto, Mauro Cunha Xavier , orient. II. Título.

CDU 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata Nº **248** da sessão de Defesa de Dissertação de **JOÃO ELIAS PINHEIRO SOUSA DE PAULA** que confere o título de Mestre em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **vinte e três dias do mês de maio de dois mil e vinte e cinco**, na sala de defesas/4º andar da Farmácia/UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“EFEITO NEURORREPARADOR DA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR DE PROLINA (PROT/SLC6A7) 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 Bruno Benneti Giunta Torres (EVZ/UFG)**, membro titular externo; **Professora Doutora Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título. 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 (ICB/UFG)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **vinte e três dias do mês de maio de dois mil e vinte e cinco**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Efeito Neuroprotetor do Inibidor do Transportador de Prolina (LQFM164) em Modelo Animal de Isquemia Cerebral



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 17/06/2025, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Benetti Giunta Torres, Professor do Magistério Superior**, em 18/06/2025, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Augusto Rodrigues De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 18/06/2025, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5445851** e o código CRC **D710BA90**.

Referência: Processo nº 23070.023100/2025-42

SEI nº 5445851



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof(a). Dr(a). Stephânia Fleury Taveira

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof(a) Dr(a). Carolina Horta Andrade

Goiânia-GO

2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto

Professor Associado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. Bruno Benneti Giunta Torres / Membro Titular

Professor Adjunto da Faculdade de Veterinária e Zootecnia, EVZ/UFG

Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira / Membro Titular

Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. Gustavo Almeida de Carvalho / Membro Suplente

Professor Associado do Centro Universitário de Mineiros, UniFimes

Data: 23 de Maio de 2025

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Claison Pinheiro e Cristina Pinheiro, que foram minha âncora ao longo desta jornada, e aos meus irmãos, Victor Raphael e Clayson Filho Pinheiro, bem como à minha cunhada Tháfila Yngred, pelo apoio incondicional.

A toda minha família, em especial as minhas vózinhas Doraci Rosa Pinheiro (*in memoriam*) e Maria Eunice De Paula. Assim como minha maior inspiração de vida, meu avô Lauriston José de Paula; Aos melhores tios do mundo: Kátia De Paula, Osman De Paula, Meire De Paula, Keila De Paula e Cristiane De Paula meus mais sinceros obrigado por todo carinho e cuidado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Pinto, e à minha coorientadora, Profa. Dra. Onésia Oliveira-Lima, sou grato pela confiança depositada e pelo constante suporte acadêmico e pessoal. Aos colegas Dr. Gustavo Carvalho, Me. Daniel Cavalcante, Me. Ítalo Nunes, Dra. Raphaela Chiarelli, Me. Eduardo Rosa e Dr. Giovanni Leoncini, agradeço pelos valiosos ensinamentos compartilhados. Estendo minha gratidão também aos alunos de Iniciação Científica, Maria Luísa, Amanda Quintanilha, Lucas Nascimento e Paul Tambwe, cujas contribuições enriqueceram esta caminhada.

À minha cachorrinha Mel (*in memoriam*), cujo carinho e lambeijos me deram forças nos momentos mais desafiadores, deixo um agradecimento especial. Espero que o céu tenha um lugar reservado para você.

Aos queridos professores, Dr. Bruno Torres e Dra. Gisele Oliveira muito obrigado pelo carinho e por partilhar seus conhecimentos neste trabalho.

Aos amigos que a vida me presenteou — Luan Phelipe, Gustavo Borges, Laura Olímpia, Flávio Domingos, Kainann Santanna, Luanna Lhis, Mireya Souza, Lucas Martins e até você, Lorena Andrielly —, expresso minha profunda gratidão por estarem ao meu lado.

Por fim, agradeço à CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.



“Estou entre aqueles que acreditam que a ciência possui uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico, ele é também uma criança colocada diante de um fenômeno natural, que o impressiona como um conto de fadas”

Marie Curie

Efeito Neuroprotetor do Inibidor do Transportador de Prolina (LQFM164) em Modelo Animal de Isquemia Cerebral

João Elias Pinheiro Sousa De Paula, Onésia Cristina de Oliveira Lima, Mauro Cunha Xavier Pinto¹

¹Labortatório de Neurofarmacologia e Neuroquímica - NeuroLab, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG.

Introdução: A isquemia cerebral é uma condição neurológica debilitante associada a altos índices de mortalidade e morbidade. Para isso se destaca a importância de se estudar novos protótipos para o tratamento. **Objetivo:** Investigar o potencial neuroprotetor do protótipo LQFM164 (Inibidor do transportador de L-prolina PROT/SLC6a7) em modelo animal de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) e o funcionamento da farmacocinética e farmacodinâmica do composto por análises *in silico*. **Métodos:** Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo de MCAO e tratados com diferentes doses (1,25mg/kg; 2,5mg/kg; e 5mg/kg) por 5 dias. Avaliações incluíram: *Docking* e Dinâmica Molecular assim como avaliações de testes motores (*Limb Clasp*ing e Teste do Cilindro) e morfológicas (Coloração por TTC). **Resultados e Discussões:** Os resultados indicam que o LQFM164 promove redução significativa na área de infarto cerebral, nas doses de 2,5mg/kg ($9,33 \pm 1,80\%$) e na dose de 5mg/kg ($4,70 \pm 0,91\%$) e melhora funcional nos testes motores, sugerindo o efeito de neuroproteção. **Conclusão:** O protótipo LQFM164 apresentou efeito neuroreparador em modelo de isquemia cerebral territorial, evidenciando-se como um candidato promissor para terapias futuras em desordens neurológicas.

Palavras-chave: L-prolina; MCAO; Neuroproteção; PROT; SLC6a7.

Neuroprotective Effect of Proline Transporter Inhibitor (LQFM164) in Animal Model of Cerebral Ischemia**João Elias Pinheiro Sousa De Paula, Onésia Cristina de Oliveira Lima, Mauro Cunha Xavier Pinto¹**¹Laboratório de Neurofarmacologia e Neuroquímica – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG.

Introduction: Cerebral ischemia is a debilitating neurological condition associated with high rates of mortality and morbidity. This highlights the importance of studying new prototypes for treatment. **Objective:** To investigate the neuroprotective potential of the prototype LQFM164 (an inhibitor of the L-proline transporter PROT/SLC6A7) in an animal model of middle cerebral artery occlusion (MCAO), as well as the compound's pharmacokinetics and pharmacodynamics through in silico analyses. **Methods:** C57BL/6 mice were subjected to the MCAO model and treated with different doses (1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg, and 5 mg/kg) for five days. Evaluations included molecular docking and molecular dynamics simulations, as well as motor assessments (Limb Clasp and Cylinder Test) and morphological analysis (TTC staining). **Results and Discussions:** The results indicate that LQFM164 significantly reduces the cerebral infarct area at doses of 2.5 mg/kg ($9.33 \pm 1.80\%$) and 5 mg/kg ($4.70 \pm 0.91\%$), and improves motor function in behavioral tests, suggesting a neuroprotection effect. **Conclusion:** The prototype LQFM164 demonstrated a neurorestorative effect in a territorial cerebral ischemia model, highlighting its potential as a promising candidate for future therapies in neurological disorders.

Keywords: L-proline; MCAO; Neuroprotection; PROT; SLC6a7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da Fisiopatologia da Isquemia Cerebral.....	25
Figura 2: Ilustração dos Mecanismos de Neuroreparo.....	29
Figura 3: Distribuição Neuroanatômica do SLC6A7.....	31
Figura 4: Representação dos Processos de Quimioinformática.....	36
Figura 5: Representação Estrutural das Moléculas.....	37
Figura 6: Imagem ilustrativa da Dinâmica Molecular.....	38
Figura 7: Imagem ilustrativa do teste de Campo Aberto.....	40
Figura 8: Imagem ilustrativa do teste do Labirinto em Y.....	41
Figura 9: Imagem do Delineamento Experimental.....	42
Figura 10: Imagem ilustrativa do Teste do Cilindro.....	44
Figura 11: Imagem ilustrativa do Teste de <i>Limb Clasp</i> ing.....	45
Figura 12: Resultados Quimioinformática e Predição Farmacocinética.....	46
Figura 13: Resultados da Dinâmica Molecular.....	50
Figura 14: O tratamento com LQFM164 reduz o padrão de mobilidade.....	51
Figura 15: O tratamento com LQFM164 altera a alternância no Labirinto em Y.....	53
Figura 16: O tratamento com LQFM164 favorece o neuroreparo no modelo de MCAO.....	54
Figura 17: O tratamento com LQFM164 preserva o <i>score motor</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Score de Docking Molecular – DockThor.....	49
Tabela 2: Padrões Farmacocinéticos - SwissADME.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHE	Barreira Hematoencefálica
BDNE	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
COW	Círculo de Willis
CREB	Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao AMP Cíclico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ΔG	Energia livre de Gibbs (Energia livre de ligação)
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GSH-Px	Glutationa Peroxidase
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i> - Máquina de Groningen para Simulações Químicas
HO-1	Heme Oxigenase-1
IP	Intraperitoneal
MCAO	Oclusão da Artéria Cerebral Média
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NRF2	Fator Nuclear do Eritroide 2
PROT	Transportador de L-prolina
SNC	Sistema Nervoso Central
tPA	Ativador do Plasminogênio Tecidual
TTC	Cloreto de 5-Trifenil-Tetrazólio

1 DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA	xviii
2 INTRODUÇÃO.....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	22
3.2 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL.....	23
3.3 NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E EXCITOTOXICIDADE.....	25
3.4 CARACTERÍSTICAS DO NEURORREPARO	27
3.5 PROLINA E TRANSPORTADORES DE PROLINA.....	29
3.6 INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES DE PROLINA.....	31
4. OBJETIVOS.....	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1.1. Análises de Quimioinformática.....	34
5.1.2. Predição de parâmetros Farmacocinéticos.....	35
5.1.3 Predição de ligação pela técnica de Dinâmica Molecular	36
5.2. Reagentes e equipamentos.....	37
5.3. Animais Experimentais	38
5.3.1. Padronização Experimental.....	38
5.4. Testes comportamentais.....	39
5.4.1. Teste de campo aberto.....	39
5.4.2. Teste do labirinto em Y	39
5.5. Desenho Experimental	40
5.6 Modelo de oclusão da artéria cerebral média – MCAO	41

5.7. Avaliação Morfológica	42
5.8. Avaliações Motoras	43
5.8.1 Teste do Cilindro	43
5.8.2. Teste de Limb Claspig.....	43
5.9. Análise Estatística	45
6 RESULTADOS	46
6.1. LQFMQ164 potencialmente se liga à PROT/SLC6A7.....	46
6.2. LQFM164 mantém um bom equilíbrio entre mobilidade e interação com o PROT	49
6.3. O tratamento com LQFM164 reduz o padrão de mobilidade	50
6.4. O tratamento com LQFM164 altera a alternância no Labirinto em Y.....	53
6.5. O tratamento com LQFM164 favorece o neuroreparo no modelo de MCAO.....	54
5.6 O tratamento com LQFM164 preserva o <i>score</i> motor em animais submetido ao modelo de MCAO – <i>Score</i> Neurológico.....	56
7. DISCUSSÃO.....	58
8 CONCLUSÃO	64
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE A – COMISSÃO DE ÉTICA DE USO EM ANIMAIS.....	74

O Acidente Vascular Encefálico (AVE), especialmente o tipo isquêmico, que ocorre quando há uma interrupção no fluxo de sangue para o cérebro, é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo. Infelizmente, os tratamentos disponíveis ainda são bastante limitados. Muitas vezes, eles precisam ser aplicados em poucos minutos após o início dos sintomas, e em muitos casos são procedimentos invasivos. Por isso, há uma busca constante por novos medicamentos que possam proteger o cérebro e ajudar na recuperação após um AVE.

Neste projeto, estudamos um novo composto chamado LQFM174, que atua sobre uma proteína do cérebro conhecida como transportador de prolina (PROT), também chamada de SLC6A7. Essa proteína ajuda a controlar os níveis de um aminoácido chamado L-prolina, que pode estar envolvido em processos que prejudicam os neurônios, principalmente quando há excesso de estímulo nas células cerebrais, algo chamado de excitotoxicidade.

A ideia é que, ao inibir essa proteína (o PROT), o LQFM174 possa ajudar a equilibrar a atividade dos neurônios após um AVE e proteger o cérebro contra danos maiores. Para testar essa hipótese, utilizamos camundongos que foram submetidos a um modelo experimental de isquemia cerebral, parecido com o que acontece em um AVE humano. Esses animais foram tratados com o LQFM174 durante cinco dias.

Os resultados foram animadores: os camundongos que receberam o tratamento apresentaram uma área de lesão cerebral menor e tiveram uma melhora significativa na coordenação e nos movimentos. Isso sugere que o LQFM174 tem potencial para ajudar na recuperação de pacientes após um AVE.

Em resumo, este estudo aponta para uma nova possibilidade de tratamento, que pode futuramente beneficiar pessoas que sofreram um acidente vascular cerebral. A pesquisa também reforça a importância da ciência na descoberta de novas soluções para problemas de saúde graves e comuns. Com mais estudos, esperamos transformar esses achados em aplicações reais que melhorem a qualidade de vida dos pacientes.

O acidente vascular cerebral (AVC) apresenta-se em duas formas principais: isquêmica e hemorrágica. O AVC hemorrágico é caracterizado pelo rompimento de um vaso sanguíneo, enquanto o isquêmico resulta da obstrução de um vaso sanguíneo (Alsbrook et al., 2023; Bao et al., 2024). O AVC isquêmico pode ser causado por embolia vascular, trombose ou doenças sistêmicas. Este evento patológico desencadeia mecanismos como necrose isquêmica, apoptose celular, estresse oxidativo e inflamação (Chavda et al., 2022).

O acidente vascular cerebral é a segunda principal causa de morte e incapacidade no mundo, gerando impacto significativo na sociedade. Em 2016, foram registrados 13,7 milhões de novos casos globais, dos quais aproximadamente 87% correspondiam a AVCs isquêmicos. No mesmo ano, o AVC foi responsável por 5,5 milhões de óbitos, sendo 2,7 milhões atribuídos aos casos isquêmicos. A prevalência global da doença atingiu 80,1 milhões de pessoas, com distribuição de 41,1 milhões entre mulheres e 39,0 milhões entre homens. Apesar das melhorias nas taxas de mortalidade ajustadas por idade, o número absoluto de casos continua a crescer, com maior incidência em países de baixa e média renda, onde ocorrem mais de 63% dos casos isquêmicos e 80% dos hemorrágicos (Saini, Guada e Yavagal, 2021).

A busca por novos tratamentos tem impulsionado a descoberta de novos fármacos e alvos terapêuticos capazes de atuar contra essa doença. Uma abordagem essencial nesse processo é a utilização de modelos *in vivo*, como o modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO), amplamente empregado em murinos para mimetizar o dano isquêmico (Feng et al., 2021). Esses modelos são fundamentais para aprimorar perspectivas farmacológicas, pois permitem estudos detalhados dos danos fisiológicos associados ao AVC isquêmico. O modelo de MCAO é especialmente relevante por sua capacidade de reproduzir aspectos fisiopatológicos da doença, incluindo falha energética, aumento nos níveis intracelulares de cálcio, excitotoxicidade, produção de radicais livres, inflamação e apoptose celular, características importantes para a avaliação de potenciais fármacos neuroreparadores (Li e Zhang, 2021).

Para potencializar as pesquisas, utilizam-se abordagens em quimioinformática, que representam estratégias complementares para otimizar os estudos experimentais, destacando-se como ferramentas eficazes na triagem de novos fármacos. Esses métodos permitem a predição

da atividade molecular das substâncias, enquanto modelos experimentais fornecem a validação prática dessas predições. A integração entre análises de quimioinformática e validação experimental é essencial para a exploração de alvos moleculares e descoberta de novas moléculas, além de avançar metodologias complementares na identificação de novos tratamentos (Pan et al., 2025).

Uma das abordagens em quimioinformática com grande potencial na triagem de novos fármacos é a aplicação combinada de estudos de *docking molecular* e dinâmica molecular. O *docking* permite prever, em nível atômico, como uma molécula interage com seu alvo proteico, identificando possíveis sítios de ligação e estimando a afinidade por meio de *scores* energéticos. Para complementar, a dinâmica molecular avalia a estabilidade do complexo ligante-receptor ao longo do tempo, simulando condições fisiológicas. A integração dessas metodologias torna o processo mais preciso e eficiente (Rhabori et al., 2025).

Atualmente, as abordagens terapêuticas para o tratamento do AVC concentram-se principalmente em métodos de reperfusão, incluindo a aplicação intravenosa de ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e a trombectomia mecânica (Peng et al., 2025). Avanços na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na lesão isquêmica têm fomentado o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Bersano e Gatti, 2023).

No contexto de novas abordagens terapêuticas para a isquemia, a modulação de alvos moleculares que possam ativar mecanismos no acidente vascular cerebral continua sendo um foco importante de estudos voltados para a descoberta de novas abordagens terapêuticas que possam mitigar os efeitos da isquemia cerebral (Owjfard et al., 2024).

A excitotoxicidade glutamatérgica é um dos principais mecanismos envolvidos no dano neuronal decorrente da isquemia cerebral, sendo amplamente reconhecida como um elo crítico entre o AVC e a morte neuronal. Durante a isquemia, a liberação exacerbada de glutamato leva à ativação excessiva dos receptores ionotrópicos, especialmente os do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), promovendo influxo de cálcio e desencadeando cascatas de lesão celular. Nesse contexto, a modulação da neurotransmissão glutamatérgica surge como uma via terapêutica promissora para o AVC, com potencial não apenas de limitar o agravamento da lesão, mas

também de favorecer mecanismos de neuroreparo, promovendo a restauração funcional do tecido cerebral afetado (Severino et al., 2011; Lai, Zhang e Wang, 2014).

A ativação excessiva dos receptores NMDA é um dos principais gatilhos da excitotoxicidade na isquemia cerebral, assim, promovendo um influxo exacerbado de cálcio e desencadeando cascatas neurotóxicas. A partir disso, a modulação seletiva desses receptores representa uma estratégia terapêutica promissora, capaz de mitigar o dano neuronal e favorecer mecanismos de neuroreparo. Essa abordagem reforça a importância de alvos moleculares específicos na busca por novos tratamentos para o AVC isquêmico (Mehta e Raghbir, 2007).

Como hipótese, uma das estratégias para controlar o influxo de danos associados ao AVC é a inibição de transportadores sinápticos, como os de glicina (GlyTs), que regulam o conteúdo desse aminoácido na fenda sináptica. Esses transportadores desempenham um papel importante na modulação de receptores NMDA, ativados na presença de glicina e glutamato. Redução dos níveis da D-serina está associada à redução da atividade dos receptores NMDA. Já a inibição dos transportadores de glicina, especialmente o GlyT1, pode favorecer a ativação dos receptores NMDA por meio do aumento da disponibilidade de glicina, sem induzir excitotoxicidade. Além disso, a modulação da neurotransmissão glutamatérgica pode ser realizada não somente pela glicina, como também pela D-serina e possivelmente, pela prolina (Aragón e López-Corcuera, 2003; Billard, 2015; Sehatpour. et al., 2023).

3.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O acidente vascular cerebral é uma das principais causas de internações e mortalidade relacionadas a doenças neurológicas em todo o mundo. Em 2020, a *American Heart Association* estimou a prevalência da isquemia nos Estados Unidos em 2,5% o que corresponde a aproximadamente 7 milhões de americanos com mais de 20 anos que já sofreram um AVC (Feske, 2021). No Brasil, o cenário também é alarmante, com elevadas taxas de mortalidade. Dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde – DATASUS registraram 99.010 óbitos por AVC, incluindo infarto cerebral (necrose causada pela falta prolongada de oxigênio e nutrientes.), AVC isquêmico, AVC hemorrágico, hemorragia subaracnoidea e AVC não especificado como isquêmico ou hemorrágico (Brasil, 2024).

Dentre as diversas manifestações clínicas do AVC, o tipo isquêmico é o mais prevalente (Tuo et al., 2022). Esse evento ocorre devido à obstrução de um vaso sanguíneo, seja por trombose (formação de coágulos locais) ou pela presença de ateromas (depósitos de gordura na parede dos vasos), comprometendo o fluxo sanguíneo para áreas específicas do cérebro. Isso leva ao comprometimento de regiões cerebrais que deixam de receber oxigênio e nutrientes, resultando em danos celulares e, conseqüentemente, morte neuronal (Diamond, 2016).

Por sua vez, o AVC hemorrágico ocorre quando o sangramento intracerebral é ocasionado pelo rompimento de vasos sanguíneos, frequentemente devido à fragilidade vascular, como em aneurismas, ou por oscilações extremas da pressão arterial, especialmente em casos de hipertensão grave (Zubair e Sheth, 2023). A lesão causada pelo AVC hemorrágico pode ser dividida em lesão primária, decorrente do efeito de massa do hematoma inicial, e lesão secundária, que ocorre ao longo de dias a semanas, resultante da ativação de vias lesivas (Magid-Bernstein et al., 2022).

O AVC também pode ser classificado de acordo com a extensão e localização da oclusão vascular. As diferenças entre pequenos e grandes trombos no contexto do AVC isquêmico impacta diretamente a gravidade da lesão. Trombos pequenos tendem a ocluir vasos menores, gerando infartos mais limitados, e em alguns casos, transitórios, como os infartos lacunares. Já

os grandes trombos, que geralmente obstruem vasos de maior calibre, como a artéria cerebral média, estão associados a áreas extensas de necrose e ativação exacerbada da resposta imune local e periférica (Zera e Buckwalter, 2020).

As consequências do AVC vão além da alta mortalidade, frequentemente deixando sequelas motoras, cognitivas, sensoriais e autonômicas. Entre os comprometimentos estão incluídos paralisia, déficits sensoriais com alterações visuais e prejuízos na fala (Lemmerman et al., 2021). Além disso, as sequelas podem ultrapassar o âmbito físico, afetando também funções cognitivas e executivas, como a capacidade de compreender e expressar emoções faciais, o que impacta negativamente as interações sociais e relações interpessoais (Guo et al., 2021).

3.2 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL

O aporte sanguíneo, seja focal ou global, resulta na interrupção do suprimento de oxigênio e de nutrientes essenciais, como a glicose, para o sistema nervoso central (SNC), levando ao colapso energético característico da isquemia cerebral. Nesse contexto, as células na região afetada passam a recorrer a glicólise anaeróbica como fonte alternativa de energia. Contudo, a quantidade de adenosina trifosfato (ATP) gerada por esse processo é insuficiente para sustentar a viabilidade neuronal. A gravidade da lesão isquêmica é determinada pela duração e intensidade do evento isquêmico (Rios et al., 2023).

Quando o fornecimento de oxigênio e glicose é interrompido no cérebro, uma cascata de eventos leva a danos celulares e disfunção neuronal. Comprometendo todo metabolismo celular da área afetada, conseqüentemente a desregulação das bombas iônicas e ao dano oxidativo (Moskowitz; Lo e Iadecola, 2010).

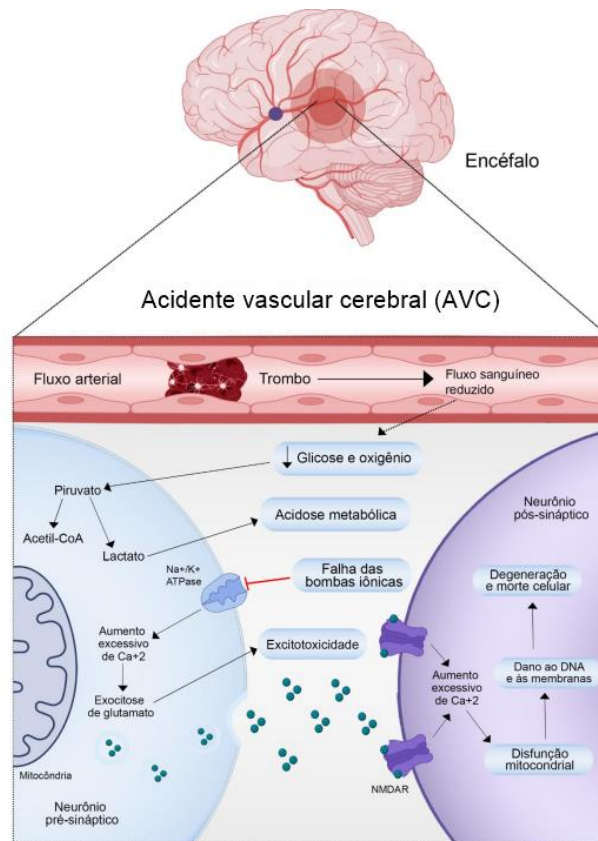


Fig. 1: Representação da fisiopatologia da Isquemia Cerebral. Adaptado Marques., 2022

A interrupção abrupta do fluxo sanguíneo no AVC isquêmico força o organismo a reorganizar seu metabolismo para preservar o fornecimento mínimo de energia, resultando em alterações graves no metabolismo celular. Nesse contexto, as células passam a depender da glicólise anaeróbica como fonte de energia, onde a glicose é convertida em adenosina trifosfato (ATP). No entanto, essa via metabólica é insuficiente para produzir a quantidade necessária de ATP para sustentar a função neuronal em condições instáveis. Essa deficiência energética promove um aumento significativo na acidose tecidual, que compromete a sinalização celular e desencadeia mecanismos de morte celular (Lo; Dalkara; Moskowitz, 2003).

Com esse intenso influxo de ATP, a função das bombas iônicas fica diretamente comprometida. Além de regular o equilíbrio osmótico e elétrico, a disfunção da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase) impacta em diversos mecanismos. Segundo Zhu e colaboradores (2022), a falha desta bomba leva ao acúmulo intracelular de sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}),

enquanto o potássio (K^+) é liberado para o meio extracelular, promovendo a excitotoxicidade e consequentemente dano oxidativo. Este desequilíbrio contribui para a disfunção neuronal, morte celular e inflamação exacerbada, sendo um fator crucial na progressão da lesão isquêmica (Malbouisson et al., 2005; Zhu et al., 2022). Embora os íons cálcio sejam fundamentais para o funcionamento normal dos neurônios, a presença exacerbada desse elemento ativa enzimas destrutivas, promove a disfunção mitocondrial e intensifica a formação de radicais livres, culminando em dano celular (Baey et al., 2022).

O desequilíbrio iônico favorece liberação exacerbada de neurotransmissores, um deles é o glutamato. O aumento excessivo de cálcio promove liberação excessiva de glutamato na fenda sináptica. Por conseguinte, a superestimulação de receptores pós-sinápticos, iniciando uma série de eventos danosos causados pela excitotoxicidade (Szydłowska e Tymianski., 2010; Hu e Song., 2017). Durante a neurotransmissão glutamatérgica, excesso de glutamato é liberado pelos terminais pré-sinápticos e se liga a receptores no neurônio pós-sináptico, como os receptores NMDA, AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) e cainato. Essa ativação desencadeia influxos de cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+), promovendo potenciais excitatórios pós-sinápticos (Marques et al., 2020).

3.3 NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E EXCITOTOXICIDADE

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do encéfalo, desempenhando um papel essencial em diversos processos fisiológicos envolvendo doenças. Além de sua função na neurotransmissão, o glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC (Sedlak et al., 2018) e pode ser utilizado no metabolismo celular, sendo importante no ciclo de Krebs (Jeong, 2021).

A neurotransmissão glutamatérgica está envolvida em doenças como Alzheimer e isquemia cerebral. Cavalcante e colaboradores (2025) investigaram os mecanismos de neuroproteção associados à inibição do transportador de glicina tipo 1 (GlyT1) em um modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) em camundongos C57BL/6. A neuroproteção promovida pelo NFPS, um inibidor de GlyT1, ocorre por meio da ativação dos receptores NMDA contendo a subunidade GluN2A, modulando vias intracelulares associadas à sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica, como a via CaMKIV/CREB, ao passo que reduz a ativação da subunidade GluN2B, frequentemente relacionada à morte celular por excitotoxicidade (Cavalcante et al., 2025).

A excitotoxicidade mediada pelo glutamato é um mecanismo fundamental que contribui para o dano neuronal após o AVC isquêmico. A quebra da homeostase iônica compromete a recaptação do glutamato, resultando em seu acúmulo extracelular e ativação excessiva dos receptores NMDA, desencadeando processos neurotóxicos (Shen et al., 2022). Estudos de Hardingham, Fukunaga e Bading (2002) demonstraram que os receptores NMDA sinápticos promovem a sobrevivência celular por meio da ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP Cíclico (CREB) e indução da expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Em contraste, a ativação dos receptores NMDA extra-sinápticos leva à inibição do CREB e à supressão da expressão do BDNF, promovendo vias de morte celular (Hardingham, Fukunaga e Bading, 2002).

Os mecanismos também envolvem a ativação dos receptores AMPA, NMDA e cainato, que desempenham papéis relevantes da fisiopatologia do AVC (Wang, Xie e Xing, 2022; Pinto 2014). Evidências sugerem que, no contexto isquêmico, os receptores AMPA aumentam a expressão de canais iônicos, elevando a permeabilidade à entrada de cálcio e sódio, o que contribui para o agravamento do dano neuronal. (Yelshanskaya, Mesbahu-Vasey e Kumikova, 2017).

Os receptores NMDA, especificamente, promovem a sobrecarga de íons cálcio no meio intracelular. Esse aumento de cálcio ativa a proteína quinase C (PKC) e a cálcio-calmodulina, desencadeando cascatas de sinalização deletérias. Entre os processos resultantes destaca-se a ativação de NADPH oxidase, que contribui para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), exacerbando os danos neurotóxicos (Engin e Engin, 2021).

Alterações no metabolismo energético estão intimamente relacionadas a disfunções neurológicas. Evidências indicam que a prolina pode interferir na homeostase bioenergética cerebral ao comprometer a atividade mitocondrial e amplificar danos induzidos por excitotoxicidade, o que afeta diretamente a neurotransmissão glutamatérgica e contribui para a disfunção sináptica observada em diversos distúrbios do SNC (Ferreira et al., 2010; Arrieta-Cruz et al., 2013).

3.4 CARACTERÍSTICAS DO NEURORREPARO

O processo de neurorreparação ocorre por remodelação axonal, neurogênese, angiogênese e remielinização (Schmidt e Minnerup, 2016). Após um AVC isquêmico, as células fagocíticas residentes no encéfalo diferenciam-se para uma morfologia pró-inflamatória, migrando para a área de lesão a fim de responder rapidamente as mudanças no ambiente. Algumas vias podem levar a melhora do processo cerebral, a inibição do processo de inflamação e apoptose ou a estimulação da angiogênese, proliferação e diferenciação de células troncos neurais (Wang, Leak e Kao, 2022).

A área afetada pós dano de AVC isquêmico é chamada de zona de penumbra (Hou e Brenner, 2024). Próximo a essa área, acontece a formação de novos vasos por meio de um processo angiogênico, isso faz com que as células realizem o processo de migração e diferenciação neuronal dos neuroblastos através do BDNF e fator de crescimento endotelial vascular, incluindo também, metaloproteinases que atuam como fatores atrativos para os neuroblastos (Marques et al., 2019).

A neurogênese, processo fundamental no contexto de neurorreparação, apresenta limitações biológicas importantes, especialmente no cérebro adulto. Após um AVC, embora ocorra um aumento transitório na proliferação de neuroblastos, a regeneração tecidual permanece insuficiente. A cavidade formada no tecido cerebral lesado tende a ser preenchida por fluído cerebrospinal e pela formação da cicatriz glial, fatores que dificultam a migração celular e a integração de novas células do tecido neural (Michor et al., 2024).

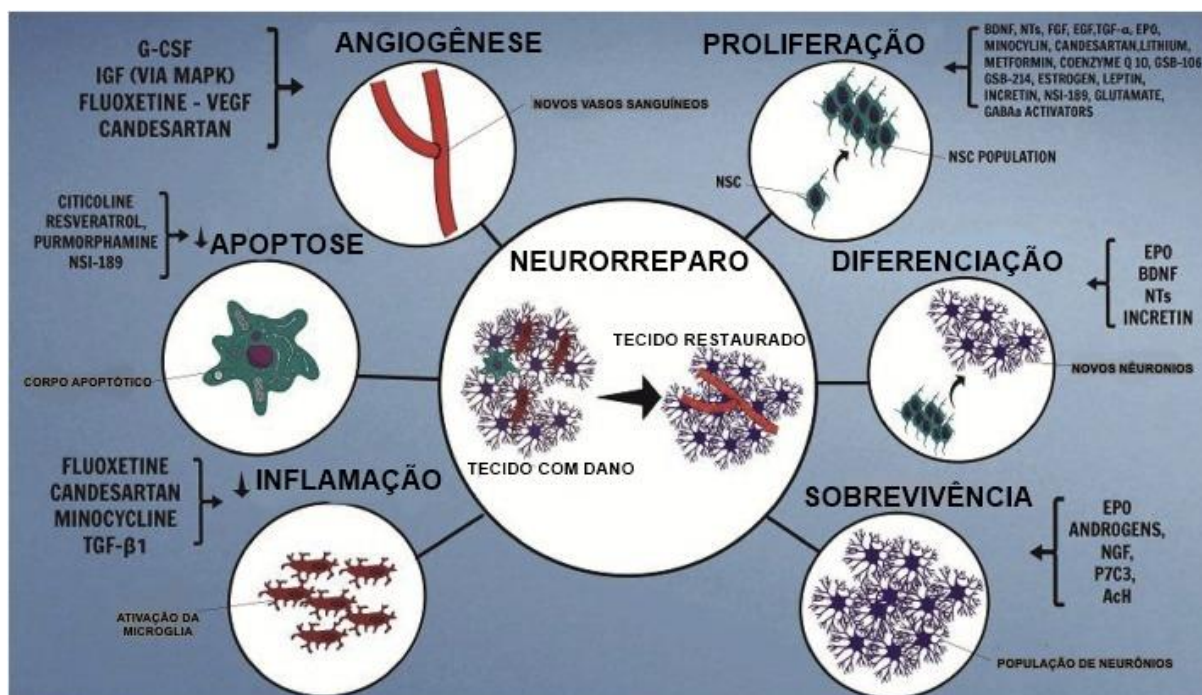


Fig. 2: Ilustração dos principais processos envolvidos no neurorreparo cerebral, destacando suas vias celulares. Fonte: Traduzido de Marques et al., 2019.

O neurorreparo é amplamente utilizado como alternativa em análises de trabalhos com modelos de isquemia, sendo esse conceito explorado no estudo de Yuan e colaboradores (2023), que investigaram como a expansão de células T reguladoras pode promover a reparação da substância branca cerebral após um acidente vascular cerebral isquêmico em um modelo de oclusão transitória da artéria cerebral média (tMCAO) em camundongos C57BL/6J. Os autores demonstraram que tanto a transferência adotiva de células T reguladoras quanto a indução endógena por complexos IL-2/IL-2Ab resultaram em aumento da integridade da substância branca, redução da morte de oligodendrócitos e células precursoras. Esses achados reforçam o potencial terapêutico da modulação imune no reparo tardio da substância branca e na recuperação funcional pós-AVC (Yuan et al., 2023).

Funções de remielinização e restauração da substância branca promovida por mecanismos celulares e moleculares para promoção do neurorreparo foram observadas por Li e colegas (2025), que investigaram o efeito terapêutico de células endoteliais vasculares derivadas de ratos jovens em ratos idosos submetidos à oclusão da artéria cerebral média. Foi notado que a administração de células endoteliais vasculares em ratos idosos promoveu uma

melhora na função neurológica, redução do volume de infarto e apoptose neuronal além, de aumento na densidade microvascular e nos níveis de fatores de crescimento neural (Li et al., 2025).

3.5 PROLINA E TRANSPORTADORES DE PROLINA

O transporte de L-prolina no cérebro ocorre através de transportadores específicos, incluindo o PROT (SLC6A7), que apresenta alta afinidade pela L-prolina e é predominantemente expresso em terminais glutamatérgicos. Em vias glutamatérgicas específicas, a L-prolina é transportada de maneira dependente de Na⁺ por transportadores de alta afinidade. Estudos realizados em cérebros de ratos localizaram esses transportadores em sinaptossomas do hipocampo, identificando múltiplos sítios de ligação com diferentes afinidades, incluindo faixas nanomolar ($6,27 \pm 2,66\text{nM}$) e micromolar ($1,62 \pm 0,123 \mu\text{M}$) (Ortiz, Negrón e Bruno 1989).

Em experimentos com células HeLa expressando o transportador clonado, a L-prolina demonstrou alta afinidade para transporte dependente de Na⁺, com um Km de 9,7 μM . A farmacologia distinta desses transportadores é compatível com os sistemas glutamatérgicos no cérebro de ratos, sugerindo um papel da L-prolina como neuromodulador em vias glutamatérgicas específicas (Fremeau, Caron e Blakely, 1992).

Acredita-se que o transportador de L-prolina PROT (SLC6A7) controle a distribuição espacial e temporal da L-prolina nas sinapses glutamatérgicas por meio da rápida captação deste aminoácido nos terminais pré-sinápticos (Schulz et al., 2018). Atualmente, não há descrição de receptor específico para prolina; no entanto, diversos transportadores são expressos no tecido cerebral, como PROT (SLC6A7), B0AT2 (SLC6A15), NTT4 (SLC6A17) e IMINO (SLC6A20). O transportador de prolina de alta afinidade PROT é particularmente regulado em substratos no encéfalo, sugerindo uma função relevante na modulação da neurotransmissão glutamatérgica (Carvalho. 2020).

A PROT também tem como função uma regulação dependente de Ca²⁺ e de suas proteínas dependentes como as proteínas quinases dependentes de Ca²⁺. Assim, foi apresentado por Jayanthi e colaboradores (2000). Esse estudo também demonstrou que o Ca²⁺ tem a função de ativador agudo de PROT, o que demonstra que provavelmente não esteja apenas responsável

pela liberação de neurotransmissores, mas também da rápida remoção da fenda sináptica (Jayanthi et al., 2000).

O Human Protein Atlas, relata que o PROT é identificado de forma ampla em neurônios, sua função, no entanto é mista e sua especificidade aumentada para tecidos cerebrais. A especificidade no cérebro humano e de camundongos é baixa, com *scores* de Tau de 0,32 em humanos e 0,25 em camundongos. A distribuição é ampla, sendo detectada em todas as regiões cerebrais de ambas as espécies (Ponten et al., 2008; Sjostedt et al., 2020).

Figura 3: Distribuição Neuroanatômica do SLC6A7 nos cérebros humanos e de camundongos.

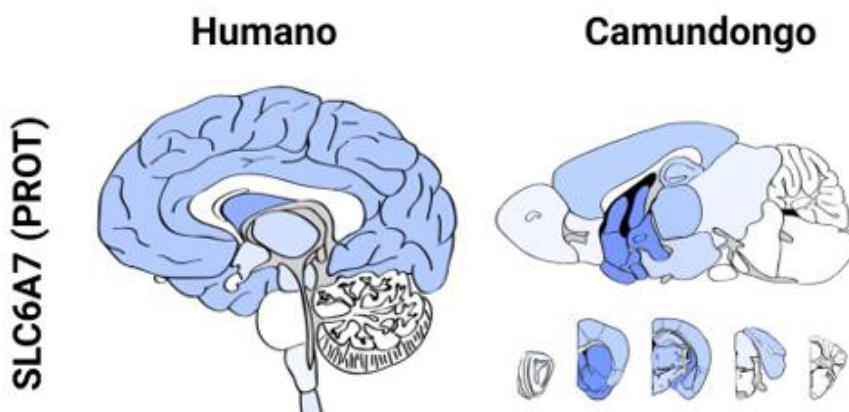


Fig. 3. Distribuição da proteína da família de transportadores de solutos, SLC6A7, nos cérebros de humanos (esquerda) e camundongos (direita). Fonte: Carvalho 2024.

Além de seu papel no SNC, a L-prolina também pode desempenhar outras funções no organismo. Estudos demonstram que a L-prolina é capaz de aumentar a expressão de genes como *Fasn*, *Sed1* e *Srebf1* em hepatócitos cultivados de fígados de camundongos sob condições pós-prandiais simuladas por insulina e agonistas de receptores *Liver-X* (LXR). Entre os 20 aminoácidos testados, a prolina foi o único que potencializou a expressão desses genes de forma independente de suas vias metabólicas tradicionais (Taniguchi et al., 2025).

3.6 INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES DE PROLINA

Nesse contexto, inibidores do transportador de prolina (SLC6A7) têm sido investigados como uma abordagem terapêutica para modular os níveis de L-prolina na fenda sináptica e potencialmente reduzir a excitotoxicidade. O composto LQFM215, um potente inibidor do PROT, foi avaliado em modelo murino de oclusão permanente da artéria cerebral média (MCAO), utilizando doses de 2,5; 5,0 e 10,0 mg/kg. O tratamento com LQFM215 por 5 dias, tanto como pré-tratamento quanto pós-tratamento, promoveu redução significativa da área de infarto cerebral e melhorou o desempenho motor nos testes de *limb clasping* e cilindro, indicando efeitos neuroprotetores e de neuroreparo (Carvalho et al., 2023).

A inibição de prolina, também da LQFM215, foi testada em outros modelos, como Carvalho e colaboradores (2024) demonstraram no modelo de esquizofrenia induzida por cetamina. Neste trabalho, utilizando doses de 10, 20 e 30 mg/kg por via intraperitoneal, observou-se que o LQFM215 reduziu a hiperlocação, aumentou a interação social e melhorou os índices de inibição do reflexo de sobressalto (PPI), efeitos associados à melhora dos sinais clínicos positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia. Esses resultados reforçam a importância da inibição seletiva do transportador de prolina (PROT/SLC6A7) como alvo farmacológico promissor, não apenas pela sua modulação da neurotransmissão glutamatérgica, mas também por seus efeitos comportamentais significativos em modelos de distúrbios neuropsiquiátricos (Carvalho et al., 2024).

Estudos sobre inibidores dos transportadores de prolina indicam que o PROT é altamente específico para a L-prolina. Pesquisas de Rhoads, Peterson e Raghupathy (1983) observaram que certos peptídeos opioides inibem a captação da L-prolina em sinaptossomas de ratos, destacando a especificidade deste transportador (Rhoads, Peterson e Raghupathy, 1983).

A L-prolina demonstrou efeitos significativos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Estudos revelaram que a administração aguda de L-prolina em ratos aumenta significativamente a quimioluminescência (78%), indicando maior produção de espécies reativas de oxigênio, enquanto reduz o potencial antioxidante total (TRAP) em 30%. Em experimentos *in vitro*, a prolina reduziu a atividade da superóxido dismutase (SOD) em concentrações elevadas (0,5-1,0 mM), sem alterar as atividades da catalase (CAT) e da glutatona peroxidase (GSH-Px). Esses achados sugerem que a prolina induz estresse oxidativo cerebral, possivelmente

relacionado ao comprometimento neurológico observado em pacientes com hiperprolinemia (Delwing et al., 2023).

Em pacientes com distúrbios de hiperprolinemia, especificamente a do tipo II, causada por mutações no gene ALDH4A1, o estresse oxidativo pode ser um fator determinante para o desenvolvimento de doenças neurológicas, incluindo epilepsia associada a distúrbios metabólicos e seu manejo, destacando a importância desse mecanismo na patogênese da doença (Latzer et al., 2023).

A inibição do transportador de L-prolina (PROT/SLC6A7) pode reduzir a excitotoxicidade e o estresse oxidativo associados ao AVC isquêmico, uma vez que o excesso de prolina favorece a produção de ROS e disfunção mitocondrial. De forma semelhante, Guo et al. (2023) demonstraram que o Lyoniresinol atenua o dano cerebral isquêmico ao ativar as vias PI3K/Akt/GSK-3 β /Nrf2, reduzindo apoptose e aumentando enzimas antioxidantes. Assim, a modulação dos níveis de prolina pode envolver mecanismos neuroprotetores convergentes aos observados com o Lyoniresinol (Guo et al., 2023).

A inibição do transportador de glicina tipo 1 (GlyT1) por sua vez, pode modular danos excitotóxicos, influenciando o metabolismo e a biossíntese da heme. Winter e colaboradores (2016) investigaram os efeitos da inibição do GlyT1 na eritropoiese e na homeostase do ferro em ratos, observando que a inibição do GlyT1 reduziu a síntese de heme, resultando em uma diminuição de 20% nos níveis de hemoglobina. O ferro liberado pela disfunção mitocondrial pode contribuir para a geração de EROs, enquanto a resposta compensatória na eritropoiese e a regulação da hepcidina podem influenciar a disponibilidade sistêmica de ferro e as interações com mecanismos redox (Winter et al., 2016).

Em suma, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a investigar o potencial da inibição do transportador de prolina como um alvo farmacológico promissor, buscando compreender de forma aprofundada os papéis e os mecanismos da L-prolina em diferentes alvos moleculares envolvidos na fisiopatologia de doenças neurológicas. No presente estudo, propomos que a modulação dos níveis de L-prolina possa contribuir com ações mecanísticas no contexto isquêmico, configurando-se como uma estratégia potencial de neuroreparo em condições de dano cerebral, como o acidente vascular cerebral isquêmico.

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial neuroreparador do protótipo LQFM164 no modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) em camundongos C57BL/6.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar *in silico* o perfil farmacocinético do protótipo LQFM164.
- ✓ Analisar *in silico* o perfil farmacodinâmico do protótipo LQFM164.
- ✓ Compreender os aspectos da estabilidade do complexo PROT-LQFM164
- ✓ Realizar a caracterização comportamental do protótipo LQFM164 em camundongos C57BL/6.
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com o LQFM164 na melhora do déficit motor em animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral de MCAO.
- ✓ Analisar o efeito do tratamento com o LQFM164 na redução da área isquêmica cerebral em animais submetidos ao modelo de MCAO.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1. Análises de Quimiinformática

Para análise da interação do protótipo LQFM164 com o transportador PROT/SLC6a7, foi utilizado o servidor SwissModel, no qual a sequência de aminoácidos foi anexada, gerando o modelo estrutural da molécula (Waterhouse et al., 2024). Após a obtenção da estrutura, o software PrankWeb foi empregado para identificar o sítio alvo da proteína (Jakubec et al., 2022). Em seguida o software Maestro foi aplicado na preparação da proteína, ajustando as torsões, configurando o grau de protonação para o pH de 7,4 e removendo moléculas de água, com o objetivo de aprimorar a análise de *docking molecular* (Sankar et al., 2022). Por fim, o *docking molecular* foi realizado no servidor DockThor para obter o score de ligação (Guedes et al., 2024). Os detalhes resumidos encontram-se na figura 4.

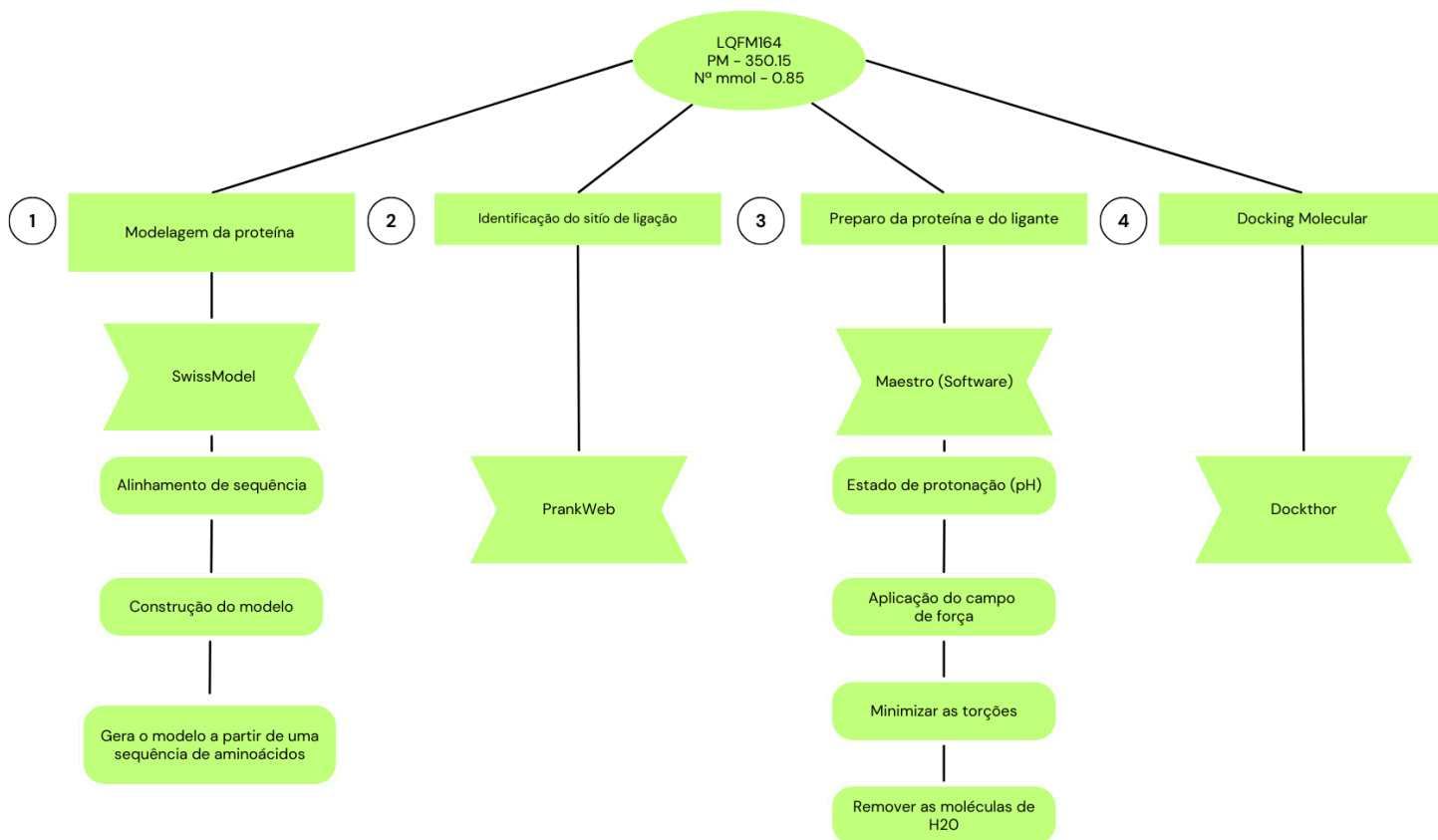


Fig. 4 – Imagem ilustrativa dos processos de quimioinformática de *Docking Molecular*. Fonte: Autoria própria.

5.1.2. Predição de parâmetros Farmacocinéticos

Para avaliar a cinética e o potencial de permeabilidade através da BHE do protótipo LQFM164, utilizou-se o servidor SwissADME (Daiana; Michelin; Zoete, 2017). Inicialmente, foi selecionada a representação SMILES do protótipo em estudo, assim como a do composto controle LX6171 (Barbosa, 2006), a fim de possibilitar uma análise comparativa. Em seguida, ambos os compostos foram submetidos aos cálculos da plataforma para determinar sua biodisponibilidade e demais propriedades farmacocinéticas, gerando o “*egg plot*” correspondente.

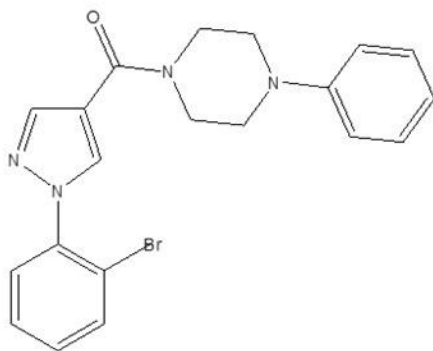
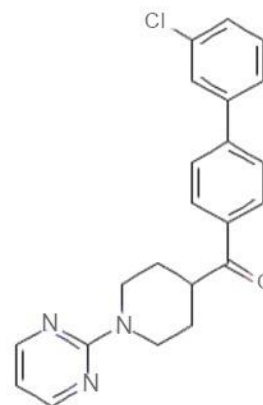
A) LQFM164**B) LX6171**

Fig. 5 – Representação estrutural das moléculas avaliadas quanto a parâmetros farmacocinéticos na plataforma SwissADME. (A) Molécula LQFM164, desenvolvida para estudos pré-clínicos de neuroproteção e neurorreparo, e (B) LX6171, fármaco comercial reconhecido como inibidor de prolina com potencial aplicação em distúrbios neurológicos. Adaptada – PUBChem (Kim et al., 2025).

5.1.3 Predição de ligação pela técnica de Dinâmica Molecular

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas usando o Gromacs (*Groningen Machine for Chemical Simulations*) 2024.1 com a interface *Visual Dynamics* para gerar scripts (Abraham et al., 2015; Vieira et al., 2023). O campo de força selecionado foi o AMBER99 (Wang et al., 2004). Cada sistema foi simulado sob condições de contorno periódicas em uma caixa cúbica, cujas dimensões foram definidas automaticamente, considerando 5Å dos átomos de proteína mais externos em todas as direções cartesianas. A caixa de simulação foi preenchida com moléculas de água TIP3P (Jorgensen et al., 1983). Em seguida, as velocidades atômicas iniciais foram atribuídas usando a distribuição de Maxwell-Boltzmann (distribuição da velocidade das partículas no ar) correspondente a uma temperatura de 300 K. Por fim, simulamos a execução do protótipo LQFM164 com o complexo (PROT) assim como também a LX6171 que atuou como controle. A faixa utilizada foi a de 05 ns.

As trajetórias de simulação foram analisadas com as ferramentas do pacote GROMACS, O *Root Mean Square deviation* - Flutuação quadrática média (RMSD) e a *Root Mean Square Fluctuation* – Flutuação por resíduo (RMSF) foram calculados separadamente para cada sistema, ajustando seus átomos pesados, tomando como referência a estrutura inicial da dinâmica de produção. As *Solvent Accessible Surface Area* - Áreas de superfície acessíveis a solventes (SASA) também foram calculadas. Todos os gráficos foram criados com o GraphPad Prism 9.0.2.

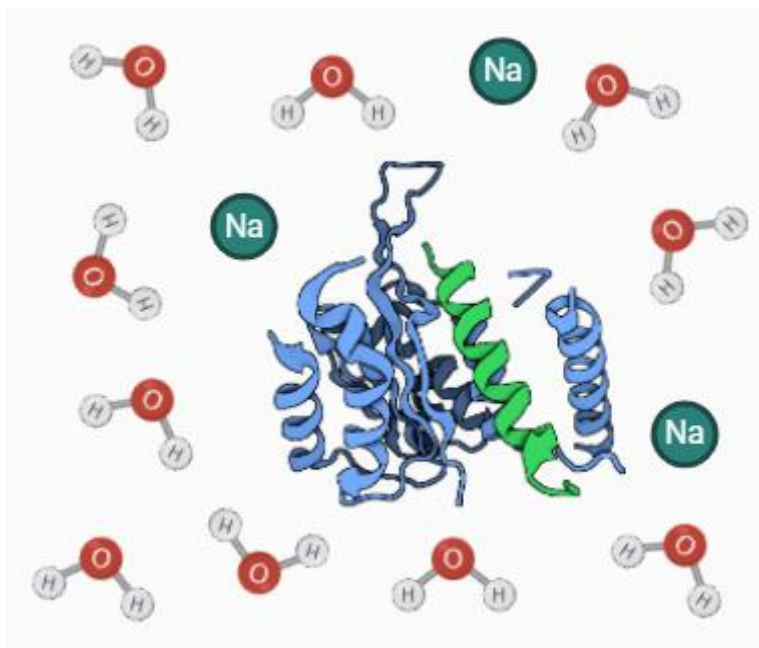


Fig. 6: Imagem ilustrativa do processo de dinâmica molecular. Fonte: Biorender

5.2. Reagentes e equipamentos

O protótipo utilizado neste projeto foi o LQFM164, sintetizado pelo Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF/UFG). O protótipo foi diluído em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e administrado por via intraperitoneal (IP) no volume de 10 mL/kg.

Entre as substâncias e reagentes utilizados, destacam-se o próprio LQFM164, com massa molar de 350,15 g/mol e número de mols igual a 0,85, fornecido em forma de pó para solução. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Sigma Aldrich, EUA. Além disso, foram

utilizados solução salina, cloreto de 5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC) a 2% da Sigma (T8877), solução tampão PBS 1x, xilazina (Anasedan®) e cetamina (Dopalen®).

Os procedimentos experimentais contaram com diversos equipamentos e utensílios, incluindo microscópio ótico, fórceps, bisturi elétrico (Cautermax®), pinças comuns e hemostáticas, linhas de sutura nylon 6-0, seringas de 1,0 mL/CC e um aparelho vórtex para homogeneização das soluções.

5.3. Animais Experimentais

Os animais utilizados para todos os procedimentos citados nesse trabalho, foram adquiridos do biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG (IPTSP/UFG) no Centro Multiusuário de Produção e Experimentação Animal (CMPEA/IPTSP/UFG). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia e Neuroquímica – NeuroLab, ICB II. Para avaliação do efeito neuroreparador em modelo de isquemia cerebral, foram utilizados camundongos C57BL/6, com peso entre 20 a 30 gramas e com idade de 10 a 12 semanas. Conforme as normas estabelecidas, os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas com livre acesso a ração e água. O projeto recebeu o parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA (PROTOCOLO Nº. 059/24).

5.3.1. Padronização Experimental

Para avaliação da ação do protótipo LQFM164, foi realizada uma padronização experimental com o objetivo de definir as doses e estabelecer parâmetros consistentes. As doses selecionadas para o início do tratamento foram de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5 mg/kg, os experimentos foram conduzidos por uma rotina de tratamento de cinco dias.

5.4. Testes comportamentais

5.4.1. Teste de campo aberto

Para avaliação da mobilidade espontânea e parâmetros como comportamento do tipo ansioso, foi realizado o teste de campo aberto conforme estabelecido descrito (Murtishaw et al., 2018). O campo aberto consiste em um aparato cúbico com proporções de (45 x 45 x 45 cm), com paredes e piso acrílico cinza com uma luz branca distribuída por todo aparato (FIG 7). Cada animal foi colocado em um mesmo ponto, e deixado livremente para explorar durante 10 minutos enquanto era gravado. O aparato sempre era limpo entre a troca de animais com álcool 70% e para obtenção dos resultados e imagens foi utilizado o software Any-Maze 7.16.

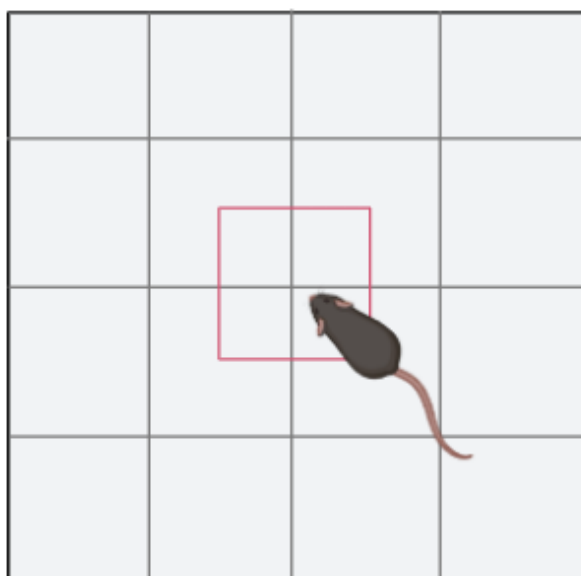
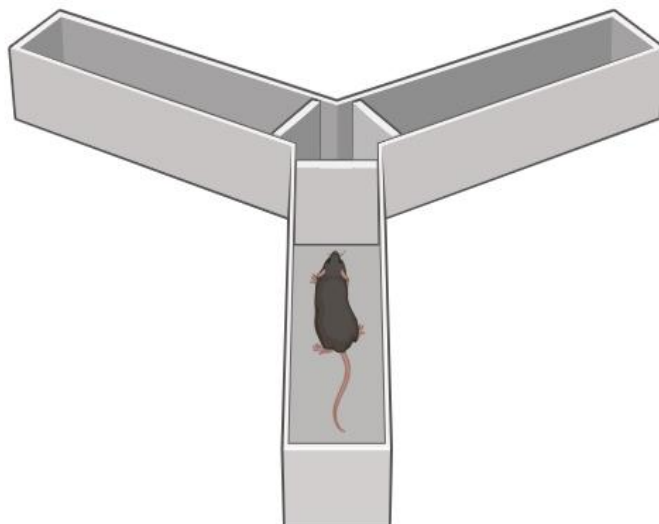


Fig. 7 – Imagem ilustrativa de um camundongo passando pelo teste de campo aberto. Fonte: Biorender

5.4.2. Teste do labirinto em Y

Para avaliação de memória a curto prazo, alternância espontânea e memória de trabalho (labirinto) e é conduzido pela curiosidade inata dos roedores em explorar áreas anteriormente não visitadas) o labirinto em Y pode ser empregado adaptado ao descrito por (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2018). Neste teste, os camundongos são colocados no centro do aparato afim de explorar livremente os três braços durante oito minutos. Para a obtenção de resultados, se utiliza a (%) de alternâncias corretas, em suma, quantas vezes o camundongo percorreu os três braços

sem repetições (Ex: A, B e C). Os animais foram filmados e o número total de entradas nos braços e o índice de alternância foram quantificados. O índice de alternância foi calculado pela



fórmula: $(\text{Número de alternâncias corretas}) / (\text{Número de entradas nos braços} - 2) \times 100\%$ (FIG 8).

Fig. 8 – Imagem ilustrativa de um camundongo passando pelo teste do labirinto em Y. Fonte: Biorender

5.5. Desenho Experimental

O protocolo de indução do modelo de isquemia cerebral focal induzido pela oclusão da artéria cerebral média (MCAO) em contraste com o tratamento está indicado na (FIG 9). Em resumo, um dia após a realização do método cirúrgico, é iniciado um regime de tratamento via intraperitoneal (IP) de cinco dias, vinte e quatro horas após ser aplicada a última dose os ensaios comportamentais são realizados e o cérebro é coletado.

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: Sham (submetido apenas à incisão cirúrgica, sem oclusão da artéria cerebral média e tratado com DMSO a 10%), Controle (submetido ao modelo de MCAO e tratado com DMSO a 10%), e três grupos tratados com LQFM164 nas doses de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5 mg/kg. O experimento não foi conduzido de forma cega, uma vez que o pesquisador tinha conhecimento prévio da distribuição dos grupos. Ressalta-se que, no grupo Sham, não houve obstrução da

carótida, sendo realizada apenas a incisão cirúrgica, enquanto no grupo controle e grupos tratados, a oclusão da carótida foi efetivamente realizada.



Fig. 9 – Diagrama esquemático do delineamento experimental. Iniciando no dia 0 onde o procedimento de indução do modelo foi realizado, o dia seguinte é marcado pelo início do tratamento e suas respectivas doses (1,25mg/kg, 2,5mg/kg e 5mg/kg via IP) efetuado por cinco dias. No sexto dia é realizado a coleta do material.

5.6 Modelo de oclusão da artéria cerebral média – MCAO

A escolha do modelo de MCAO é apropriada para mimetizar a isquemia cerebral em murinos. Suas vantagens incluem alta reprodutibilidade anatômica, oclusões de grandes vasos semelhantes às observadas em humanos, além de afetar áreas relevantes como córtex e corpo estriado, áreas comumente afetadas no AVC humano. Entretanto, vale ressaltar que também possui desvantagens como a alta variabilidade entre animais já que é dependente da anatomia do Círculo de Willis (CoW), especialmente em camundongos C57BL/6, onde há variações significativas das artérias comunicantes posteriores; Alta mortalidade; Não permite estudos de trombólise diretamente e riscos de complicações técnicas já que o uso incorreto de filamentos pode causar hemorragia subaracnoide ou oclusão incompleta. Além de que o modelo utilizado pelo grupo envolve craniotomia o que induz repostas inflamatória (Trotman-Lucas, Gibson. 2021).

O modelo utilizado para induzir a isquemia foi estabelecido previamente (Wayman., et al 2016). Os camundongos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, com o auxílio do bisturi foi realizado uma incisão cutânea de 2cm na linha média ventral do pescoço. Para obter o acesso a artéria carótida comum (ACC), as glândulas salivares foram afastadas com o auxílio de um fórceps, assim sendo possível manipular a ACC e o nervo vago. A ACC foi então dissecada do nervo vago e ocluída com sutura de seda não absorvível. A incisão no pescoço foi suturada com nylon 6-0. Após a oclusão,

os camundongos foram alocados na mesa cirúrgica para expor o hemisfério contralateral. Uma incisão de 1cm entre o seio retro orbital e o canal auditivo externo foi feita de forma a visualizar o músculo temporal. Então, foi dissecado o músculo temporal para visualização do crânio e da artéria cerebral média para a realização da craniotomia na região exposta com o auxílio de uma broca odontológica de perfuração com revestimento de 1,6 mm e aproximadamente 8.000 rpm. Assim, foi feita uma incisão e parte do osso foi removida com o auxílio de uma pinça fina. Por fim, com cauterizador 3W de voltagem (Cautermax®) a ACM é ocluída permanentemente. Seguindo o protocolo, os camundongos se recuperaram em um substrato novo para diminuir o risco de infecções e em uma temperatura de 25° a 27° °C.

5.7. Avaliação Morfológica

Para a análise morfológica da dimensão da área isquêmica o cérebro dos camundongos foram removidos e seccionados de forma consecutiva em lâminas de 2 mm de espessura, totalizando quatro secções. Após esta etapa, as lâminas foram banhadas em solução de coloração utilizando 2% de cloreto de 5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC, Sigma, T8877) (Joshi; Jain; Murthy, 2004).

No tecido isquemiado, as mitocôndrias perdem sua funcionalidade devido ao estresse oxidativo e a falta de energia celular, sendo assim, não sendo capazes de reduzir o TTC a formazan. Assim o tecido isquêmico permanece esbranquiçado. As amostras foram separadas por seus respectivos grupos, assim as fatias foram deixadas submersas na solução de TTC por um período de trinta minutos. A zona de penumbra permanece na cor branca onde é possível visualizar o dano. A quantificação foi realizada pelo software ImageJ de forma manual pelo pesquisador, onde foram delimitadas as regiões pela área pálida (área esbranquiçada) e delimitações anatómicas do córtex. O cálculo utilizado para considerar o percentual da área de infarto (%AI) é (área pálida isquêmica + área restante do córtex direito/ área total do córtex esquerdo) x 100.

5.8. Avaliações Motoras

5.8.1 Teste do Cilindro

O teste do cilindro busca avaliar os parâmetros de assimetria das patas e coordenação motora em modelos de camundongos com AVC conforme descrito (Schallert et al., 2000). Foi avaliado o dano contralateral, já que em modelos murinos a região afetada – como o córtex – age em contrapartida a região isquêmica. O teste usa as formas cilíndricas, para incentivar a exploração das paredes. O cilindro transparente tem as dimensões de 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura e os modelos são induzidos a permanecer no local por 5 min. Em suma, se espera a diminuição na utilização das patas contralaterais ao hemisfério cerebral que sofreu a isquemia. Portanto este comportamento irá avaliar o uso motor do membro torácico dos animais, esperando-se uma preferência pelo membro ipsilateral, o que demonstraria um déficit motor, observável em decorrência do dano neuronal.



Fig. 10 – Imagem ilustrativa de um camundongo passando pelo teste do cilindro. Fonte: Biorender

5.8.2. Teste de Limb Claspig

O teste de *Limb Claspig* é um teste de comportamento motor utilizado em modelos de AVC. Conforme descrito na literatura (Mied et al., 2017), a suspensão pela cauda induz uma

resposta de escape (Figura 11). Esta resposta reflete diretamente um comportamento instintivo, ocasionando movimentação dos membros torácicos e pélvicos, sendo essa movimentação utilizada como parâmetro para a avaliação da capacidade motora do modelo. Os animais são suspensos pela cauda por dez segundos e seus membros são gravados para as análises de *score*. Portanto, o *score* é avaliado com base nos seguintes critérios: 1 – Sem aperto de membro, extensão de fuga normal; 2 – Ambos os membros pélvicos exibem movimentos incompletos e perda de mobilidade, os dedos apresentam movimentos normais; 3 – Ambos os membros pélvicos exibem aperto com dedos enrolados e imobilidade; 4 – Membros torácicos e pélvicos exibem aperto e estão cruzados, com dedos enrolados e imobilidade.



Fig. 11 – Imagem ilustrativa de um camundongo passando pelo teste de *Limb Clasp*. Fonte: Biorender

5.9. Análise Estatística

Os dados paramétricos do estudo foram analisados pela análise de variância One-way (ANOVA), seguido por teste de Dunnett. Se considerou como padrão estatisticamente significativo os valores de P menor que 0,05. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Krushal-Wallis, também considerando o valor de P menor que 0,05 como indicativos de significância estatística. Os dados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e foram processados utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

6.1. LQFM164 potencialmente se liga à PROT/SLC6A7

Inicialmente, realizamos técnica de quimioinformática para estudar a potencial interação entre LQFM164 com a proteína PROT/SLC6A7. Nas técnicas *in silico* executadas, o protótipo LQFM164 demonstrou ligações no sítio ativo do transportador PROT, destacando interações específicas como ligação de hidrogênio com ARG-66, além de contatos hidrofóbicos com os resíduos SER-459, ALA-458, VAL-451 e PRO-364.

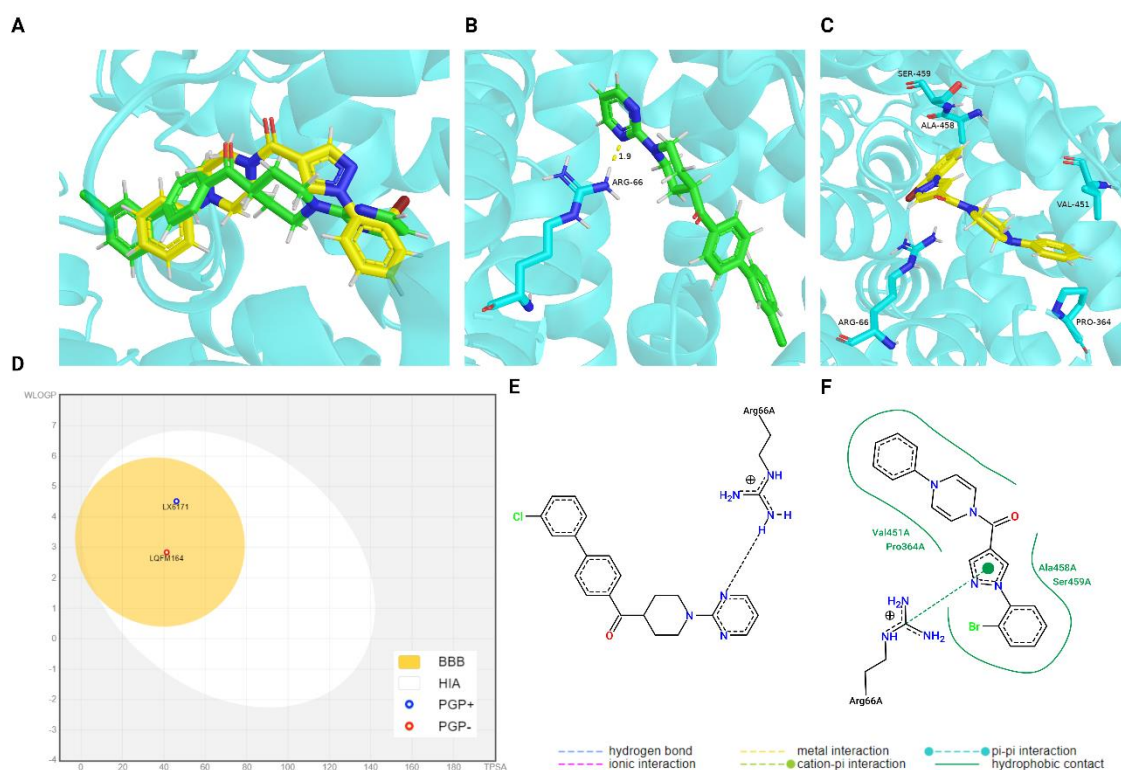


Fig. 12 – Representação gráfica das interações dos compostos LQFM164 e LX6171 com o transportador PROT. (A) Diagrama 3D mostrando a interação entre LQFM164 (em amarelo) e LX6171 (em verde), ambos ocupando o mesmo sítio de ligação no transportador PROT. (B) Esquema 3D da interação do LQFM164 com o PROT, destacando as interações específicas, como a ligação de hidrogênio com o resíduo ARG-66. (C) Esquema 3D da interação do LX6171 com o PROT, indicando interações com os resíduos ALA-458, SER-459, VAL-451, ARG-66 e PRO-364. (D) Diagrama tipo Eggplot, mostrando a permeabilidade dos compostos. Ambos os compostos estão na região amarela, indicando que eles possuem potencial para atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). (E e F) Representação bidimensional das interações químicas entre os compostos e o transportador.

Para as análises de *docking molecular*, foi utilizado o servidor DockThor. A interação proteína-ligante foi estabelecida pelo PROT com o protótipo LQFM164. Os dados do LX6171 foram obtidos no PubChem (15950717). O LX6171 já é um inibidor de L-prolina catalogado. Com auxílio do software Maestro a proteína foi preparada, o campo de força OPLS4 e com grau de protonação de 7,4, as moléculas de água foram retiradas afim de otimizar o *docking*. O *docking* foi gerado no servidor Docktor que recebeu a abordagem flexível, com coordenadas de X: 4,0892, Y: 4,8023 e Z: -3,0064 nos sítios de ligação e com Caixa Armstrong 20x20x20.

As análises de interações moleculares e propriedades de penetração da barreira hematoencefálica (BHE) das moléculas LQFM164 e LX6171 com o receptor (PROT). Nas imagens (A, B e C), podem ser observadas quanto ao encaixe das moléculas LQFM164 (amarelo) e LX6171 (verde) na proteína (azul), destacando as principais interações de ligação. Em (A), uma visão geral das duas moléculas no sítio de ligação. Em (B), LX6171 interage com ARG-66 através de uma ligação iônica, com distância de 1.9 Å. Em (C), a molécula LQFM164 forma diversas interações com o receptor, incluindo interações com os resíduos SER-459, ALA-458, VAL-451, e PRO-364.

No gráfico D (*eggplot*), é evidenciado que tanto a LQFM164 quanto a LX6171 apresentam potencial para atravessar a barreira hematoencefálica, demonstrando perfil favorável para ação no SNC. As moléculas encontram-se dentro da área amarela, indicando permeabilidade. Nas imagens E e F, as interações químicas detalhadas entre os compostos e o receptor são apresentadas. Em E, as interações de LX6171 com ARG66A são destacadas: uma ligação iônica entre o grupo amina e ARG66A, caracterizando a força eletrostática envolvida. Em F, observa-se as interações de LQFM164, incluindo ligações hidrofóbicas e de contato com VAL451A, PRO364A, e SER459A.

Os resultados demonstraram que o protótipo interage com o PROT de maneira semelhante ao controle, com *scores* de ligação de -7,707 kcal/mol para o LQFM164 e -8,063 kcal/mol para o LX6171 demonstrando resultados semelhantes (Tab. 01). Como demonstrado na imagem na figura (A) a sobreposição tridimensional do LQFM164 sob o controle LX6171 indicam similaridade de ligação. As principais ligações encontradas foram as interações onde se formaram uma ligação de hidrogênio com o resíduo ARG-66 (Figura B), com uma distância de 1,9 Å, garantindo boa estabilidade. Além disso, apresentou interações hidrofóbicas com os

resíduos ALA-458, SER-459, VAL-451 e PRO-364 (Figura C), demonstrando sua afinidade com o transportador PROT.

Tabela 1 – *Score do docking molecular* - DockThor

Ligante	Score	Energia total	Energia de vdW	Energia eletroestática
LQFM164	-7,707 kcal/mol	54,334 kcal/mol	-28,171 kcal/mol	-5,634 kcal/mol
LX6171	-8,063 kcal/mol	22,697 kcal/mol	-21,948 kcal/mol	-7,797 kcal/mol

vdW – Van Der Wals

Tabela 2 – Padrões farmacocinéticos - SwissADME

Composto	Lipofilicidade	Tamanho	Polaridade (TPSA)	Solubilidade Aquosa (logS)	Saturação (Csp3)	Flexibilidade
LQFM164	3,63 Log Po/w	411,30 g/mol	41,37 Å ²	-4,90	0,20	4 NRB
LX6171	4,75 Log Po/w	377,87 g/mol	46,09 Å ²	-5,40	0,23	4 NRB

TPSA - *Topological Polar Surface Area*

NRB – *Number Rotable Bonds* (Número de ligações simples que permitem rotação livre no composto).

Para avançar na compreensão dos mecanismos, o servidor SwissADME foi utilizado para coletar dados da farmacocinética do protótipo (Imagem D), os resultados demonstraram que além de permear a barreira hematoencefálica, ambos possuem cinéticas semelhantes. O que indica que assim como o controle o LQFM164, pode exercer potencial neuroreparador.

6.2. LQFM164 mantém um bom equilíbrio entre mobilidade e interação com o PROT

A análise de dinâmica molecular dos complexos PROT-LQFM164 e PROT-LX6171 foi realizada ao longo de 5 ns e permitiu a avaliação da estabilidade conformacional (RMSD), flexibilidade dos resíduos (RMSF) e exposição de superfície (SASA).

No gráfico A, observa-se o comportamento do desvio quadrático médio (RMSD) ao longo do tempo. O complexo PROT-LQFM164 apresentou valores de RMSD ligeiramente mais elevados que o PROT-LX6171, alcançando aproximadamente 0,65–0,70 nm ao final da simulação, enquanto o complexo com LX6171 estabilizou-se próximo de 0,55–0,60 nm. Esses dados sugerem uma estabilidade conformacional comparável entre os complexos, com leve maior flexibilidade global para o LQFM164.

No gráfico B, referente ao desvio quadrático médio por resíduo (RMSF), ambos os complexos apresentaram perfis semelhantes de flutuação, com picos mais acentuados nas regiões terminais e em poucas regiões específicas do domínio central, indicando que a ligação dos ligantes não causou grandes perturbações na flexibilidade local da proteína. Os valores de RMSF permaneceram predominantemente abaixo de 0,7 nm ao longo da cadeia de resíduos, indicando estabilidade estrutural da maioria das regiões.

Por fim, o gráfico C apresenta a análise de área de superfície acessível ao solvente (SASA), que revelou uma tendência geral de diminuição da exposição ao longo do tempo para ambos os complexos. O complexo PROT-LQFM164 exibiu valores levemente inferiores em comparação ao PROT-LX6171, indicando uma menor exposição ao solvente e, possivelmente, uma maior compactação do sistema. Esses resultados em conjunto indicam que ambos os ligantes formam complexos estáveis com o transportador PROT, com o LQFM164 apresentando um perfil de compactação levemente superior e flutuações dinâmicas discretamente maiores

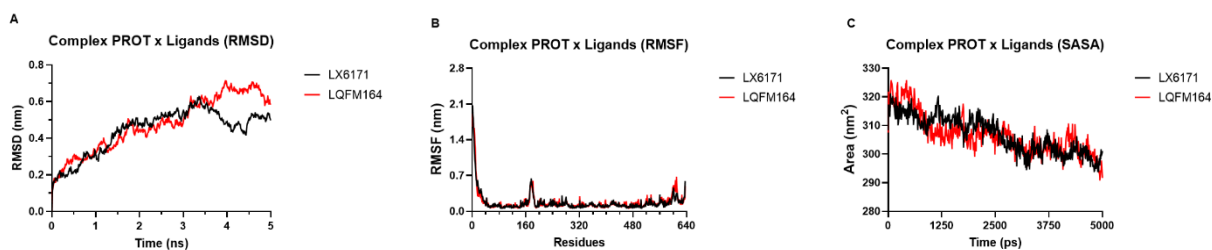
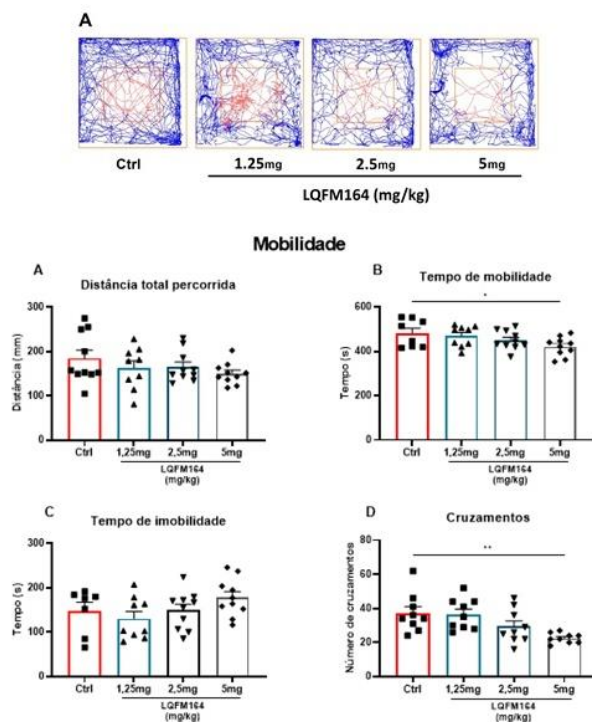


Fig. 13: Análises de dinâmica molecular dos complexos PROT-LX6171 e PROT-LQFM164. (A) Desvio quadrático médio (RMSD) dos complexos ao longo de 5 ns. (B) Flutuação por resíduo (RMSF) da cadeia proteica. (C) Área de superfície acessível ao solvente (SASA) durante a simulação.

6.3. O tratamento com LQFM164 reduz o padrão de mobilidade

Para validação experimental, foi realizado o teste de campo aberto. Com o objetivo de investigar como o composto modifica o padrão de exploração espontâneo dos camundongos. Houve uma diferença significativa quanto ao controle no tempo de mobilidade para a dose de 5mg/kg ($421,9 \pm 13,56\%$) com o valor de P em (0,0318) e nos cruzamentos também na dose de 5mg/kg ($22,56 \pm 0,98\%$) com o valor de P de (0,0042).

Já na análise do percentual de exploração, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos tratados com LQFM164 (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5 mg/kg) e o grupo controle (salina). Esse resultado indica que o composto não alterou de forma relevante os padrões de comportamento exploratório dos animais no teste do campo aberto, sugerindo que, nessas doses, o LQFM164 não impacta significativamente a locomoção ou a propensão exploratória.



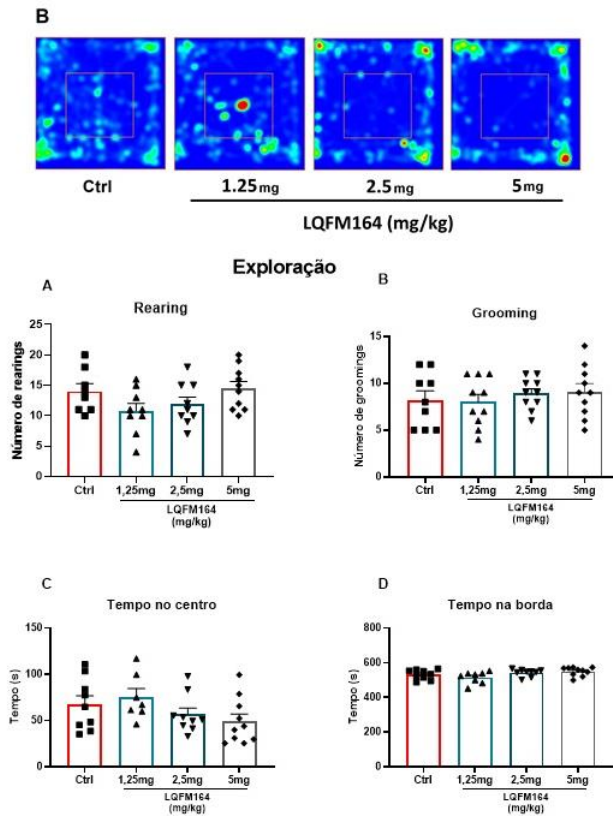


Fig. 14 – Efeito do LQFM164 na mobilidade e exploração em modelo animal. (A) Mobilidade evidenciada pelo *track plot* e padrão de deslocamento nos grupos tratados, com locomoção representada em azul e zonas de inatividade em vermelho. (B) Parâmetros de exploração identificado pelo *heat map*, incluindo distância percorrida, tempo de mobilidade, tempo de imobilidade e cruzamentos. (C) Parâmetros de exploração, como *rearing*, *grooming*, tempo no centro e na borda

6.4. O tratamento com LQFM164 altera a alternância no Labirinto em Y

Na validação comportamental avaliando parâmetros do labirinto em Y. Em A, uma diferença significativa do grupo salina para o grupo 2,5mg/kg. Já no grupo B nenhuma diferença significativa foi notada. Os parâmetros relevantes são: Grupo salina ($29,30 \pm 2,7\%$) e 2,5mg ($19,22 \pm 1,7\%$). Número total de entradas nos braços do labirinto, indicando a atividade locomotora dos animais. Observou-se um aumento significativo no grupo tratado com 2,5 mg/kg de LQFM164 em relação ao grupo controle, evidenciando possível efeito estimulante na exploração.

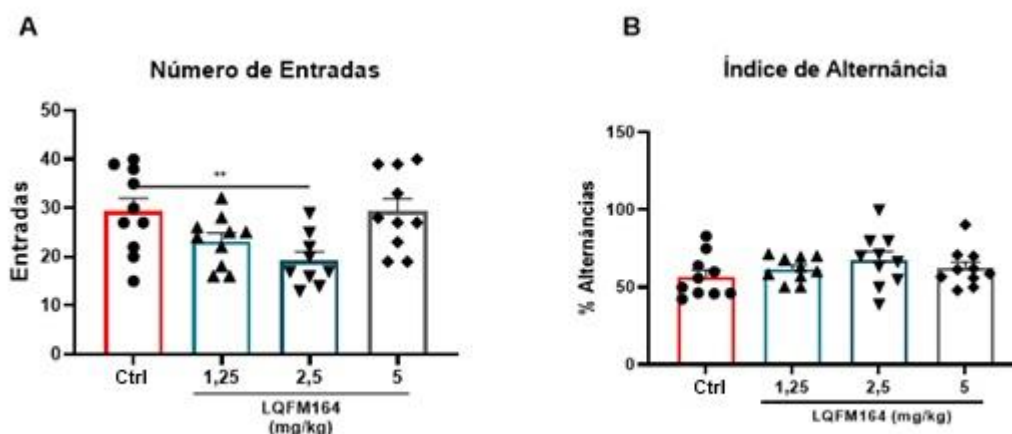


Fig. 15 – Avaliação do desempenho de camundongos no teste do labirinto em Y A) Número de entradas B) Índice de alternância (%). N (9/10 animais).

O protótipo não apresentou diferença significativa na memória de trabalho. Embora a memória de trabalho não tenha sido afetada, o composto pode influenciar outras funções, como a motora indicada pela Fig. A, como sugerido pelo número de entradas.

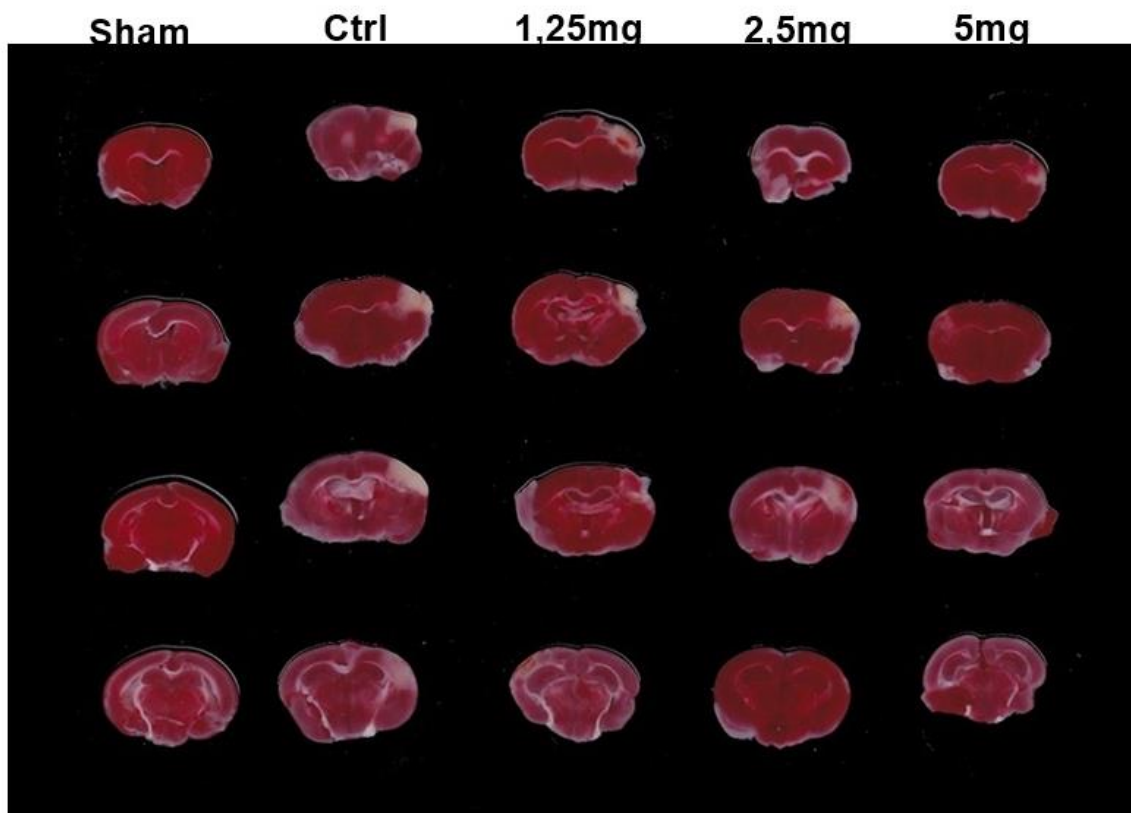
B

Fig. 16 – LQFM164 reduz a área de isquemia em modelo animal de isquemia cerebral após 5 dias de tratamento. (A) Análise da área de infarto por TTC. (B) Imagens representativas da coloração de TTC. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados por One-way ANOVA com pós-teste de Dunnet (N= 9-10 animais/grupo).

5.6 O tratamento com LQFM164 preserva o *score* motor em animais submetido ao modelo de MCAO – *Score Neurológico*

O teste do cilindro que tem como objetivo avaliar a assimetria funcional demonstrou que ao longo dos 5 dias as doses de 2,5 (mg/kg) e 5 (mg/kg) foram efetivas. Promovendo uma melhora na assimetria e na coordenação motora dos animais. O comportamento demonstrou uma diferença significativa do controle para o Sham sendo: Controle (113 ± 3) e Sham com o valor de (100 ± 2) com o P apontando ($=0,127$). Os grupos tratados, 2,5mg (99 ± 3) com o P de ($= 0,066$); 5mg (100 ± 2) e P ($=0,071$) demonstraram resultados significativos quanto ao controle conforme ilustrado na figura (A).

Já no teste de *Limb Clasp*ing tem como principal objetivo avaliar o déficit motor em modelos animais de isquemia cerebral. Neste estudo, o tratamento com a LQFM164 durante o período de cinco dias, demonstrou que o composto promoveu uma melhora de acordo com o avaliado no score neurológico. Os resultados demonstraram que o grupo controle atingiu ($2,22 \pm 0,22\%$) com o valor de P ($<0,0001$). Nos grupos tratados os resultados demonstraram resultados positivos da dosagem de 5mg ($1,00 \pm 0,25\%$), conforme ilustrado na figura (B).

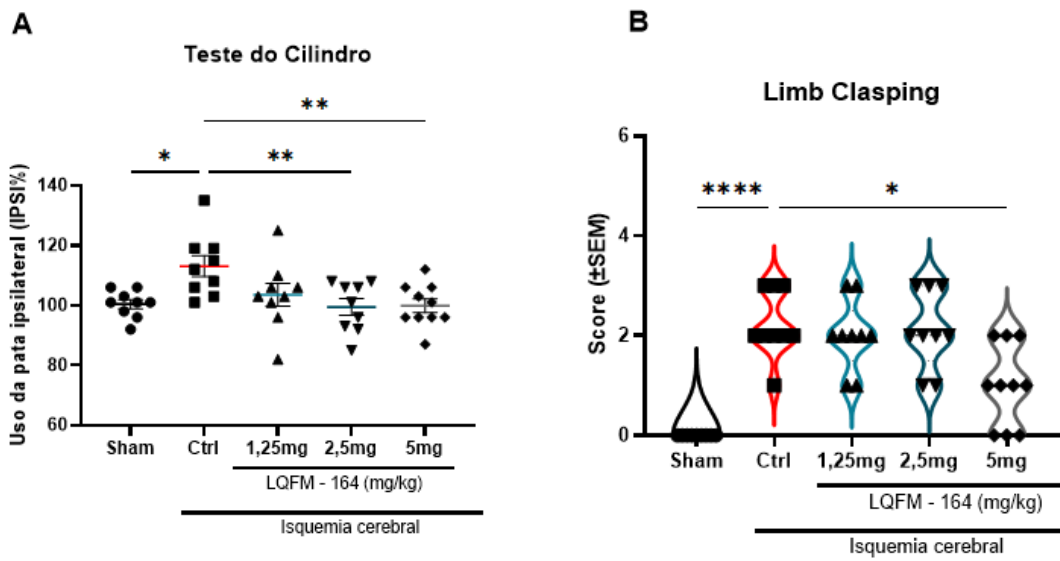


Fig. 17 – LQFM164 promove melhora no score neurológico de testes motores. Em (A) gráfico de dispersão de linha média (*dot plot*) ilustrando o teste de cilindro e em (B) gráfico de violino com a representação do *Limb Claspings*. Em (A) teste de Anova e em (B) Kruskal-Wallis test.

Neste trabalho descrevemos o desenvolvimento do LQFM164 um novo inibidor do transportador de prolina – PROT (Slc6a7) e seu efeito *in silico* e *in vivo* em modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) e seu efeito neuroreparador.

O composto LQFM164 foi avaliado quanto ao seu potencial de ligação à proteína PROT pela técnica de *docking molecular*. Essa técnica é amplamente utilizada na triagem de novos fármacos para o tratamento da isquemia (Li et al., 2024). Estudos prévios demonstraram a relevância do *docking molecular* na avaliação de compostos derivados de prolina, sendo essa abordagem aplicada na investigação de quinolina contendo análogos de prolina para interação com alvos moleculares específicos (Ganesan et al., 2020). Desta forma, a aplicação de *docking* possibilita a identificação de interações moleculares que contribuem para avaliar a eficácia de novos compostos.

Estudos envolvendo o transportador de soluto da família SLC6A5 e outros carreadores destacam a relevância das interações moleculares nesse contexto. No trabalho de Carvalho et al. (2024), a análise das interações da Bitopertina com diferentes transportadores da família SLC6, por meio de estudos de *docking molecular* no DockThor, revelou a presença do resíduo ARG-66 como sítio de interação. Notavelmente, esse mesmo resíduo foi identificado na interação do LQFM164 com o transportador PROT, indicando um possível mecanismo conservado de ligação. Além disso, os dados obtidos demonstraram que os transportadores avaliados exibiram perfis farmacocinéticos similares aos observados no presente estudo (Carvalho et al., 2024).

No trabalho de Peixoto e colaboradores (2021), ao avaliar *in silico* pelo DockThor, os autores observaram que os compostos *Epoxy- α -lapachone* (Lap) e *Epoxyethyl-lawsonone* (Law) apresentaram energias de ligação próximas ou inferiores a -8 kcal/mol ao interagir com enzimas-chave da *Leishmania spp.*, incluindo a lanosterol C-14 demethylase, o cytochrome c e a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. O artigo destaca que esses valores de energia de ligação indicam interações estáveis e um potencial significativo de inibição dessas enzimas, reforçando a importância desses compostos como candidatos promissores a fármacos multialvos para o tratamento da leishmaniose (Peixoto et al., 2021).

De forma semelhante, a molécula LQFM164 também apresentou uma energia de ligação próxima de -8 kcal/mol, um valor que, segundo Peixoto et al. (2021), sugere afinidade com a proteína-alvo e estabilidade no complexo formado. Esse achado é consistente com o potencial farmacológico significativo de compostos que atingem essa faixa de energia de ligação.

Em geral, para interação em estudos de *docking molecular*, valores negativos de energia livre de ligação (ΔG , em kcal/mol) são parâmetros indicativos. Nesse contexto, Pereira-Júnior et al. (2022) avaliaram flavonoides da folha de hortelã na interação entre a proteína *spike* do SARS-CoV-2 e o receptor humano ACE2. Seus valores de ΔG , que variaram entre -6,38 e -9,18 kcal/mol, foram relatados como indicativos de uma interação estável com potencial inibitório da ligação viral. Embora a plataforma de *docking* empregada tenha sido o SwissDock, esse resultado confirma a tendência geral na literatura de que valores negativos de energia livre de ligação favorecem predições de afinidade molecular em pesquisas *in silico* (Pereira-Júnior et al., 2022).

Estes dados de *docking molecular* vão de encontro com os achados de Liu e amigos (2017) que ao avaliar pelo AutoDock Vina (versão 1.1.2) em busca de compostos derivados de plantas medicinais tradicionais chinesas que foram analisados por *docking molecular* contra 15 alvos terapêuticos do AVC isquêmico. Eles observaram que os compostos que interagiam melhor nesses alvos tinham baixas energias de ligação (entre -16,2 a -8,5 kcal/mol) (Liu et al., 2017).

Desta forma, é possível salientar que em candidatos para tratamento da isquemia a o ΔG tenha uma faixa mais baixa. Uma afinidade menor para o sítio de ligação. Isso pode indicar de que os potenciais fármacos para isquemia tenha em suma valores controlados quanto ao seu receptor.

Nos estudos de Wang e colaboradores (2023), é possível notar que a curcumina apresentou alta afinidade de ligação com os alvos, especialmente com o TNF (energia de ligação mais forte, -10,07 kcal/mol), em estudos com abordagem *in silico* sobre a isquemia. Além disso, foram realizadas simulações de 100ns com o GROMACS para análise da estabilidade dos complexos. A análise do RMSD demonstrou que os complexos atingiram estabilidade estrutural com pequenas flutuações ao longo do tempo. O RMSF revelou baixa mobilidade da maioria dos resíduos, indicando poucas regiões flexíveis. Ademais, o SASA apresentou uma tendência de redução durante a simulação, sugerindo que os complexos se

tornaram progressivamente mais compactos, o que é indicativo de maior estabilidade estrutural e melhor acomodação do ligante no sítio de ligação, assim como ocorreu com o protótipo. (Wang et al., 2023).

Retornando ao trabalho de Carvalho e colaboradores (2024), dessa vez com enfoque na dinâmica. A análise do SASA (*Solvent Accessible Surface Area*) revelou uma tendência de diminuição da área exposta ao solvente ao longo da simulação do complexo PROT-LQFM164, com valores reduzindo de aproximadamente 320 nm² para 290 nm². Esta observação é consistente com o comportamento descrito para os complexos envolvendo a Bitopertina, onde a redução da SASA foi associada à compactação do complexo e à maior estabilidade estrutural. Assim, os achados sugerem que a interação de LQFM164 com o PROT promove uma compactação progressiva e estabilidade conformacional semelhante à observada para bitopertina, reforçando o potencial de compostos moduladores da família SLC6 em manter interações robustas ao longo da dinâmica molecular. Até 5ns de simulação, a análise de dinâmica revelou que o complexo PROT-LQFM215 apresentou estabilidade estrutural precoce, com RMSD baixo e constante, e flutuações restritas nas regiões de interação, conforme evidenciado pelo perfil de RMSF. A tendência de diminuição da SASA sugere um início de compactação do complexo, embora de forma menos pronunciada do que observado para o LQFM164, indicando que o LQFM215 promove uma associação mais estável e potencialmente eficaz com o transportador PROT (Carvalho et al., 2024).

Os dados demonstram que assim como seus análogos, o protótipo LQFM164 se demonstra instável quanto o receptor PROT. Após observar resultados positivos com análise de *docking molecular* e dinâmica molecular e quanto a cinética do protótipo, o caminho foi estabelecer a padronização experimental visando definir dosagens seguras e implementar a caracterização comportamental do protótipo. As doses foram determinadas com base em trabalhos anteriores com análogos pela equipe.

Os resultados da padronização experimental mostraram uma redução nas travessias. Essa diminuição na exploração da área central do campo aberto exibida por camundongos com sinais clínicos deficientes de PROT, não parece correlacionar-se com comportamento ansioso. Schulz et al. (2018) também descreveram esse fenômeno, relatando que o número de entradas no quadrante central foi significativamente menor em camundongos PROT KO. Isso evidencia que a alteração na atividade locomotora nesses animais está associada à funcionalidade do

transportador PROT. Como evidenciado pela Figura 14(A), esses resultados são corroborados pela redução de entradas na área central do aparelho, comportamento visto em modelos que não possuem o transportador (Schulz et al., 2018).

Portanto, sabe-se que a ação da prolina pode ser modulada no SNC, conforme destacado por Hamasu et al. (2010). Os autores mostraram que a injeção de L-prolina no sistema ventricular cerebral de pintos neonatos sob estresse agudo produziu efeitos sedativos e hipnóticos que eram dependentes da ativação do receptor NMDA no cérebro. Isso pode justificar o comportamento observado, pois os níveis aumentados de prolina no SNC (devido à inibição da prolina) poderiam ativar esses receptores, levando a efeitos sedativos e diminuição do comportamento exploratório (Hamasu et al., 2010).

Trabalhar com inibidores de L-prolina trazem um novo panorama para elucidar condições neurológicas. Já que outros inibidores semelhantes como o LX6171, já foram testados. Embora o composto não tenha avançado para testes pré-clínicos ou clínicos (Zipp et al., 2014).

Em relação aos inibidores de PROT discutidos no novo relatório de Zipp et al., o estudo de Zipp e colaboradores (2014) também aborda a oportunidade de os inibidores de PROT serem usados como agentes terapêuticos para distúrbios cognitivos como a doença de Alzheimer, nos quais os inibidores de PROT foram descobertos e relatados por Zipp e colegas. Em um processo conhecido como triagem de alto rendimento (HTS), diferentes compostos candidatos que inibiram o PROT em relação ao transporte de ^3H -prolina (L-prolina marcada com trítio (^3H)) foram identificados através de ensaios em células COS1 expressando o transportador humano, nos quais a inibição foi realizada na presença de concentrações variadas do composto candidato. Soluções aquosas e etanol dos compostos foram testadas, e o composto 58 deu origem a letargia e toxicidade em camundongos, impedindo avaliação *in vivo* adicional após administração intravenosa. Embora isso não seja especificamente abordado no artigo, o padrão reduzido de atividade motora pode estar relacionado à letargia social e ao teste de campo aberto (Zipp et al., 2014).

Testamos o efeito da LQFM164 em um modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) de acordo com seu perfil farmacológico e comportamental apresentado até agora. Este modelo serve como uma plataforma para avaliar o potencial neurorepador em um modelo *in vivo* induzindo dano isquêmico em camundongos.

Um neuroprotetor molecular testado no estudo recente de Cavalcante et al. foi o bitopertina, um inibidor de GlyT1. As doses usadas no estudo foram de 1,25 mg, 2,5 mg e 5 mg 24 antes da indução. Os resultados obtidos mostraram dados homogêneos para a redução da área de infarto, que está de acordo com estudos anteriores. Este trabalho resultou nas escolhas das doses do protótipo (Cavalcante et al., 2025).

Já sobre o *score* de mobilidade, notada pelo teste de *Cilindro e Limb Clasping*, trabalhos do grupo como os apresentados por Nunes (2024) com o ácido decanóico, que atua no AMPA. (Nunes., 2024) que utilizou o modelo de MCAO onde avaliou o *score* motor e o cognitivo. Alinhado com o estudo, o protótipo promove a função motora dos animais. Entretanto, estudos sugerem que a distribuição do PROT no SNC pode estar vinculada em regiões excitatórias como por exemplo, o hipocampo. Em estudos de imuno-histoquímica mostram o PROT expresso em subpopulações de neurônios em terminais pré-sinápticos regulando o fluxo de L-prolina e sua liberação em terminais glutamatérgicos. Resultando que apesar de não modular a memória de trabalho na padronização experimental, pode ser efetivo em demais testes comportamentais de memória (Crump; Fremeau; Craig, 1999.; Renick et al., 1999; Nunes., 2024).

Com o *score* neurológico comparado ao controle, principalmente nas doses de 2,5 mg/kg e 5mg/kg no teste do cilindro. E na dose de 5mg/kg no teste de *limb clasping* sugerindo que essas doses podem ser as mais efetivas. Estes achados estão de acordo com o encontrado nos estudos de Nakajima et al. (2018) que avaliou o potencial neuroprotetor do perampanel que assim como o protótipo está envolvido em receptores glutamatérgicos. Onde, a redução da área de infarto promoveu melhoras motoras em modelos animais de MCAO (Nakajima et al., 2018).

Ainda, os estudos de Chen e amigos (2020), também demonstrou melhoras no *score neurológico* estudando β -cariofileno em modelo de oclusão da artéria cerebral média. O tratamento com β -cariofileno reduziu os déficits neurológicos, o volume do infarto cerebral e o dano patológico no tecido cerebral. Além disso, os resultados sugerem que o efeito neuroprotetor do β -cariofileno está relacionado à ativação da via cAMP/PKA, que favorece a translocação de receptores AMPA, receptor este que está ligada a síntese glutamatérgica (Chen et al., 2020).

Em resumo, conforme mostrado por Carvalho e amigos (2025), os estudos sobre a L-prolina ainda precisam ser aprofundados para melhor compreensão de seu transporte e ação no organismo. A L-prolina desempenha um papel crucial na neurotransmissão e no metabolismo

cerebral, estando envolvida na modulação da excitabilidade neuronal. Além disso, sua participação em vias glutamatérgicas e GABAérgicas sugere um impacto direto na homeostase de neurotransmissores, o que pode ter implicações em condições neurológicas, como a isquemia cerebral (Carvalho et al., 2025).

Estes resultados são importantes pois, podem corroborar com estudos de translação para o avanço e melhorias de terapias com fármacos neuroreparadores. A validação de alvos moleculares como o transportador de prolina em modelos animais deve considerar a complexidade da fisiopatologia humana, especialmente em doenças multifatoriais como o AVC isquêmico.

No trabalho de Loubopoulos e colaboradores (2021) os pesquisadores buscavam encontrar por meio de um estudo teórico os motivos pelos quais mais de mil estudos pré-clínicos com resultados positivos em modelos animais de AVC isquêmico não se converteram em tratamentos eficazes na prática clínica. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que a dificuldade dos modelos translacionais está na dificuldade dos modelos translacionais em apresentar baixa representatividade da realidade clínica, marcada por diferenças significativas entre os modelos animais e os pacientes humanos — especialmente quanto à idade, presença de comorbidades, microbiota, variabilidade genética e suporte médico. Além disso, destacam a adoção de desfechos limitados, como a redução do volume de infarto, e a ausência de integração entre pesquisadores pré-clínicos e clínicos. (Loubopoulos et al., 2021).

Assim, com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível apontar o composto LQFM164 como um inibidor dos transportadores de prolina, com potencial para ativar vias de neuroreparo. A inibição da captação intracelular de prolina apresenta resultados promissores para a compreensão da neurotransmissão excitatória.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o potencial neuroreparador do protótipo LQFM164, um inibidor seletivo do transportador de prolina (PROT/SLC6A7), em um modelo experimental de isquemia cerebral. Os resultados obtidos a partir de análises *in silico*, comportamentais e morfológicas indicaram que a inibição do PROT promove efeitos benéficos significativos no contexto isquêmico, evidenciando sua relevância como uma estratégia terapêutica promissora.

As análises *in silico* de *docking molecular* indicaram que o LQFM164 apresenta afinidade de ligação ao transportador PROT, com interações moleculares estáveis e com as análises de cinética semelhantes ao controle (LX6171) e com potencial para atravessar a BHE. A dinâmica molecular reforçou o estudo apresentando a estabilidade do complexo ligante-proteína, revelando boa compactação estrutural.

Nos testes *in vivo*, o tratamento com o LQFM164 promoveu melhora funcional na avaliação dos *scores motor*, com destaque para as doses de 2,5 e 5mg/kg. Morfologicamente, observou-se uma redução significativa da área de infarto cerebral, dados que reforçam a característica de neuroreparo do composto.

Em suma, os resultados obtidos sustentam a hipótese de que a modulação dos níveis sinápticos de L-prolina pode atenuar danos causados pela isquemia. Diante disso, o LQFM164 se destaca como um candidato promissor a terapia de condições neurológicas, representando uma alternativa inovadora que pode ir para o campo translacional.

Destaca-se que futuros estudos serão necessários para aprofundar as vias e mecanismos moleculares envolvidos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1–2:19–25.
2. Alsbrook DL, di Napoli M, Bhatia K, Biller J, Andalib S, Hinduja A, Rodrigues R, Rodriguez M, Sabbagh SY, Selim M, Farahabadi MH, Jafarli A, Divani AA. Neuroinflammation in acute ischemic and hemorrhagic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2023;23(8):407-431.
3. Aragón C, López-Corcuera B. Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *Eur J Pharmacol*. 2003;479(1–3):249-62.
4. Arrieta-Cruz I, Su Y, Knight CM, Lam TKT, Gutiérrez-Juárez R. Evidence for a role of proline and hypothalamic astrocytes in the regulation of glucose metabolism in rats. *Diabetes*. 2013;62(4):1152-1158.
5. Baev AY, Vinokurov AY, Novikova IN, Dremin VV, Potapova EV, Abramov AY. Interaction of mitochondrial calcium and ROS in neurodegeneration. *Cells*. 2022;11(4):706.
6. Bao Y, Qi H, Wang D, Ding M, Li W, Chen L, Lei Z, Yang R, Zeng N. Ischemic stroke pathophysiology: A bibliometric and visualization analysis from 1990 to 2022. *Heliyon*. 2024;10(7):e28597.
7. Barbosa, A. Lexicon Pharmaceuticals, Inc. Preparation of (R)-phenyl(N-pyrimidinylpiperidin-4-yl)methanol-based compounds, compositions comprising them and methods of their use as proline transport inhibitors. United States. Patent US20060258672 A1. 17 de maio de 2006.
8. Bersano A, Gatti L. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2023;24(19):14848.
9. Billard JM. D-Serine in the aging hippocampus. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;116:18-24.
10. BIORENDER. BioRender – Science Communication Tool. Available at: <https://biorender.com/>.
11. Carvalho GA, Cavalcante DP, Parreira RC, Chiareli RA, Ortiz Leoncini G, Gomez RS, Ulrich H, Ferreira Caixeta L, Oliveira-Lima OC, Pinto MCX. Neurobiology of L-proline: From molecules to behavior. *Neuroscience*. 2025;568:116-129.
12. Carvalho GA, Chiareli RA, Marques BL, Parreira RC, de Souza Gil E, de Carvalho FS, da Rocha ALB, Silva RR, Noël F, Vaz BG, Lião LM, Ahmad S, Verli H, Menegatti R, Pinto MCX. L-proline transporter inhibitor (LQFM215) promotes neuroprotection in ischemic stroke. *Pharmacol Rep*. 2023;75(2):276-92.

13. Carvalho GA, Chiareli RA, Pedrazzi JFC, Silva-Amaral D, da Rocha ALB, Oliveira-Lima OC, Lião LM, de Souza-Fagundes EM, Schildknecht S, Leist M, Del-Bel EA, Gomez RS, Birbrair A, Menegatti R, Pinto MCX. Novel proline transporter inhibitor (LQFM215) presents antipsychotic effect in ketamine model of schizophrenia. *Neurochem Res.* 2024;49(1):170-83.
14. Carvalho GA, Tambwe PM, Nascimento LRC, Campos BKP, Chiareli RA, Nunes GP, Menegatti R, Gomez RS, Pinto MCX. In silico evidence of bitopertin's broad interactions within the SLC6 transporter family. *J Pharm Pharmacol.* 2024;76(9):1199-211.
15. Carvalho GA. Efeito Antipsicótico de novos inibidores do transportador de Prolina (SLC6A7). (Dissertação). Goiânia. Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás; 2020.
16. Cavalcante DP, Nunes AÍS, da Silva ER, de Carvalho GA, Chiareli RA, Oliveira-Lima OC, Ortiz-Leoncini G, Ulrich H, Gomez RS, Pinto MCX. GlyT1 inhibition promotes neuroprotection in the middle cerebral artery occlusion model through the activation of GluN2A-containing NMDAR. *Exp Neurol.* 2025;383:115006.
17. Chavda V, Chaurasia B, Garg K, Deora H, Umana GE, Palmisciano P, Scalia G, Lu B. Molecular mechanisms of oxidative stress in stroke and cancer. *Brain Disord.* 2022;5:100029.
18. Chen S, Wang Y, Wang X, He M, Zhang L, Dong Z. PKA-Dependent Membrane Surface Recruitment of CI-AMPA Receptors Is Required for the Neuroprotective Effect of β -Caryophyllene in Acute Ischemic Stroke. *Frontiers in Neurology.* 2020;11:566067. doi:10.3389/fneur.2020.566067
19. Crump FT, Fremeau RT Jr, Craig AM. Localization of the brain-specific high-affinity L-proline transporter in cultured hippocampal neurons: Molecular heterogeneity of synaptic terminals. *Mol Cell Neurosci.* 1999;13(1):25–39.
20. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7:42717.
21. Delwing D, Bavaresco CS, Wannmacher CMD, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse ATS. Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats. *Int J Devl Neurosci.* 2003;21.
22. Diamond SL. Systems analysis of thrombus formation. *Circ Res.* 2016;118(9):1348-62.
23. Engin AB, Engin A. Protein kinase-mediated decisions between life and death. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1275. Cham. Springer. 2021. 407p.

24. Feng T, Hu X, Fukui Y, Tadokoro K, Bian Z, Morihara R, Yamashita T, Abe K. Neuroprotective effects of scallop-derived plasmalogen in a mouse model of ischemic stroke. *Brain Res.* 2021;1766:147516.
25. Ferreira AGK, Lima DD, Delwing D, MacKedanz V, Tagliari B, Kolling J, Schuck PF, Wajner M, Wyse ATS. Proline impairs energy metabolism in cerebral cortex of young rats. *Metab Brain Dis.* 2010;25(2):161-168.
26. Feske SK. Ischemic stroke. *Am J Med.* 2021;134(12):1457-64.
27. Fremeau RT, Caron MG, Blakely RD. Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transporter expressed in putative glutamatergic pathways of rat brain. *Neuron.* 1992;8.
28. Ganesan MS, Raja KK, Narasimhan K, Murugesan S, Kumar BK. Design, synthesis, α -amylase inhibition and in silico docking study of novel quinoline bearing proline derivatives. *J Mol Struct.* 2020;1208:127873.
29. Guedes IA, Pereira da Silva MM, Galheigo M, Krempser E, de Magalhães CS, Correa Barbosa HJ, Dardenne LE. DockThor-VS: A free platform for receptor-ligand virtual screening. *J Mol Biol.* 2024;436(17):168548.
30. Guo C, Stretz C, Anderson JR, El-Husseini N, mac Grory B, Werner B, Yarnell S. Psychiatric sequelae of stroke affecting the non-dominant cerebral hemisphere. *J Neurol Sci.* 2021;430:120007.
31. Guo XH, Pang L, Gao CY, Meng FL, Jin W. Lyoniresinol attenuates cerebral ischemic stroke injury in MCAO rat based on oxidative stress suppression via regulation of Akt/GSK-3 β /Nrf2 signaling. *Biomed Pharmacother.* 2023;167:115543.
32. Hamasu K, Shigemi K, Tsuneyoshi Y, Yamane H, Sato H, Denbow DM, Furuse M. Intracerebroventricular injection of L-proline and D-proline induces sedative and hypnotic effects by different mechanisms under an acute stressful condition in chicks. *Amino Acids.* 2010;38(1):57-64.
33. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci.* 2002;5(5):405-414.
34. Hou Z, Brenner JS. Developing targeted antioxidant nanomedicines for ischemic penumbra: Novel strategies in treating brain ischemia-reperfusion injury. *Redox Biol.* 2024;73:103185.
35. Hu HJ, Song M. Disrupted ionic homeostasis in ischemic stroke and new therapeutic targets. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017;26(12):2706-2719.
36. Jakubec D, Skoda P, Krivak R, Novotny M, Hoksza D. PrankWeb 3: accelerated ligand-binding site predictions for experimental and modelled protein structures. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W593-W597.

37. Jayanthi LD, Wilson JJ, Montalvo J, DeFelice LJ. Differential regulation of mammalian brain-specific proline transporter by calcium and calcium-dependent protein kinases. *Br J Pharmacol*. 2000;129(3):465–470.
38. Jeong J, Lee J, Kim JH, Lim C. Metabolic flux from the Krebs cycle to glutamate transmission tunes a neural brake on seizure onset. *PLoS Genet*. 2021;17(10):e1009871.
39. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of chemical physics*. 1983;79(2):926-35.
40. Joshi CN, Jain SK, Murthy PSR. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Res Protoc*. 2004;13(1):11-7.
41. Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B. A.; Thiessen, P. A.; Yu, B.; Zaslavsky, L.; Zhang, J.; Bolton, E. E. PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Research*, v. 53, n. D1, p. D1516–D1525, 6 jan. 2025. DOI: 10.1093/nar/gkae1059. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 15 jan. 2025.
42. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:105-11.
43. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2014;115:157–188.
44. Latzer IT, Blau N, Ferreira CR, Pearl PL. Clinical and biochemical footprints of inherited metabolic diseases. XV. Epilepsies. *Mol Genet Metab*. 2023;140(3):107690.
45. Lemmerman LR, Balch MHH, Moore JT, Alzate-Correa D, Rincon-Benavides MA, Salazar-Puerta A, Gnyawali S, Harris HN, Lawrence W, Ortega-Pineda L, Wilch L, Risser IB, Maxwell AJ, Duarte-Sanmiguel S, Dodd D, Guio-Vega GP, McTigue DM, David Arnold W, Nimjee SM, Gallego-Perez D. Nanotransfection-based vasculogenic cell reprogramming drives functional recovery in a mouse model of ischemic stroke. *Sci Adv*. 2021;7.
46. Li F, Dong Y, Wang G, Huang Z, Song W, Zheng X, Zhang P, Yao M. Exploring the pharmacological mechanism of Tongluo Qingnao formula in treating acute ischemic stroke: A combined approach of network pharmacology, molecular docking and experimental evidences. *Pharmacol Res Mod Chin Med*. 2024;13:100550.
47. Li X, Li L, Lei W, Zhong C, Wang B, Yang X. Young rat vascular endothelial cells promote neurological recovery of stroke aged rat via HIF-1 α . *iScience*. 2025;28:112552.
48. Li Y, Zhang J. Animal models of stroke. *Anim Models Exp Med*. 2021;4(3):204-219.

49. Liu JQ, Dai SX, Zheng JJ, Guo YC, Li WX, Li GH, Huang JF. The identification and molecular mechanism of anti-stroke traditional Chinese medicinal compounds. *Sci Rep*. 2017;7:41406.
50. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Neurological diseases: Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(5):399-414.
51. Lourbopoulos A, Mourouzis I, Xinaris C, Zerva N, Filippakis K, Pavlopoulos A, Pantos C. Translational block in stroke: a constructive and "out-of-the-box" reappraisal. *Front Neurosci*. 2021;15:652403.
52. Magid-Bernstein J, Girard R, Polster S, Srinath A, Romanos S, Awad IA, Sansing LH. Cerebral hemorrhage: Pathophysiology, treatment, and future directions. *Circ Res*. 2022;130(8):1204-1229.
53. Malbouisson L, Marcelo S, Santos L, Moraes Dos, Auler JJ, Otávio C, Carmona MJ. Proteção miocárdica em cirurgia cardíaca. *Rev Bras Anestesiol*. 2005;55(5):558-74.
54. Marques BL, Carvalho GA, Freitas EMM, Chiarelli RA, Barbosa TG, Di Araújo AGP, Nogueira YL, Ribeiro RI, Parreira RC, Vieira MS, Resende RR, Gomez RS, Oliveira-Lima OC, Pinto MCX. The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;95:98–110.
55. Marques BL, Oliveira-Lima OC, Carvalho GA, de Almeida Chiarelli R, Ribeiro RI, Parreira RC, da Madeira Freitas EM, Resende RR, Klempin F, Ulrich H, Gomez RS, Pinto MCX. Neurobiology of glycine transporters: From molecules to behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020;118:97-110.
56. Marques BL. Efeito neuroprotetor da sarcosina em modelo animal de isquemia cerebral focal. (Dissertação). Goiânia: Instituto de Ciências Biológicas II; 2022.
57. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 2007;54(1):34–66.
58. Michór P, Renardson L, Li S, Boltze J. Neurorestorative approaches for ischemic stroke. *Neuroscience*. 2024; 550:69–78.
59. Miedel CJ, Patton JM, Miedel AN, Miedel ES, Levenson JM. Assessment of spontaneous alternation, novel object recognition and limb claspings in transgenic mouse models of amyloid- β and tau neuropathology. *J Vis Exp*. 2017;(123):55523.
60. Ministério da Saúde. DATASUS. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Acesso em 23/11/2024 ed2020.
61. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010;67(2):181-198.
62. Murtishaw AS, Heaney CF, Bolton MM, Belmonte KCD, Langhardt MA, Kinney JW. Intermittent streptozotocin administration induces behavioral and pathological features

- relevant to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neuropharmacology*. 2018;137:164-77.
63. Nakajima M, Suda S, Sowa K, Sakamoto Y, Nito C, Nishiyama Y, et al. AMPA receptor antagonist perampanel ameliorates post-stroke functional and cognitive impairments. *Neuroscience*. 2018;386:256–264.
doi:10.1016/j.neuroscience.2018.06.043
 64. Nunes AIS. Efeito neuroreparador do ácido decanoico em modelo animal de isquemia cerebral. (Dissertação). Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2024.
 65. Ortiz JG, Negrón AE, Bruno MS. High-affinity binding of proline to mouse brain synaptic membranes. *Neurochem Res*. 1989;14(2).
 66. Owjifard M, Rahimian Z, Karimi F, Borhani-Haghighi A, Mallahzadeh A. A comprehensive review on the neuroprotective potential of resveratrol in ischemic stroke. *Heliyon*. 2024;10(14):e34121.
 67. Pan T, Wu S, Wang S, Wang X, Chen D, Chen Y. Novel insights into cuproptosis in alcoholic liver disease using bioinformatics analysis and experimental validation. *Int Immunopharmacol*. 2025;146:113828.
 68. Peixoto JF, Oliveira AS, Monteiro PQ, Gonçalves-Oliveira LF, Andrade-Neto VV, Ferreira VF, Souza-Silva F, Alves CR. In silico insights into the mechanism of action of epoxy- α -lapachone and epoxymethyl-lawsone in *Leishmania* spp. *Molecules*. 2021;26(12):3537.
 69. Peng B, Mohammed FS, Tang X, Liu J, Sheth KN, Zhou J. Nanotechnology approaches to drug delivery for the treatment of ischemic stroke. *Bioact Mater*. 2025;43:145-61.
 70. Pereira Júnior ML, de Sousa Junior RT, Amvame Nze GD, Giozza WF, Ribeiro Júnior LA. Evaluation of peppermint leaf flavonoids as SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain attachment inhibitors to the human ACE2 receptor: A molecular docking study. *Open J Biophys*. 2022;12:132–152.
 71. Pinto MCX, de Paiva MJN, Oliveira-Lima OC, Menezes HC, Cardeal ZL, Gomez MV, Resende RR, Gomez RS. Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography-mass spectrometry method. *J Chem Neuroanat*. 2014;55:24-37.
 72. Pinto MCX. Efeito neuroprotetor da inibição do transportador de glicina do tipo 1. (Tese). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2014. 122p.
 73. Ponten F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas--a tool for pathology. *J Pathol*. 2008;216(4):387–393.
 74. Renick SE, Kleven DT, Chan J, Stenius K, Milner TA, Pickel VM, Fremeau RT Jr. The mammalian brain high-affinity L-proline transporter is enriched preferentially in

- synaptic vesicles in a subpopulation of excitatory nerve terminals in rat forebrain. *J Neurosci.* 1999;19(1):21–33.
75. Rhabori S, Alaqarbeh M, El Allouche Y, Naanaai L, El Aissouq A, Bouachrine M, Chtita S, Khalil F. Exploring innovative strategies for identifying anti-breast cancer compounds by integrating 2D/3D-QSAR, molecular docking analyses, ADMET predictions, molecular dynamics simulations, and MM-PBSA approaches. *J Mol Struct.* 2025;1320:139500.
 76. Rhoads DE, Peterson NA, Raghupathy E. Selective inhibition of synaptosomal proline uptake by leucine and methionine enkephalins. *J Biol Chem.* 1983;258(20):12233-12237.
 77. Rios MM, Alves MVM, Silva GFP, Sousa Júnior JA, Bernardo HME, Couto KG, Moraes Filho AO, Ribeiro LL, Lima Júnior PRO, Vasconcelos FM. Aspectos fisiopatológicos do acidente vascular isquêmico: uma revisão narrativa. *Res Soc Dev.* 2023;12(2):e24112240218.
 78. Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions. *Neurology.* 2021;97(20):S6-S16.
 79. Sankar K, Trainor K, Blazer L, Adams J, Sidhu S, Day T, Meiering E, Maier J. A descriptor set for quantitative structure-property relationship prediction in biologics. *Mol Inform.* 2022;41(9):2100240.
 80. 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.
 81. Schmidt A, Minnerup J. Promoting recovery from ischemic stroke. *Expert Rev Neurother.* 2016;16(2):173–186.
 82. Schulz D, Morschel J, Schuster S, Eulenburg V, Gomeza J. Inactivation of the mouse L-proline transporter PROT alters glutamatergic synapse biochemistry and perturbs behaviors required to respond to environmental changes. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:279.
 83. Sedlak TW, Paul BD, Parker GM, Hester LD, Snowman AM, Taniguchi Y, Kamiya A, Snyder SH, Sawa A. The glutathione cycle shapes synaptic glutamate activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(7):2701-6.
 84. Sehatpour P, Iosifescu DV, De Baun HM, Shope C, Mayer MR, Gangwisch J, et al. Dose-dependent augmentation of neuroplasticity-based auditory learning in schizophrenia: A double-blind, placebo-controlled, randomized, target engagement clinical trial of the NMDA glutamate receptor agonist D-serine. *Biol Psychiatry.* 2023;94(2):164–173.

85. Severino PC, Muller GAS, Vandresen-Filho S, Tasca CI. Cell signaling in NMDA preconditioning and neuroprotection in convulsions induced by quinolinic acid. *Life Sci.* 2011;89(15-16):570–576.
86. Shen Z, Xiang M, Chen C, Ding F, Wang Y, Shang C, Xin L, Zhang Y, Cui X. Glutamate excitotoxicity: Potential therapeutic target for ischemic stroke. *Biomed Pharmacother.* 2022;151:113125.
87. Sjostedt E, Zhong W, Fagerberg L, Karlsson M, Mitsios N, Adori C, et al. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science.* 2020;367(6482).
88. Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010;47(2):122-129.
89. Taniguchi A, Watanabe H, Kimura K, Hashiuchi E, Ohashi N, Sato H, Sakai M, Matsumoto M, Asahara SI, Inoue H, Inaba Y. Proline enhances the hepatic induction of lipogenic gene expression in male hepatic fasn reporter mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2025;747:151314.
90. Trotman-Lucas M, Gibson CL. A review of experimental models of focal cerebral ischemia focusing on the middle cerebral artery occlusion model. *F1000Res.* 2021;10:242.
91. Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. *Med Res Rev.* 2022;42(1):259-305.
92. Vieira IHP, Botelho EB, de Souza Gomes TJ, Kist R, Caceres RA, Zanchi FB. Visual dynamics: a WEB application for molecular dynamics simulation using GROMACS. *BMC Bioinformatics.* 2023;24(1):107.
93. Wang F, Xie X, Xing X, Sun X. Excitatory synaptic transmission in ischemic stroke: A new outlet for classical neuroprotective strategies. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16):9381.
94. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem.* 2004;25(9):1157-74.
95. Wang Y, Leak RK, Cao G. Microglia-mediated neuroinflammation and neuroplasticity after stroke. *Front Cell Neurosci.* 2022;16:980722.
96. Wang Y, Zu G, Yu Y, Tang J, Han T, Zhang C. Curcumin's mechanism of action against ischemic stroke: A network pharmacology and molecular dynamics study. *PLoS ONE.* 2023;18(1):e0280112.
97. Waterhouse AM, Studer G, Robin X, Bienert S, Tauriello G, Schwede T. The structure assessment web server: For proteins, complexes and more. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(W1):W318-W323.
98. Wayman C, Duricki DA, Roy LA, Haenzi B, Tsai SY, Kartje G, Beech JS, Cash D, Moon L. Performing permanent distal middle cerebral with common carotid artery

- occlusion in aged rats to study cortical ischemia with sustained disability. *J Vis Exp.* 2016;2016(108):53106.
99. Winter M, Funk J, Körner A, Alberati D, Christen F, Schmitt G, Altmann B, Pospischil A, Singer T. Effects of GlyT1 inhibition on erythropoiesis and iron homeostasis in rats. *Exp Hematol.* 2016;44(10):964-974.e4.
100. Yelshanskaya MV, Mesbahi-Vasey S, Kurnikova MG, Sobolevsky AI. Role of the ion channel extracellular collar in AMPA receptor gating. *Sci Rep.* 2017;7(1):11-46.
101. Yuan C, Shi L, Sun Z, Xu F, Wang C, Shan J, Hitchens TK, Foley LM, Ye Q, Chen J, Sun D, Hu X. Regulatory T cell expansion promotes white matter repair after stroke. *Neurobiol Dis.* 2023;179:106063.
102. Zera KA, Buckwalter MS. The local and peripheral immune responses to stroke: Implications for therapeutic development. *Neurotherapeutics.* 2020;17:414-435.
103. Zhu M, Sun H, Cao L, Wu Z, Leng B, Bian J. Role of Na⁺/K⁺-ATPase in ischemic stroke: in-depth perspectives from physiology to pharmacology. *J Mol Med.* 2022;100(3):395-410.
104. Zipp GG, Barbosa J, Green MA, Terranova KM, Fink C, Yu XC, Nouraldeen A, Wilson A, Savelieva K, Lanthorn TH, Kimball SD. Novel inhibitors of the high-affinity l-proline transporter as potential therapeutic agents for the treatment of cognitive disorders. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(16):3886-3890.
105. Zubair AS, Sheth KN. Hemorrhagic Conversion of Acute Ischemic Stroke. *Neurotherapeutics.* 2023;20(3):705-11.

APÊNDICE A – COMISSÃO DE ÉTICA DE USO EM ANIMAIS

Título: Certificado CEUA



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **Investigação do potencial neuroprotetor de novos compostos em modelo animal de isquemia cerebral**, registrada com o protocolo nº **59/24**, sob a responsabilidade de **Mauro Cunha Xavier Pinto** e **Antonio Italo dos Santos Nunes** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica 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 24/09/2024.

- Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 01/11/2024 a 31/12/2030.
- Espécie/linhagem/raça: Camundongos das linhagens Swiss e C57BL/6.
- Nº de animais autorizados: 630 camundongos Swiss e 630 C57BL/6, totalizando 1260 animais.
- Peso/Idade: idade de 8 a 10 semanas e peso entre 30 e 50g, para ambas as linhagens.
- Sexo: machos.
- Instalação onde serão mantidos os animais: Biotério do Neurolab e/ou no biotério experimental dos Departamentos de Ciências Fisiológicas e Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, Biotério DCiF/DFAR.
- Origem (fornecedor): Biotério Central da UFG.

Documento assinado digitalmente
gov.br
ELIZABETH PEREIRA MENDES
Data: 30/09/2024 12:36:19-0300
verifique em <https://validar.itf.gov.br>

Dra. Elizabeth Pereira Mendes
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, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua@goiania.prpi@ufg.br