



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

**EFEITO NEURORREPARADOR DA SARCOSINA NO MODELO
DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

EDUARDO ROSA DA SILVA

Goiânia-GO
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

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

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

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

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

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

2. Nome completo do autor

Eduardo Rosa da Silva

3. Título do trabalho

Efeito neuroreparador da sarcosina no modelo de isquemia cerebral focal

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 19/07/2024, às 00:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Rosa Da Silva, Discente**, em 22/07/2024, às 13:20, 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 **4676637** e o código CRC **D77C98CF**.

EDUARDO ROSA DA SILVA

**EFEITO NEURORREPARADOR DA SARCOSINA NO MODELO
DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL**

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

Área de Concentração: Farmacologia

Goiânia-GO
2024

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

Silva, Eduardo Rosa
Efeito neuroreparador da sarcosina no modelo de isquemia cerebral focal. [manuscrito] / Eduardo Rosa Silva. - 2024.
LXIX, 69 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Goiânia, 2024.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, lista de figuras.

1. Acidente Vascular Encefálico. 2. Isquemia Cerebral. 3. MCAO. 4. Sarcosina. 5. Neuroreparo. I. Pinto, Mauro Cunha Xavier, orient. II. Título.

CDU 57



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

Ata nº 571 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Eduardo Rosa da Silva** o título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e oito dias do mês de junho de 2024, a partir das 13:30 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Análise do potencial neuroreparador da sarcosina no modelo de isquemia cerebral focal”. 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 Victor Diogenes Amaral da Silva (UFBA), membro titular externo; Professor Doutor Diego Basile Colugnati (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Mauro Cunha Xavier Pinto, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e oito dias do mês de junho de 2024.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Efeito neuroreparador da sarcosina no modelo de isquemia cerebral focal



Documento assinado eletronicamente por **Diego Basile Colugnati, Professor do Magistério Superior**, em 28/06/2024, às 16:22, 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 **Mauro Cunha Xavier Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 28/06/2024, às 16:22, 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 **Manoel Francisco Biancardi, Coordenador**, em 30/07/2024, às 14:43, 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 **4627474** e o código CRC **4D292BA4**.

Referência: Processo nº 23070.029843/2024-45

SEI nº 4627474

Dedicatória

À minha mãe, Maria Helena, e ao meu pai, Emílio Rosa, pela base sólida de amor e apoio que sempre me proporcionaram. À minha irmã, Emília Rosa, pela companhia constante e pelas palavras de encorajamento nos momentos difíceis. À memória da minha avó, Adolfina Maria de Jesus, cuja presença permanece viva em meu coração e cuja sabedoria continua a me guiar. E a todos os demais parentes que sempre me apoiaram, com gratidão e carinho.



"A educação e a pesquisa são pilares fundamentais que, ao longo do tempo, constroem uma base sólida de conhecimento, que possibilita a descoberta de fármacos e a busca de medicamentos eficazes para o tratamento de doenças, transformando a sociedade e impulsionando seu desenvolvimento rumo a um futuro de progresso sustentável."
(SILVA, E.R., 2024)

Agradecimentos

A realização deste mestrado foi um processo árduo e recompensador, que só foi possível graças ao apoio e à colaboração de muitas pessoas.

Primeiramente, gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha família, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. À minha mãe, Maria Helena da Silva, pelo amor incondicional e pelo apoio constante. Ao meu pai, Emilio Rosa da Silva, pelo exemplo de dedicação e perseverança. E à minha irmã, Emília Rosa da Silva, pela amizade e encorajamento.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto, cuja orientação, paciência e expertise foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua sabedoria e conselhos foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Aos órgãos que fomentaram esse projeto: CNPq, CAPES, FAPEMIG, FAPEG.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos, que tornaram essa jornada mais leve e prazerosa: Karina Meira, Natiele Ferreira, Johnathan Vieira, Jéssica Clementino, Ana Carla Vieira, Lívia Suziane, Raphaela Chiareli, Ítalo Nunes, Gustavo Almeida, Daniel Pereira, Raul Izidoro, Bruna Campos, Amanda Rodrigues, Juliana dos Santos, Maria Luiza, João Elias Pinheiro, Rafaella Rosa, Geovane Ortiz, Laiz Victoria, Paul Tambwe, Lucas Rodrigues, Camilly Carmo, Maynara Souza, Raphaela Barbosa, Bruna Mayara, Marcos Ferreira, Hanniely Thaiis, Juliana Vila Verde...

Cada um de vocês contribuiu de maneira especial, seja com palavras de incentivo, momentos de descontração ou colaboração direta. A todos vocês, meu sincero e profundo agradecimento. Este mestrado não seria possível sem o apoio de cada um de vocês.

SUMÁRIO

1. Justificativa	9
1.1. O impacto da pesquisa científica e a sua relevância para a sociedade	9
2. Introdução	10
2.1 Acidente Vascular Encefálico (AVE)	10
2.2 Isquemia Cerebral e a excitotoxicidade	12
2.3. Mecanismos de neuroproteção e neuroreparo	13
2.4. Transportadores de glicina do tipo 1 (SLC6A9)	14
2.5. Sarcosina e os transportadores de glicina do tipo 1 (SLC6A9)	16
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. Materiais e métodos	17
4.1 Reagentes	17
4.2 Animais	18
4.3.1. Método de exclusão	19
4.4. Delineamento experimental	20
4.5. Teste comportamental para avaliar o dano motor em animais isquêmicos	23
4.5.1. Teste do Cilindro	23
4.5.2. Teste para avaliação do <i>score</i> neurológico (<i>Limb Clasp</i>)	24
4.5.3. Teste comportamental campo aberto (<i>Open Field</i>)	26
4.6. Teste comportamental para avaliar o dano cognitivo em animais isquêmicos	27
4.6.1. Teste de Localização de objetos (OLT)	27
4.6.2. Teste de reconhecimento de objeto novo (NORT)	28
4.7. Análise de histoquímica	30
4.7.1 Análise morfológica com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC)	30
4.8. Análise molecular	31
4.8.1 Análise de <i>Western Blotting</i>	31
4.9. Análise de estatística	32
5.0. Resultados	33
5.1. Tratamento com Sarcosina diminui o tamanho da área isquêmica.	33

5.2. Tratamento crônico com Sarcosina previne prejuízo neurológico em camundongos submetidos ao modelo de MCAO	35
5.3. O tratamento crônico com sarcosina previne o déficit cognitivo em camundongos submetidos ao modelo de MCAO	38
6. Análise molecular por <i>Western Blotting</i>	41
6.1. Avaliação de proteínas associadas aos transportadores de glicina (Glyt1 e Glyt2), e aos receptores de glicina (GlyR).	41
6.2. Avaliação das subunidades do receptor N-metil-D-aspartato: GluN1, GluN2A e GluN2B	43
6.3. O tratamento crônico com sarcosina modula a via de CaMKII/CaMK IV/CREB em camundongos submetidos ao modelo de MCAO	44
6.4. O tratamento crônico com Sarcosina aumenta a expressão de BDNF em camundongos submetidos ao modelo de MCAO	45
7. Discussão	46
8. Conclusão	51
9. Anexos	52
10. Referências	53

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACC - Artéria carótida comum

ACM - Artéria cerebral média

AMPA- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato

AVC - Acidente Vascular Cerebral

AVE - Acidente Vascular Encefálico

AVEH- Acidente vascular encefálico hemorrágico

AVEI- Acidente vascular encefálico isquêmico

BDNF-Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

Ca⁺² – Calcio catiônico

CaMK IV- Calmodulina quinase IV

CaMKII- Calmodulina quinase II

CAT- Catalase

CREB- Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico

DCiF/DFAR - Departamentos de Ciências Fisiológicas e Departamento de Farmacologia

FDA- Food and Drugs Administration

GluN1- Subunidade 1 do receptor de Glutamato tipo NMDA

GluN2A- Subunidade 2A do receptor de Glutamato tipo NMDA

GluN2B- Subunidade 2B do receptor de Glutamato tipo NMDA

GLYR- Receptor de Glicina

GLYT- Transportador de Glicina

GLYT1- Transportador de Glicina tipo 1

GLYT2- Transportador de Glicina tipo 2

GPX- Glutationa peroxidase

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

IP - Intraperitoneal

K⁺ - Potássio catiônico

MCAO - Oclusão de artéria cerebral média

Na⁺ -Sódio catiônico

NADPH- Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Hidreto.

NMDA - N-Metil-D-Aspartato

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NORT- Teste reconhecimento de objeto novo

O₂ - ânion superóxido

OLT -Teste de localização do objeto

PBS- Solução salina tamponada com fosfato

rTPA - Ativador de Plasminogênio Tecidual Recombinante

SNC - Sistema Nervoso Central

TRKB- Tirosina quinase receptor B

TTC - Cloreto de 2-3-5-trifeniltetrazólio

UTI - unidade de terapia intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesão cerebral pós-isquemia.	10
Figura 2. Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para obstrução permanente da artéria cerebral média (MCAO) em roedores.	19
Figura 3. Desenho representativo dos grupos amostrais.	20
Figura 4. Desenho experimental do experimento de 5 dias.	21
Figura 5. Desenho experimental para o experimento de 28 dias.	22
Figura 6. Imagem representativa para o teste do cilindro.	24
Figura 7. Imagem representativa para o teste comportamental (<i>Limb Clasp</i> ing).	25
Figura 8. Imagem representativa para o teste de campo aberto (<i>Open Field</i>).	27
Figura 9. Imagem representativa para o teste comportamental (OLT).	28
Figura 10. Imagem representativa para o teste comportamental (NORT).	29
Figura 11. Imagem representativa para análise histoquímica.	30
Figura 12. Imagem representativa para Histoquímica realizada após 5 dias.	33
Figura 13. Imagem representativa para <i>Limb Clasp</i> ing-5 dias.	35
Figura 14. Imagem representativa para os testes <i>Limb Clasp</i> ing-28 dias.	36
Figura 15. Gráfico representativo para o teste do cilindro-28 dias.	38
Figura 16. Teste de comportamento de campo aberto (<i>Open Field</i>).	39
Figura 17. Teste de Localização de objetos (OLT).	40
Figura 18. Teste de reconhecimento de objeto novo (NORT).	41
Figura 19. Imagem ilustrativa para análise de western blotting, GlyR/Glyt1/Glyt2.	42
Figura 20. Gráfico para avaliação de proteínas GluN1/GluN2A/GluN2B.	43
Figura 21. Gráfico para expressão das proteínas CaMK II/CaMK IV/CREB.	44
Figura 22. Gráfico representativo da expressão de proteínas BDNF/TRKB.	46

RESUMO

Anualmente, aproximadamente 17 milhões de indivíduos em todo o globo são acometidos por Acidente Vascular Encefálico (AVE), condição que pode resultar em sequelas neurológicas permanentes ou mesmo óbito. A isquemia cerebral, principal causa desses eventos, é caracterizada pela redução do fluxo sanguíneo cerebral, que pode ocorrer de maneira localizada ou generalizada. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito neuroprotetor e neuroreparador da sarcosina, investigando a sua influência na regeneração neuronal em modelos animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média (MCAO). Para tal, os animais foram submetidos a tratamento intraperitoneal com sarcosina nas dosagens de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg durante um período de 28 dias após a indução do modelo MCAO. A avaliação motora foi realizada através dos testes comportamentais *Limb Clasp* e Cilindro, nos dias 7, 14 e 28 pós-indução. Adicionalmente, os testes de memória *Object Location Task* (OLT) e *Novel Object Recognition Test* (NORT) foram conduzidos no 28º dia. Realizamos a análise molecular utilizando a técnica de Western Blotting para avaliar o nível de expressão relacionadas ao transportador de glicina (GlyR), aos transportadores de glicina (Glyt1 e Glyt2). As subunidades relacionadas ao receptor NMDA (GluN1, GluN2A e GluN2B). Proteínas associadas a vias de sobrevivência celular (CaMKII, CaMK IV, CREB), proteínas associadas ao fator neurotrófico derivado do cérebro BDNF e TrKb. Os resultados demonstraram que a sarcosina melhora o déficit motor e cognitivo em animais submetidos a isquemia. Conclui-se que o tratamento com sarcosina exibe um potencial neuroprotetor promissor no contexto do acidente vascular cerebral isquêmico induzido em modelo animal.

Palavra-chave: Acidente Vascular Encefálico; Isquemia Cerebral; MCAO; Sarcosina; Neuroreparo.

ABSTRACT

Annually, approximately 17 million individuals worldwide suffer from a Stroke (Cerebrovascular Accident), a condition that can result in permanent neurological sequelae or even death. Cerebral ischemia, the primary cause of these events, is characterized by a reduction in cerebral blood flow, which can occur in a localized or generalized manner. In this context, the present study aimed to evaluate the neuroprotective and neuroreparative effects of sarcosine by investigating its influence on neuronal regeneration in animal models subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO). For this purpose, the animals received intraperitoneal treatment with sarcosine at doses of 125 mg/kg, 250 mg/kg, and 500 mg/kg over a period of 28 days following the induction of the MCAO model. Motor evaluation was conducted through the Limb Clasp and Cylinder behavioral tests on days 7, 14, and 28 post-inductions. Additionally, the *Object Location Task* (OLT) and *Novel Object Recognition Test* (NORT) memory tests were conducted on the 28th day. We performed molecular analysis using the Western Blotting technique to assess the expression levels related to the glycine transporter (GlyR), glycine transporters (Glyt1 and Glyt2), NMDA receptor subunits (GluN1, GluN2A, and GluN2B), proteins associated with cell survival pathways (CaMK II, CaMK IV, CREB), proteins associated with brain-derived neurotrophic factor BDNF, and TrKb. The results demonstrated that sarcosine improves motor and cognitive deficits in animals subjected to ischemia. It is concluded that sarcosine treatment shows promising neuroprotective potential in the context of ischemic stroke induced in an animal model.

Keywords: Stroke; Cerebral Ischemia; MCAO; Sarcosine; Neurorepair.

1. Justificativa

1.1. O impacto da pesquisa científica e a sua relevância para a sociedade

O Acidente Vascular Cerebral (AVC), também conhecido como Acidente Vascular Encefálico (AVE) ou popularmente chamado de derrame, é uma condição grave. Globalmente, um terço dos casos resulta em óbito, enquanto os demais levam a incapacidades permanentes, como demência vascular e dificuldades motoras relacionadas à marcha e ao controle preciso dos movimentos (1-2). O AVE ocupa a segunda posição entre as principais causas de morte no Brasil, sendo superado apenas pelos óbitos relacionados a doenças cardíacas isquêmicas (3).

Muitos casos de AVE poderiam ser evitados com medidas preventivas simples, que vão desde o controle da dieta até a realização de exercícios físicos. Dados recentes mostram que as mortes ocasionadas por AVE têm aumentado nos últimos anos conforme dados oficiais do DATASUS (4-5), o que destaca a importância de continuar investindo em saúde e prevenção.

Uma das consequências do acidente vascular encefálico é um fenômeno chamado excitotoxicidade. Neste processo, certos neurônios no cérebro ficam hiperativos e acabam se danificando ou morrendo. Isso acontece principalmente por uma superprodução de glutamato, um tipo de neurotransmissor. Embora o glutamato seja essencial para o funcionamento normal do cérebro, em excesso ele pode ser prejudicial.

Por isso, pesquisar novos medicamentos que possam reduzir esse excesso de glutamato é importante. Essas pesquisas podem levar ao desenvolvimento de tratamentos que protejam os neurônios durante um AVE, aumentando as chances de recuperação e reduzindo as sequelas.

2. Introdução

2.1 Acidente Vascular Encefálico (AVE)

O Acidente Vascular Encefálico (AVE), manifesta-se através de sinais clínicos, radiológicos ou patológicos que denotam episódios de isquemia ou hemorragia, impactando diretamente os territórios vasculares no cérebro (6). Essa condição médica grave é classificada em duas categorias principais, com características e implicações clínicas distintas: o acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI) e o acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH).

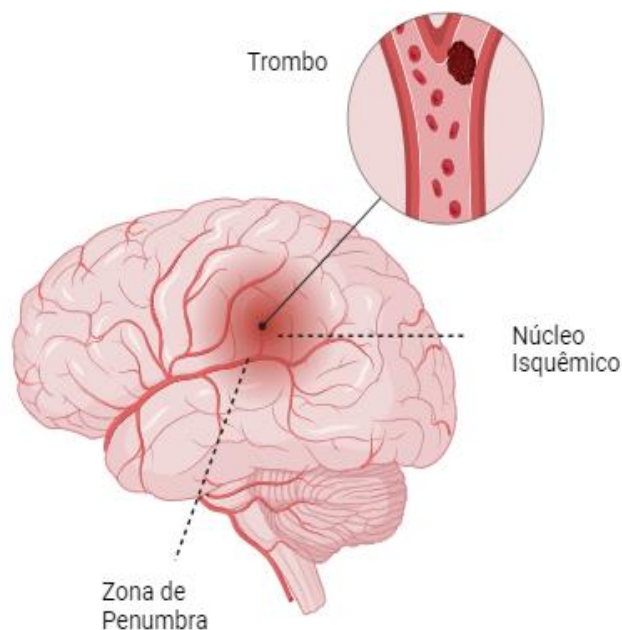


Figura 1. Lesão cerebral pós-isquemia. Representação do cérebro com áreas destacadas indicando o núcleo isquêmico e a zona de penumbra, caracterizando o acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI). A região sombreada em vermelho representa a isquemia resultante da insuficiência no fornecimento de oxigênio ao cérebro. O controle do fluxo sanguíneo cerebral é mantido pelas carótidas internas e pela artéria cerebral média, que compõem o círculo de Willis. Fonte: Silva. E.R., 2024 (Biorender e Canvas).

No tratamento emergencial do AVEI, a prioridade terapêutica concentra-se na rápida restauração do fluxo sanguíneo cerebral. O manejo imediato preconiza a administração do Ativador do Plasminogênio Tecidual Recombinante (rt-PA) um agente trombolítico, única terapia aprovada pela FDA para o tratamento do acidente vascular cerebral isquêmico até então (7). O paciente que sofre um AVE deve receber este tratamento dentro da janela de tempo de 4 a 5 horas após o início dos sintomas (8-9).

Este tratamento visa dissolver o trombo oclusivo, restabelecendo a perfusão e minimizando a extensão da lesão cerebral. Em paralelo, medidas de suporte são implementadas, incluindo a otimização da oxigenação e da pressão arterial, mantendo-as dentro de parâmetros ideais para favorecer a perfusão cerebral e limitar o risco de transformação hemorrágica. Nos cenários onde os medicamentos trombolíticos não são viáveis ou ineficazes, procedimentos de trombectomia mecânica podem ser realizados, onde dispositivos especiais são utilizados para remover fisicamente o coágulo das artérias cerebrais (10). A realização da trombectomia mecânica é viável em pacientes com lesões de grandes vasos e que também estejam dentro da janela do início dos sintomas menor que 8 horas ou entre 8 e 24 horas (9).

A abordagem terapêutica para o tratamento de emergência do AVEH requer uma resposta rápida e coordenada que enfatize a estabilização hemodinâmica do paciente e a gestão da pressão intracraniana (11). O manejo inicial envolve o monitoramento intensivo em uma unidade de terapia intensiva (UTI) com controle rigoroso da pressão arterial, visando reduzir o risco de expansão do hematoma. Agentes anti-hipertensivos são frequentemente utilizados para manter a pressão arterial em parâmetros estritos conforme as diretrizes atuais (12).

A reversão de anticoagulantes é outra etapa crítica para pacientes sob tais medicações, utilizando agentes específicos para antagonizar seus efeitos. Em casos selecionados, a intervenção neurocirúrgica, como a evacuação do hematoma ou a colocação de um dreno ventricular, pode ser necessária para aliviar a pressão e prevenir o comprometimento de estruturas vitais do cérebro (13-14).

Além disso, a investigação e o manejo de possíveis causas subjacentes, como aneurismas ou malformações arteriovenosas, são fundamentais para o tratamento definitivo e a prevenção de recorrências. A abordagem é complexa, envolvendo a neurologia, neurocirurgia, terapia intensiva e, quando aplicável, a intervenção, todas operando em conjunto para otimizar o prognóstico do paciente (15).

Ainda que os trombolíticos sejam amplamente utilizados em todo o mundo, é bom considerar que ele causa efeitos colaterais, incluindo estreitamento da janela de tempo de tratamento, hemorragias intracranianas e neurotoxicidade. Portanto, existe uma necessidade urgente de estabelecer uma nova estratégia para o tratamento de pacientes com AVEI (16).

2.2 Isquemia Cerebral e a excitotoxicidade

Para encontrar substâncias que protegem o cérebro, é preciso entender bem como ocorre o problema no AVEI. Nesse tipo de acidente, a falta de sangue causa deficiência de glicose e oxigênio, resultando em pouca produção de uma substância chamada adenosina trifosfato (ATP), o que afeta o equilíbrio das células (17). Como estratégia final para prevenir a morte celular, as células que estão na área isquêmica começam a iniciar o processo de glicólise anaeróbica. Entretanto, esta fonte energética obtida através da via anaeróbica oferece pequena quantidade de energia para manter a sobrevivência neuronal. Dessa forma, a gravidade da lesão cerebral depende do tempo de duração e da extensão da localização do AVE (18-19).

Caso haja um o restabelecimento abrupto do fluxo sanguíneo, a taxa metabólica aumenta rapidamente, o que gera um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 , OH^- , NO) e contribui significativamente para a lesão cerebral causada pela isquemia (20). O ânion superóxido (O_2^-) é um produto derivado de várias reações que envolvem enzimas como NADPH oxidase, monooxigenases e NADH desidrogenase. O O_2^- é prejudicial para a célula, sendo rapidamente eliminado pela enzima superóxido dismutase, que converte duas moléculas de O_2^- em uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e uma de oxigênio (O_2).

Por sua vez, H_2O_2 também oferece risco oxidativo à célula, sendo os níveis celulares de H_2O_2 controlados pela catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX), que convertem duas moléculas de H_2O_2 em uma molécula de H_2O e uma de O_2 . Além disso, a ativação dos receptores de NMDA induz a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). O NO reage com O_2 para produzir espécies de azoto reativos tais como o peroxinitrito que podem danificar uma grande variedade de moléculas nas células (21).

O bloqueio do suprimento de oxigênio e glicose para o cérebro causa a interrupção do metabolismo energético da célula, com uma queda abrupta da produção de ATP e comprometimento das bombas iônicas que mantém o equilíbrio osmótico da membrana plasmática (19). Consequentemente, isso gera um aumento da concentração de íons como Ca^{+2} e Na^+ no meio intracelular e K^+ no meio extracelular, que causa edema e perda de função nas células (18-19). Além disso, o aumento do influxo de Ca^{+2} causa a liberação descontrolada de neurotransmissores e desencadeia a morte de células adjacentes por excitotoxicidade (19-22).

2.3. Mecanismos de neuroproteção e neuroreparo

Neuroproteção e neuroreparo são dois conceitos distintos na farmacologia que se referem a diferentes estratégias para lidar com lesões no sistema nervoso. Enquanto a neuroproteção visa prevenir, impedir ou minimizar os danos de um potencial lesão a células nervosas, o neuroreparo tem como objetivo recuperar a estrutura e a função do sistema nervoso após o dano já ter ocorrido (23). Ambas as abordagens são essenciais no tratamento de doenças neurológicas e na recuperação de pacientes.

Neuroproteção é o conjunto de estratégias e intervenções destinadas a preservar o tecido neural, prevenindo a morte de neurônios e outras células do sistema nervoso após um evento lesivo, como um Acidente Vascular Encefálico (AVE) ou trauma. O objetivo é proteger as células nervosas dos processos patológicos que ocorrem após uma lesão, como a excitotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo, a fim de minimizar o dano e preservar a função neurológica (24-25).

A neuroproteção frequentemente envolve a modulação da neurotransmissão excitatória, particularmente a inibição do excesso de glutamato e a super ativação de seus receptores, como os receptores NMDA, para prevenir a entrada excessiva de cálcio na célula, o que pode levar à morte celular. Moléculas antioxidantes também são utilizadas para neutralizar radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio que podem danificar componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA (16-26). Processo de neuromodulação que levam a estabilização da membrana celular também ajudam na preservação da integridade das membranas neuronais e é essencial para prevenir o dano neuronal, podendo ser alcançada através da regulação de canais iônicos, transportadores e receptores, que atuam na manutenção do potencial de membrana (27).

O neuroreparo, por outro lado, refere-se aos processos e intervenções que promovem a recuperação após uma lesão no sistema nervoso. Estas estratégias focam na regeneração ou reparação do tecido neural danificado, incluindo o crescimento de novos neurônios (neurogênese), a formação de novas sinapses (sinaptogênese), a remielinização dos axônios e a reorganização funcional do cérebro. O neuroreparo busca restaurar, tanto quanto possível, a função perdida devido à lesão (16-24-28).

Com relação aos mecanismos associados ao neuroreparo, inicialmente temos a neurogênese. O crescimento de novos neurônios a partir de células-tronco neurais é um aspecto do neuroreparo, particularmente em áreas do cérebro como o hipocampo. Além disso, a formação de novas sinapses entre neurônios, também conhecida como sinaptogênese, é

necessária para a recuperação funcional e para a reorganização do cérebro após uma lesão. Por fim, o processo de remielinização ajuda na formação de nova mielina em torno de axônios desmielinizados e pode restaurar a condução de impulsos nervosos (28-29-30-31).

Tanto na neuroproteção quanto no neuroreparo, fatores de crescimento como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) desempenham papéis essenciais, promovendo a sobrevivência e o crescimento de neurônios, bem como a formação de novas conexões (32).

Eles estimulam a capacidade do cérebro de se reorganizar, formando novas conexões neurais para compensar o dano ou a mudanças na rede neural (33). Além disto, a regulação das vias inflamatórias também pode contribuir para os processos de neuroproteção ou neuroreparo, pois agentes anti-inflamatórios podem reduzir a resposta inflamatória no cérebro, limitando o dano a tecidos adjacentes e agentes imunossupressores reduzem o dano exacerbado por processos inflamatório (34-35-36).

Em suma, neuroproteção e neuroreparo representam abordagens complementares e igualmente vitais na esfera da neurociência clínica. A neuroproteção atua como uma linha de defesa inicial, almejando preservar a integridade neuronal através da modulação de vias excitatórias, neutralização de estresse oxidativo e mitigação da inflamação. Tais medidas de proteção são essenciais para manter a homeostase neural e prevenir a morte celular subsequente a insultos agudos.

2.4. Transportadores de glicina do tipo 1 (SLC6A9)

Os transportadores de glicina do tipo 1 (SLC6A9), também conhecidos como GlyT1, pertencem à família de transportadores de soluto 6 (SLC6). Esses transportadores são responsáveis pela recaptação de glicina no sistema nervoso central. Esses transportadores são dependentes do gradiente de sódio (Na⁺) e cloreto (Cl⁻) e desempenham um papel essencial na terminação da neurotransmissão nas sinapses glicinérgicas (37).

Apesar de a maioria dos transportadores de glicina do tipo 1 (GlyT1) serem expressos predominantemente nos astrócitos, também podem ser encontrados nos neurônios, particularmente nas terminações nervosas pré-sinápticas dos neurônios glutamatérgicos. No tecido cerebral, a expressão do GlyT1 está principalmente relacionada à neurotransmissão glutamatérgica, sendo abundante no córtex, tálamo e hipocampo (37-38).

A glicina é um aminoácido que desempenha múltiplas funções importantes no sistema nervoso central. Ela atua tanto como neurotransmissor inibitório e como co-agonista excitatório

do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), (39-40). No SNC, a glicina é essencial para a neurotransmissão inibitória através da ativação de receptores ionotrópicos específicos permeáveis ao cloreto, contribuindo para a regulação do tônus muscular e na modulação da excitabilidade neuronal (37).

Além disso, a glicina desempenha um papel na modulação da excitação neuronal como co-agonista dos receptores NMDA. Nesse processo, colabora com o glutamato para facilitar a transmissão da excitação neuronal (41). A glicina desempenha um papel importante no sistema nervoso central porque regula o desenvolvimento neuronal e tem a capacidade de proteger os neurônios contra doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (40-42). Assim, a glicina desempenha duas funções importantes, impactando os processos cerebrais excitatórios e inibitórios.

A recaptação da glicina da fenda sináptica é a principal função do GlyT1, isso mantém a concentração deste aminoácido em níveis adequados para a correta sinalização neuronal adequada. A glicina atua como um coagonista dos receptores NMDA, que são importantes para neurotransmissão excitatória. Como resultado, a inibição do GlyT1 tem o potencial para modular a neurotransmissão glutamatérgica, oferecendo potenciais estratégias terapêuticas para condições como esquizofrenia e outras doenças neurodegenerativas (37-40).

A ligação da glicina às subunidades NR1 e NR2A do receptor NMDA é o processo pelo qual a glicina ativa o receptor NMDA. A subunidade NR1 contém o local de ligação para a glicina, enquanto o glutamato se liga à subunidade NR2 (41). Esse processo é essencial para a plasticidade sináptica e a modulação da memória, mediando fenômenos como a potencialização de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD). A LTP é um aumento duradouro na eficácia da sinapse, essencial para processos de aprendizagem e memória. Por outro lado, a LTD é uma redução prolongada na eficácia sináptica, desempenhando um papel importante na eliminação de conexões sinápticas redundantes e na modulação da plasticidade neuronal (43).

Os transportadores de glicina tipo 1 (GlyT1) e tipo 2 (GlyT2) regulam a concentração de glicina na sinapse, modulando a neurotransmissão excitatória. GlyT1 é expresso principalmente em astrócitos, onde ajuda a manter baixos níveis de glicina extracelular para regular a ativação do receptor NMDA e prevenir a excitotoxicidade. GlyT2 é expresso nos terminais nervosos glicinérgicos e gabaérgicos, onde recaptura a glicina para reciclagem e reutilização (42-43). Dessa forma, os transportadores de glicina influenciam diretamente os processos de LTP e LTD, contribuindo para a modulação da memória e da aprendizagem (40).

2.5. Sarcosina e os transportadores de glicina do tipo 1 (SLC6A9)

A sarcosina é um aminoácido que atua como um inibidor dos transportadores de glicina do tipo 1 (Glyt1), desta maneira, aumentando a concentração da glicina na fenda sináptica. A glicina é um co-agonista do receptor de NMDA, portanto, possui a capacidade de modular a neurotransmissão glutamatérgica. O aumento da concentração de glicina na fenda sináptica pode potencializar a neurotransmissão glutamatérgica, sem necessariamente levar ao processo de excitotoxicidade (44-45).

Este aminoácido demonstra ter grande potencial para o tratamento de lesões e doenças cerebrais como. Estudos pré-clínicos demonstraram que o pré-tratamento com sarcosina promove um efeito neuroprotetor em diferentes modelos de isquemia cerebral, induzindo tolerância através da modulação da neurotransmissão glutamatérgica e redução da produção de espécies reativas de oxigênio no hipocampo de rato (46-47). Além disso, a sarcosina atua como um co-agonista do receptor NMDA, diferenciando-se da glicina por causar menos dessensibilização do receptor, resultando em um aumento maior de Ca^{2+} intracelular e correntes de K^{+} ativadas por Ca^{2+} (48).

Pinto, *et al.* demonstrou em 2015 que o pré-tratamento com NFPS, um outro composto inibidor dos transportadores de glicina do tipo 1, também é capaz de proteger o cérebro contra insultos excitotóxicos através da redução da expressão de receptores de NMDA do tipo GluN2. A bitopertina, também é um inibidor seletivo do transportador de glicina tipo 1, que mostrou potencial na melhora do modelo de esquizofrenia. Levando assim a uma redução dos sintomas negativos da doença (49-50).

A sarcosina está presente em diversas partes do corpo, sendo encontrada no cérebro, onde exerce suas funções moduladoras, e está envolvida no metabolismo de aminoácidos em outros tecidos (51). Os inibidores de GlyT1, como a sarcosina, o NFPS e a bitopertina, possuem aspectos farmacológicos promissores. Além disso, esses inibidores têm sido estudados no tratamento de sintomas negativos de doenças neurodegenerativas como o acidente vascular encefálico (49-50-52).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Analisar o potencial neuroreparador da sarcosina após a indução do modelo murino de isquemia cerebral induzido pela oclusão da artéria cerebral média (MCAO).

3.2. Objetivos específicos

1. Analisar o efeito do tratamento com sarcosina no déficit motor em animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral (MCAO).
2. Avaliar o efeito do tratamento com sarcosina nos déficits de memória em animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral (MCAO).
3. Investigar o efeito do composto sarcosina na regeneração neuronal em animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral.
4. Avaliar o impacto do tratamento com sarcosina na expressão dos transportadores de glicina e receptores NMDA.

4. Materiais e métodos

4.1 Reagentes

No presente estudo, foram utilizados os seguintes compostos: Sarcosina (Sigma Aldrich). Para avaliação histoquímica foi utilizado Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio Sigma Aldrich (EUA). Para a anestesia e analgesia durante o procedimento cirúrgico foram administrados: Ketamina (Dopalen), Xilasina (Anasedan) e Acepromazina (Acepran 1%). Anticorpos primário utilizados na técnica de *Western Blotting*: Beta-Actina Sigma-Aldrich(1:2000), GlyR Santa Cruz (1:1000), Glyt1 Thermo Fisher (1:1000), Glyt2 Santa Cruz (1:1000), NR1 Santa Cruz (1000), NR2A Santa Cruz (1:1000), NR2B Santa Cruz (1:1000), pCREB Santa Cruz (1:1000), CREB Santa Cruz (1:1000), BDNF Thermo Fisher (1:1000), TrKb Sigma-Aldrich(1:1000), CamK IV Santa Cruz (1:1000), CaMKII Santa Cruz (1:1000).

Anticorpos secundários: Goat anti Rabbit Thermo Fisher (1:3000), Anti Rabbit IgG CF 568 Sigma-Aldrich (1:3000), Anti Mouse IgG CF 488A Sigma-Aldrich (1:3000).

4.2 Animais

Os animais que foram utilizados para os procedimentos experimentais foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Goiás-UFG. Esses animais foram aclimatados no biotério do laboratório Neurolab. Para a avaliação do efeito neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral, foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, machos, com peso entre 40 e 50 gramas. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (Protocolos CEUA/UFG nº 041/19 e nº049/23).

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

A oclusão permanente da artéria cerebral média foi realizada conforme metodologia descrita por Chiang (53). Camundongos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal com uma solução contendo 10 mg/kg de Xilazina e 100 mg/kg de Quetamina, na proporção de 100 mg da solução anestésica para cada 10 g de peso corporal. Seguiu-se uma tricotomia para remover os pelos nas áreas das incisões planejadas. Realizou-se uma incisão de aproximadamente 2 cm ao longo da linha média do pescoço com um bisturi, expondo a artéria carótida comum (ACC) e o nervo vago, após afastamento delicado das glândulas salivares com fórceps.

A ACC foi cuidadosamente dissecada do nervo vago usando fórceps finos e ocluída com um monofilamento. A incisão foi suturada meticulosamente com pontos não contínuos. Subsequentemente, a cabeça dos animais foi posicionada para expor o hemisfério contralateral, realizando-se uma incisão de 1 cm entre o seio retro orbital e o canal auditivo externo para acessar o músculo temporal.

Após a dissecação cuidadosa do músculo, expôs-se o crânio e a artéria cerebral média subjacente. A craniotomia foi executada na área exposta utilizando uma broca odontológica com revestimento de 1,6 mm a aproximadamente 8.000 rpm, até que o osso se tornasse suficientemente fino para visualização translúcida. A artéria cerebral média foi então permanentemente ocluída utilizando um cauterizador de 3W (Cautermax®).

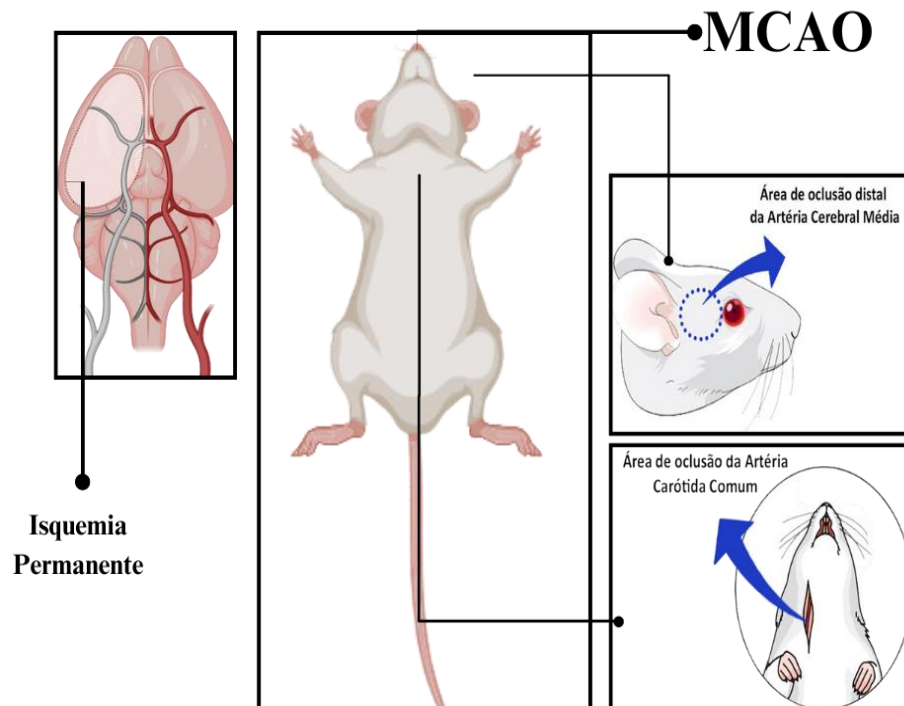


Figura 2. Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para obstrução permanente da artéria cerebral média (MCAO) em roedores. O processo de indução do modelo isquêmico envolve a realização de uma incisão, seguida pela obstrução da artéria carótida comum e cauterização da artéria cerebral média durante o procedimento de craniotomia. Silva. E.R., 2024 (*Biorender e Canvas*).

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em recuperação a uma temperatura ambiente controlada de 25 a 27 °C, sendo monitorados rigorosamente em três períodos diários. Este protocolo de monitoramento foi importante para assegurar o bem-estar dos animais, permitindo a detecção e intervenção imediata em caso de qualquer desconforto ou complicação surgida. O rigoroso acompanhamento também garantiu a aderência aos padrões éticos e regulamentações de pesquisa animal.

4.3.1. Método de exclusão

Os critérios de exclusão incluíram animais que não sobreviveram à indução do modelo de MCAO ou que apresentaram complicações significativas durante o período de observação. Com base na literatura e nos protocolos estabelecidos, determinamos que o número estatisticamente aceitável para a avaliação da área de infarto e teste comportamental é de 8 animais por grupo.

Durante os experimentos os percentuais de perda foram calculados com base nos grupos amostrais iniciais: SHAM (n=10), MCAO+VEÍCULO (n=10), MCAO+125 mg/kg (n=10), MCAO+250 mg/kg (n=10) e MCAO+500 mg/kg (n=10). Assim, a perda percentual de animais no decorrer dos experimentos variou entre 10% e 20%. A amostra final entre os grupos apresentou números adequados para garantir a validade estatística das análises.

4.4. Delineamento experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais distintos. O Grupo SHAM consistiu em animais submetidos ao procedimento cirúrgico, porém sem a indução de isquemia, recebendo tratamento com solução salina a 0,9%. No segundo grupo, denominado VEÍCULO, os animais foram submetidos à cirurgia e à indução do estado isquêmico por meio do modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO), sendo igualmente tratados com solução salina a 0,9%. Os grupos restantes foram tratados com diferentes dosagens de sarcosina após a indução do estado isquêmico por MCAO. Esses grupos foram designados como MCAO + 125 mg/kg de sarcosina, MCAO + 250 mg/kg de sarcosina e MCAO + 500 mg/kg de sarcosina, respectivamente.

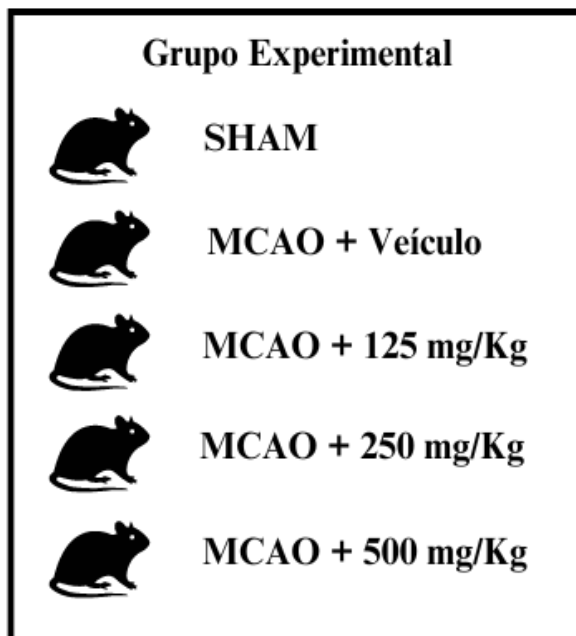


Figura 3. Desenho representativo dos grupos amostrais. Fonte: Silva. E.R., 2024 (Canvas).

Foi realizado um experimento de 5 dias para avaliação histoquímica com o composto Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). No dia 0, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico e separados nos grupos experimentais. A partir do dia 1, os animais iniciaram o tratamento com sarcosina em suas respectivas doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500mg/kg, ou com solução salina em uma concentração de 0,9% nos respectivos grupos SHAM e MCAO.

No dia 5, todos os animais passaram por testes comportamentais, especificamente o teste de *Limb Clasp* e o teste do Cilindro, para coletar dados sobre a condição motora dos animais. No dia 6, todos os animais foram eutanasiados conforme as especificações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), e foi realizada a coleta do material biológico para realização da histoquímica.

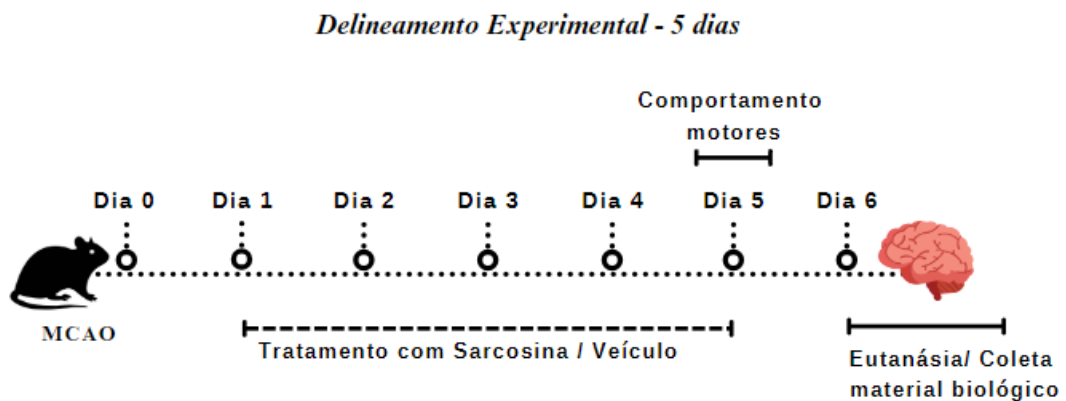


Figura 4. Desenho experimental do experimento de 5 dias. Cronograma do experimento de 5 dias, no dia 0, realização da cirurgia de MCAO. Realização do tratamento do dia 1 até o dia 5 com coleta de dados comportamentais. Coleta do material biológico no dia 6. Fonte: Silva. E.R., 2024 (Canvas).

O segundo delineamento experimental corresponde ao segundo experimento, realizado de forma crônica, para coleta de dados comportamentais e análise de *Western Blotting* do processo isquêmico. A avaliação deste segundo experimento consistiu no acompanhamento dos animais com isquemia por 28 dias. O desenho experimental seguiu as seguintes etapas: No dia 0, todos os animais foram submetidos ao processo cirúrgico.

Os animais dos grupos MCAO + VEÍCULO, MCAO + 125mg/kg, MCAO + 250mg/kg e MCAO + 500mg/kg foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da isquemia cerebral, enquanto os animais do grupo SHAM passaram pelo procedimento cirúrgico apenas para simular o estresse do processo, sem indução da isquemia. Eles foram então distribuídos nos respectivos grupos amostrais.

O tratamento foi iniciado no dia 1, sendo que todos os animais receberam tratamento por meio de injeção intraperitoneal com o composto designado para o seu respectivo grupo de tratamento até o dia 28. Para avaliar o quadro clínico dos animais, além do acompanhamento do pesquisador, foram realizados testes comportamentais para avaliar o dano motor que pode acometer os animais após o processo isquêmico.

Para avaliação motora, utilizaram-se os testes (*Limb Clasp*ing, Cilindro), e as coletas de dados ocorreram nos dias 7, 14 e 28. Para avaliar o comprometimento cognitivo ocasionado pelo processo isquêmico e avaliar o quadro clínico posterior ao tratamento, foram realizados testes comportamentais como o Teste de Campo Aberto, também conhecido como *Open Field* (OF), no dia 26, o Teste de Localização de Objetos (OLT) no dia 27 e o teste de reconhecimento de objeto novo (NORT) no dia 28.

No dia 29, todos os animais foram submetidos à eutanásia seguindo as diretrizes conforme a resolução normativa do CONCEA nº 37 de 15 de março de 2018 (54). O método de eutanásia escolhido levou em consideração também a necessidade requerida da técnica e precisão de conservação de metabólicos, os materiais biológicos foram coletados para realização de técnicas histológicas, imunológicas e moleculares.

Delineamento Experimental - 28 dias

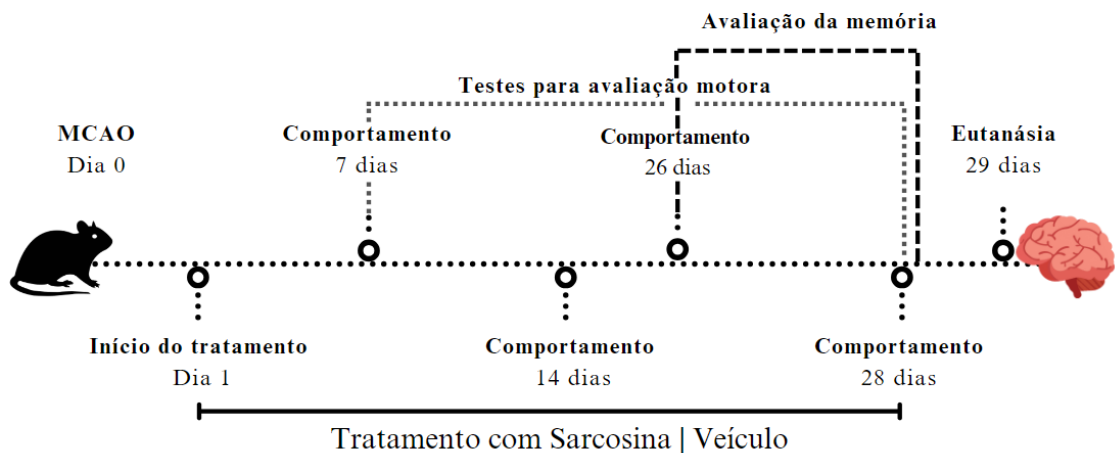


Figura 5. Desenho experimental para o experimento de 28 dias. Realização da cirurgia de MCAO no dia 0, início do tratamento com sarcosina iniciando no dia 1 até o dia 28. Coleta de dados para avaliação motora em 3 respectivos tempos (dia 7, dia 14 e dia 28). Testes comportamentais de memórias realizados do dia 26 até o dia 28. Coleta do material biológico realizada no dia 26. Fonte: Silva. E.R., 2024 (Canvas).

4.5. Teste comportamental para avaliar o dano motor em animais isquêmicos

4.5.1. Teste do Cilindro

O teste do cilindro foi descrito por Schallert e colaboradores no ano 2000 sendo uma avaliação motora amplamente utilizada em estudos com camundongos para analisar o uso das patas contralaterais e ipsilaterais após intervenções como a cirurgia de Oclusão da Artéria Cerebral Média (MCAO). Esse teste é fundamental para examinar o prejuízo motores que podem surgir após um evento isquêmico cerebral (55). No procedimento, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss. Os animais foram colocados dentro de um aparato cilíndrico de acrílico transparente e vertical, com medidas de 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura, que permitia a observação e o registro detalhados dos seus movimentos.

Quando o camundongo explora o ambiente novo e restrito do cilindro, ele tende a se apoiar nas paredes usando suas patas dianteiras. Esse comportamento natural é quantificado pelos pesquisadores, que registram a frequência e o padrão de uso das patas. Animais sem prejuízos motores tendem a utilizar as patas de forma equilibrada, com 50% de uso ipsilateral e 50% contralateral. O teste foca especialmente no uso das patas ipsilaterais, mesmo lado da lesão e contralaterais, opostas ao lado da lesão cerebral (55-56).

Após a cirurgia de MCAO, espera-se que os camundongos exibam um uso reduzido da pata contralateral devido ao déficit motor causado pela isquemia. Esse padrão de comportamento pode ser utilizado como um indicativo da gravidade da lesão ou da eficácia de possíveis tratamentos. A análise detalhada dos dados obtidos no teste do cilindro consistiu na normalização dos dados, que foi feito através da média de uso da pata ipsilateral entre os animais que compõem o grupo SHAM, o uso da pata foi de 50%. Após a normalização do controle para reduzir o erro nos grupos amostrais, foram realizados cálculos de normalização nos grupos (MCAO, 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg) usando a seguinte fórmula: (valor do uso da pata ipsilateral do animal observado * 100) / média padronizada do uso da pata ipsilateral do grupo SHAM. Por exemplo, para o grupo MCAO, o animal 1 teve um valor normalizado de $(55 * 100 / 50 = 110\%)$. Após encontrar o valor normalizado para cada animal de cada grupo, os dados foram organizados em uma tabela e inseridos em um software estatístico para realizar uma análise não paramétrica, permitindo identificar se houve recuperação funcional ou persistência dos déficits motores entre os grupos.

Teste do cilindro



Figura 6. Imagem representativa para o teste do cilindro. Camundongo explorando durante o teste do cilindro, utilizando alternância de patas ipsilateral e contralateral para explorar o ambiente. Fonte: Silva. E.R., 2024 (Canvas).

4.5.2. Teste para avaliação do *score* neurológico (*Limb Clasp*)

O teste de "limb clasp" é um procedimento utilizado para avaliar a função motora e neurológica em camundongos, sendo especialmente útil em modelos que apresentam neuropatologias, como o acidente vascular encefálico isquêmico. Este teste envolve várias etapas que devem ser seguidas cuidadosamente para garantir resultados consistentes (56). Primeiramente, os camundongos da linhagem *Swiss* foram habituados ao manuseio. Esse processo de habituação ajuda a reduzir o estresse e a ansiedade, fatores que podem interferir nos resultados do teste.

Uma vez que os camundongos haviam sido ambientados, o teste propriamente dito puderam começar. Para isso, o camundongo foi seguro pela cauda e levantado no ar 10 cm acima da gaiola, por 10 s. Durante esse levantamento, é importante garantir que todos os membros do camundongo estejam visíveis e livres para se mover. A captura do comportamento do camundongo enquanto está suspenso foi realizado utilizando uma câmera acoplada ao computador para armazenar os vídeos. Os camundongos que não apresentam prejuízos motores tendem a estender seus membros na tentativa de alcançar uma superfície, enquanto aqueles com prejuízos neurológicos ou motores podem exibir o comportamento de "*limb clasp*", onde os membros traseiros (e, em casos mais graves, os membros dianteiros) são dobrados em direção ao corpo.

A avaliação do comportamento foi realizada de maneira qualitativa, por meio da observação do pesquisador, e quantitativa, utilizando software estatístico para registrar a resposta dos camundongos ao teste comportamental em diferentes níveis de severidade. A classificação seuiu uma escala onde 0 indica ausência de *clasp*ing, com membros estendidos; 1 indica *clasp*ing leve, com os membros traseiros parcialmente dobrados; 2 indica *clasp*ing moderado, com os membros traseiros completamente dobrados, mas os membros dianteiros ainda estendidos; 3 e 4 indicam *clasp*ing severos, com ambos os membros traseiros e dianteiros dobrados (56-57).

Para garantir a consistência dos resultados, durante todo o processo, é importante limpar o ambiente e minimizar quaisquer variáveis externas que possam afetar o comportamento dos camundongos. Este teste é uma ferramenta preciosa para identificar prejuízo motores e neurológicos em roedores, sendo amplamente utilizado em estudos que investigam a eficácia de compostos em modelos de neuropatologia.

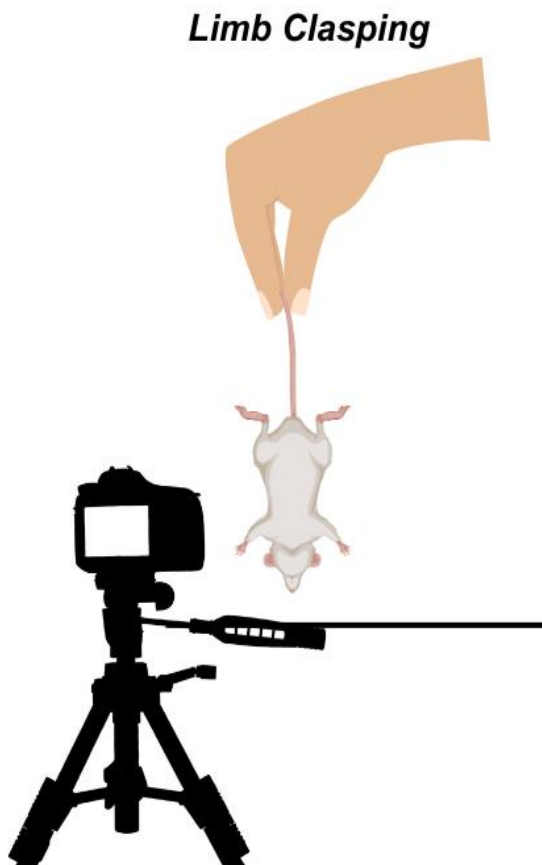


Figura 7. Imagem representativa para o teste comportamental (*Limb Clasp*). Camundongo submetido ao teste comportamental para avaliação do *score* neurológico. Fonte: Silva. E.R., 2024 (Canvas).

Os vídeos gravados foram analisados posteriormente e foi atribuída uma pontuação baseada nos seguintes critérios:

- Pontuação 0: Quando não há aperto de membros. Ocorre a extensão de escape normal.
- Pontuação 1: Quando um membro posterior apresenta uma abertura incompleta e perda de mobilidade. Os dedos das patas apresentam abertura normal.
- Pontuação 2: Ambos os membros posteriores apresentam abertura incompleta e perda de mobilidade. Os dedos das patas exibem abertura normal.
- Pontuação 3: Ambas os membros posteriores exibem aperto com dedos enrolados e imobilidade.
- Pontuação 4: As patas anteriores e posteriores exibem aperto e estão cruzados, com dedos enrolados e imobilidade.

4.5.3. Teste comportamental campo aberto (*Open Field*)

O teste comportamental de campo aberto é uma ferramenta essencial na análise da locomoção, ansiedade e comportamentos estereotipados em roedores, desempenhando um papel fundamental na preparação e criação destes animais (58). Para o experimento foi utilizada uma caixa de cloreto de polivinila (PVC) com dimensões padrão de 42x42x42 cm, na qual os camundongos da linhagem Swiss foram submetidos a observação (59). Uma câmera foi acoplada acima do aparato para capturar a movimentação dentro da caixa. A movimentação dos animais foi analisada em quadros que avaliavam a passagem pela área central e pela zona periférica da caixa. O comportamento foi monitorado por 10 minutos e registrado em vídeo para análise posterior utilizando o software Any-maze para a coleta de dados quantitativos.

Teste de campo aberto (*Open Field*)

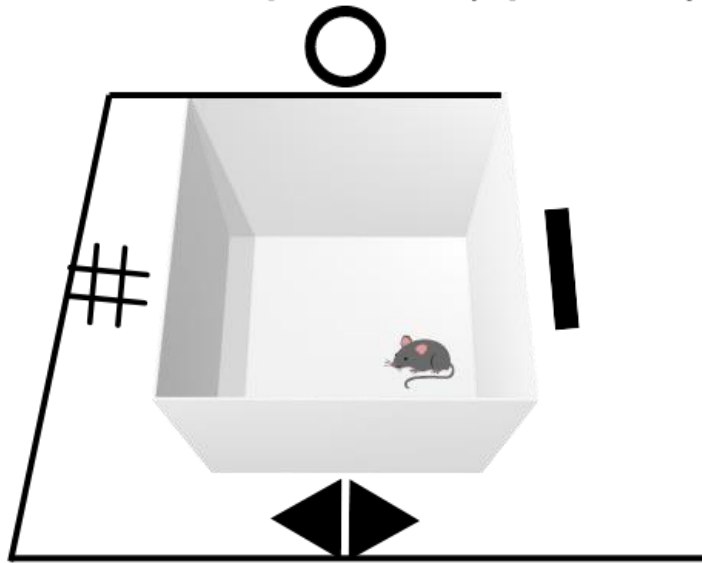


Figura 8. Imagem representativa para o teste de campo aberto (*Open Field*). Camundongo inserido no aparato para realização do teste de campo aberto. Fonte: Silva. E.R., 2024 (Canvas).

As alterações no padrão de locomoção podem ser caracterizadas como indicador de processo neurológico alterado que possibilita detectar possíveis disfunções cerebrais. O teste de campo aberto além de fornecer aos pesquisadores resultados relacionados à ansiedade, estresse e locomoção, esse teste pode ajudar também na avaliação da saúde e bem-estar dos animais (60).

4.6. Teste comportamental para avaliar o dano cognitivo em animais isquêmicos

4.6.1. Teste de Localização de objetos (OLT)

O teste comportamental OLT é uma abordagem direta e eficaz que se baseia na preferência natural dos animais pela novidade, sem a necessidade de reforço externo adicional, isso elimina possíveis complicações associadas a respostas emocionais diferenciadas (61). O protocolo do teste OLT envolve a introdução do animal em uma arena de teste em campo aberto, onde ele investiga dois objetos em relação aos sinais ambientais espaciais colocados na parede do aparato utilizado para que o camundongo consiga se localizar no ambiente.

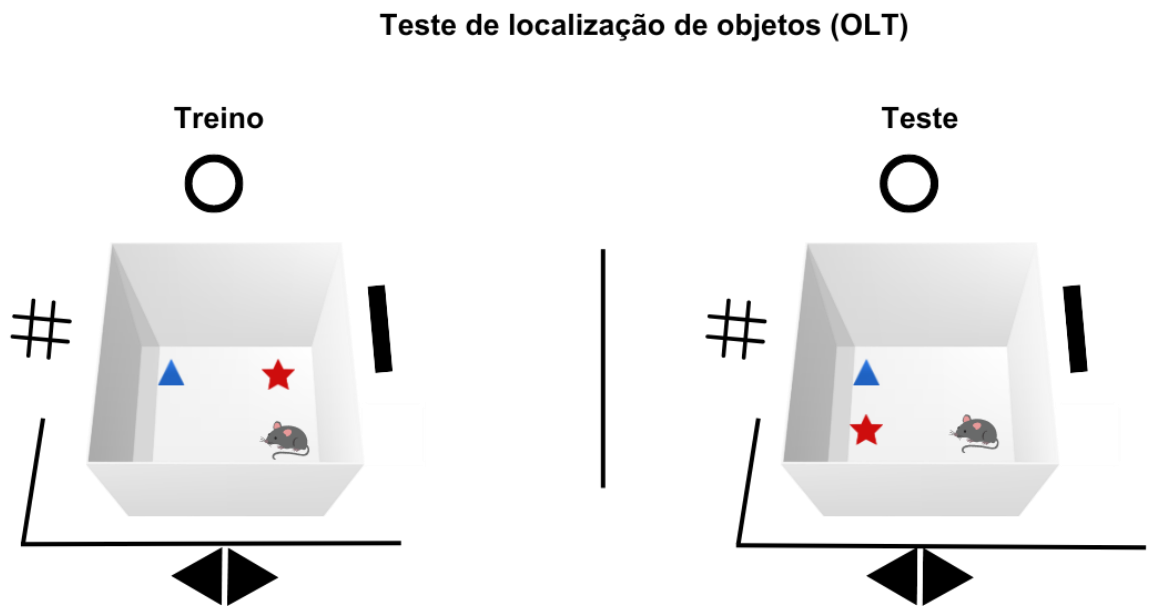


Figura 9. Imagem representativa para o teste comportamental OLT. **A)** representação do período de treino realizado antes do teste OLT. **B)** realização do teste, um dos objetivos foi movido para um novo lugar dentro da caixa. Fonte: Silva. E.R., 2024 (Canvas).

Os animais foram habituados ao aparato 24 horas antes do teste, sendo colocados individualmente para uma sessão de treino de 10 minutos. Após o treino, houve um intervalo de 20 minutos antes do teste. Durante a pausa entre o período de treino e o teste, um dos objetos foi movido de sua posição original. Antes do retorno do animal para a caixa para a realização do teste de memória, o aparato e os objetos foram esterilizados com álcool 70%, a fim de inibir qualquer sinal químico remanescente no objeto, diminuindo assim o viés experimental. A sessão de teste foi gravada por 10 minutos para coleta de dados e análise.

De acordo com o pressuposto do teste comportamental, o camundongo é um animal que possui hábitos exploratórios. Em situações controladas, observou-se que o camundongo tende a explorar novidades dentro do ambiente. Dessa maneira, no teste propriamente dito, os animais com a memória intacta ou em recuperação tendem a explorar o objeto movido, enquanto animais com prejuízo na memória exploram ambos os objetos como se aquele cenário fosse novidade, mesmo sendo o seu segundo contato. Animais com lesões no hipocampo, essencial para a aprendizagem contextual espacial, mostram prejuízos na memória espacial e não apresentam preferência pelo objeto na nova localização (62).

4.6.2. Teste de reconhecimento de objeto novo (NORT)

O teste comportamental NORT, por sua vez, é uma variação do teste OLT que se concentra na capacidade do animal de reconhecer um objeto novo em um ambiente familiar,

sendo especialmente útil para avaliar a memória contextual (62). O protocolo é semelhante ao do teste OLT, com a substituição do objeto que não foi movimentado no teste por um novo objeto, como ilustrado a seguir.

Teste reconhecimento de objeto novo (NORT)

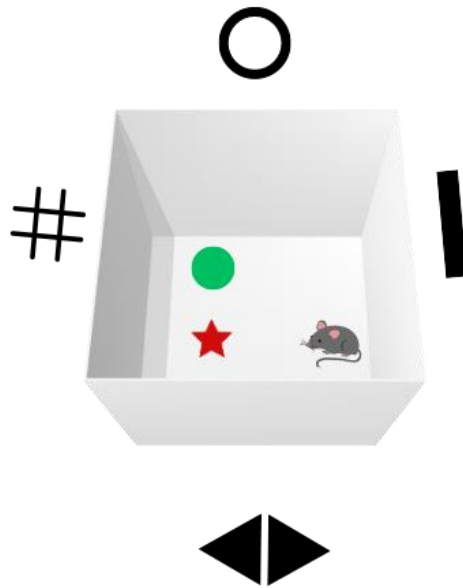


Figura 10. Imagem representativa para o teste comportamental (NORT). O animal foi liberado no aparato após a substituição do objeto que não havia sido movido no teste (OLT). Fonte: Silva, E.R., 2024 (Canvas).

Este teste comportamental considera o tempo que o animal passa investigando o objeto novo em comparação ao objeto familiar. Animais com prejuízo na memória não conseguem reconhecer o novo objeto colocado na caixa e, portanto, exploram ambos os objetos de forma igual. Os animais que apresentam uma melhora na memória tendem a explorar mais o novo objeto em relação ao objeto conhecido.

Ambos os testes comportamentais citados neste trabalho foram fundamentais para avaliar a memória de roedores, proporcionando valiosas percepções no estudo neurocomportamental. Esses testes desempenham um papel importante na compreensão da memória espacial e no avanço da pesquisa em neurociência comportamental.

4.7. Análise de histoquímica

4.7.1 Análise morfológica com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC)

O protocolo experimental com TTC foi iniciado com a eutanásia dos camundongos sete dias após a cirurgia, seguida pela dissecação e extração do cérebro, que foi imediatamente armazenado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelada. O cérebro foi então seccionado em fatias consecutivas de 2 mm de espessura. As fatias cerebrais foram incubadas em uma solução de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio por 30 minutos (63). Após a incubação, as fatias foram removidas da solução e digitalizadas utilizando um scanner CanoScan Lide 300.

Análise por cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)

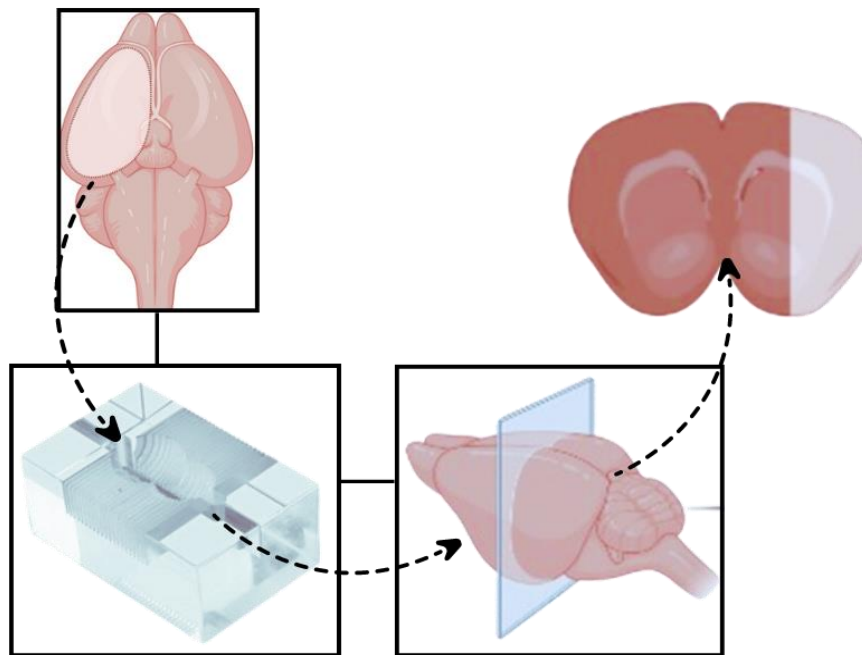


Figura11. Imagem representativa para análise histoquímica. Etapas de preparação das fatias que serão colocadas na solução com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio. Fonte: Silva. E.R., 2024, (*Biorender e Canvas*).

As imagens obtidas foram analisadas com o software Image J, o qual possibilitou o cálculo do volume do infarto cerebral. Este volume foi quantificado utilizando a seguinte fórmula matemática: volume do infarto (%) = (área pálida isquêmica / área total dos córtices esquerdo e direito) × 100. Este cálculo fornece uma avaliação precisa da extensão da lesão

isquêmica, contribuindo para estudos sobre neuroproteção e recuperação cerebral. A metodologia empregada com o TTC, em conjunto com análise computacional, oferece uma abordagem robusta e confiável para investigações em isquemia cerebral (19).

4.8. Análise molecular

4.8.1 Análise de *Western Blotting*

A técnica de *Western Blotting* é uma metodologia importante em um laboratório de biologia molecular e bioquímica, empregada para a detecção e quantificação de proteínas específicas em amostras complexas. Esta técnica é amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa e diagnóstico, dada sua capacidade de fornecer resultados precisos sobre a expressão e modificação de proteínas, sendo indispensável para estudos de doenças e processos biológicos.

A importância do *Western Blotting* no meio científico consiste na sua aplicação na análise da expressão proteica, permitindo a identificação de proteínas específicas em amostras de diferentes tecidos e células. Esta técnica é importante para entender os mecanismos moleculares subjacentes a diversas condições patológicas, como em doenças neurodegenerativas, além de complementar os estudos de expressão gênica e proteica com dados mais específicos e detalhados.

O procedimento de *Western Blotting* envolve várias etapas complexas. A preparação das amostras inicia-se com a coleta do cérebro e dissecação do material biológico que será analisado, nesse trabalho foi utilizado amostras do córtex direito (lado que ocorreu o processo isquêmico). Após realizado a coleta e dissecação o material biológico foram colocados em microtubos de 1,5 ml com (400µl) de solução de lise para cada amostra de córtex coletado. Para a preparação de 20ml da solução de lise celular foram utilizados os seguintes compostos: 2ml de Fluoreto de sódio (NaF) 50mM, 2ml de Ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) 1 mM, 2 ml de Inibidor de protease Sigma Fast diluição 1x, 14 ml de água deionizada. O rompimento mecânico das células foi realizado utilizando um mini homogeneizador manual para a maceração. A solução resultante dessa maceração foi então submetida a uma centrifugação em alta velocidade por 20 minutos, repetida duas vezes, a fim de separar as proteínas dos restos celulares, purificar a solução e, posteriormente, congelá-la a -20°C.

A quantificação das amostras é realizada colocando-as em uma placa com 96 poços, em triplicata, e utilizando a solução de Bradford nos três primeiros poços como controle branco.

Utiliza-se uma curva padrão de BSA + Bradford para quantificação, e a leitura das amostras no espectrofotômetro determina a concentração proteica. Esta etapa é fundamental para garantir que todas as amostras pipetadas no gel contenham a mesma quantidade de proteína, assegurando a precisão e reprodutibilidade do teste.

A próxima fase é a eletroforese, foi utilizado gel mPAGE™ Bis-Tris Gels, 8–16% (Sigma Aldrich), 1,0 mm. Foram pipetadas 40µg de proteína em cada poço do gel, e submetidas a uma corrida eletroforética por cerca de 40 minutos em solução tampão a base de mPAGE™ MES SDS da Sigma Aldrich. Após a eletroforese, ocorre a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Cytiva, Amersham™, Protan™, Sigma Aldrich). Este processo envolve a preparação de um "sanduíche" de transferência, composto por esponja, papel filtro e gel, e a transferência eletroforética das proteínas por 1 hora e 30 minutos. A membrana composta Nitrocelulose é corada com *Ponceau* para verificar a transferência, seguida de várias lavagens com TBS-T (tampão salina com Tris-base, pH 7.4) e um bloqueio com solução de BSA a 3% por 10 minutos.

A etapa final envolve a incubação da membrana com um anticorpo primário por 24 horas, os anticorpos primários utilizados foram: Beta-Actina Sigma-Aldrich(1:2000), GlyR Santa Cruz (1:1000), Glyt1 Thermo Fisher (1:1000), Glyt2 Santa Cruz (1:1000), NR1 Santa Cruz (1000), NR2A Santa Cruz (1:1000), NR2B Santa Cruz (1:1000), pCREB Santa Cruz (1:1000), CREB Santa Cruz (1:1000), BDNF Thermo Fisher (1:1000), TrKb Sigma-Aldrich(1:1000), CamK IV Santa Cruz (1:1000), CaMKII Santa Cruz (1:1000).

Após esta incubação, são realizadas lavagens para remover os anticorpos não ligados, e a membrana é incubada com um anticorpo secundário específico, os anticorpos utilizados foram: Goat anti Rabbit Thermo Fisher (1:3000), Anti Rabbit IgG CF 568 Sigma-Aldrich (1:3000), Anti Mouse IgG CF 488A Sigma-Aldrich (1:3000). A detecção das proteínas foi realizada por quimioluminescência utilizando uma solução reveladora de ECL Plus (Thermo Fisher Scientific) como descrito pelo fabricante e visualizadas pelo aparelho ImageQuant. Este protocolo, foi seguido de forma rigorosa, para garantir resultados confiáveis e repetíveis, permitindo uma análise detalhada da expressão proteica (64-65-66).

4.9. Análise de estatística

Para realizar a avaliação dos dados que seguem uma distribuição paramétrica, foi realizada uma análise de variância unidirecional *One-way* (ANOVA), sucedida pela análise pós-teste de *Dunnnett*. Foi adotado o valor de referência de $P < 0,05$ como sendo indicativo de

significância estatística. Os dados que não cumpriram a suposição de normalidade foram analisados utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* foram apresentados como sendo mediana (IIQ; 25%-75%), foi considerando como significativo o valor de $P < 0,05$. Para os resultados paramétricos os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). A estatística foi analisada utilizando o software estatístico *GraphPad Prism* na versão 9.0.2.

5.0. Resultados

5.1. Tratamento com Sarcosina diminui o tamanho da área isquêmica.

O teste histoquímico foi conduzido logo após a realização dos testes comportamentais, com o intuito de avaliar a viabilidade celular após o processo isquêmico. A utilização da técnica de TTC permitiu quantificar a área infartada, mostrando que o tratamento sarcosina reduziu significativamente o tamanho da área de infarto nos diferentes grupos de tratamento. O grupo tratado com 125 mg/kg de sarcosina apresentou uma média de $6,62 \pm 2,03$, o grupo tratado com 250 mg/kg apresentou uma média de $8,26 \pm 3,34$, e o grupo tratado com 500 mg/kg teve uma média de $9,13 \pm 1,92$. Os animais tratados com sarcosina apresentaram uma redução na área de isquemia em relação ao grupo MCAO ($20,82 \pm 2,54$) **Figura 12.A**.

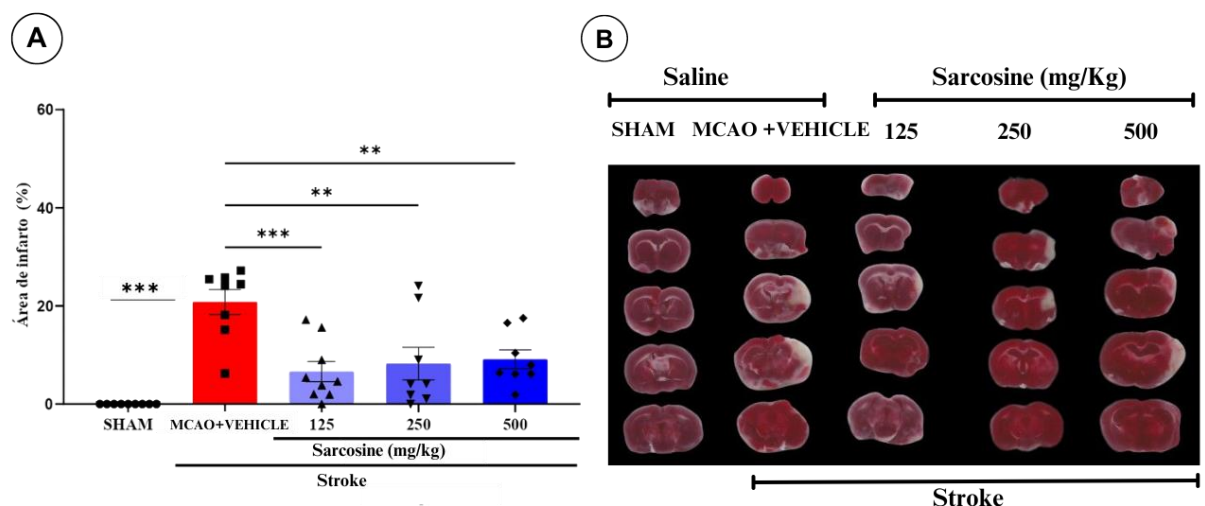


Figura 12. Imagem representativa para Histoquímica realizada após 5 dias. Experimento realizado 5 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, de 10 a 12 semanas. **A**) quantificação da área total do infarto mostra que houve uma diminuição da área lesionada nos grupos tratados. **B**) histoquímica realizada com cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC), diminuição da área de isquemia nos animais tratados com sarcosina. dados apresentados como (média \pm erro padrão da média) $n = 8$. (MCAO vs. 125 mg/kg $***p < 0,0002$, MCAO vs. 250 mg/kg $**p < 0,0013$, MCAO vs. 500 mg/kg $**p < 0,0027$, One-way ANOVA, pós teste *Dunnnett*)

Esses resultados indicam que o tratamento com sarcosina levou os animais com quadro isquêmico a terem uma redução significativa do processo isquêmico na região cortical, conforme demonstrado pela diminuição da área de infarto **Figura 12.A**. As fatias de tecido utilizadas para analisar as áreas de isquemia nos grupos tratados com sarcosina também mostraram uma redução em relação ao grupo com isquemia **Figura 12.B**. Os animais dos grupos MCAO ($20,82 \pm 2,54$) apresentaram quadro isquêmico como mostrado na **Figura 12.A**. Na **Figura 12.B**, é possível visualizar as áreas com isquemia, região branca no tecido. O grupo SHAM ($0,00\% \pm 0,00$), não apresentou área de infarto no córtex **Figura 12.B**.

Foi utilizado o teste do cilindro para avaliar a alternância das patas dos animais durante o período exploratório. Os animais do grupo MCAO ($116 \pm 2,5$), apresentaram uma preferência notável pelo uso da pata que não foi afetada pela lesão “ipsilateral” em comparação ao grupo SHAM ($100,0 \pm 0,96$), isso é consistente com a limitação motora associada à isquemia. O tratamento com sarcosina nas concentrações de (125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg) mostrou uma diminuição substancial na utilização da pata ipsilateral em comparação com o grupo MCAO, **Figura 13.A**. Esse achado sugere que a sarcosina desempenha um papel importante na atenuação do comprometimento motor causado pela lesão isquêmica.

Durante o teste de *Limb Clasp*ing, os animais foram colocados de cabeça para baixo, segurados pela cauda, para avaliar a movimentação dos membros. Em condições normais, espera-se uma extensão completa dos membros em resposta à força gravitacional. Contudo, animais com danos leves tendem a apresentar um aperto mais proeminente das patas dianteiras, enquanto animais com danos isquêmicos graves tendem a apertar tanto os membros dianteiros quanto os traseiros.

Os grupos que foram tratados com sarcosina na dose de 125 mg/kg apresentaram mediana 0,00 (IIQ; 0,00-1,00), ($p < 0,0049$). 250 mg/kg mediana 0,00 (IIQ; 0,00-1,00), ($p < 0,026$), e 500 mg/kg mediana 0,50 (IIQ; 0,00-1,00), apresentaram valores significativamente inferiores em comparação com o grupo MCAO que teve uma mediana 2,00 (IIQ; 1,25-2,75), ($p < 0,034$). Conforme ilustrado na **figura 13.B**.

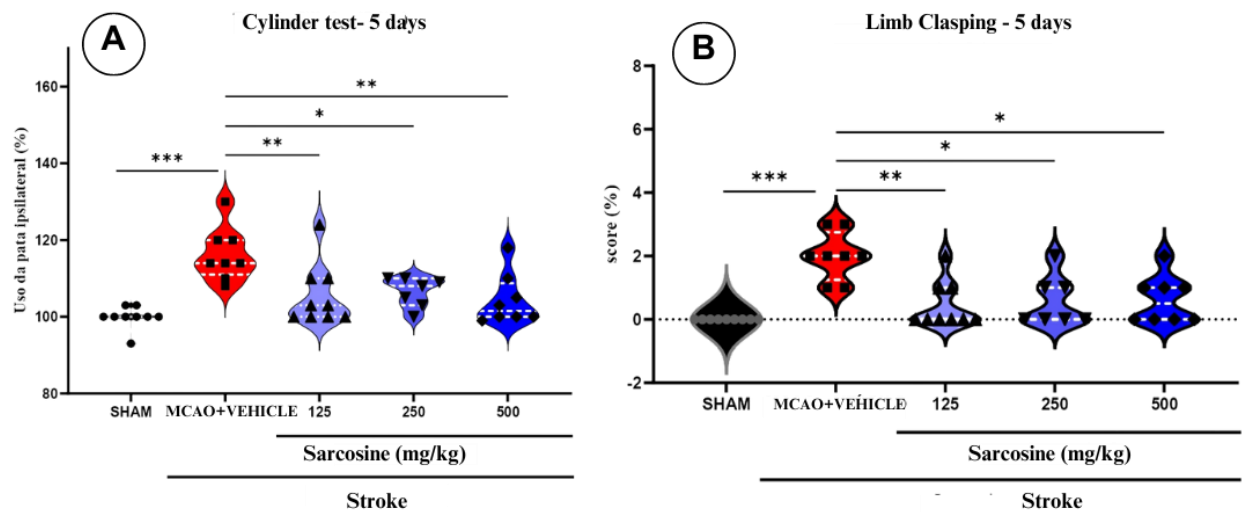


Figura 13. Imagem representativa para os testes comportamentais Cilindro e *Limb Clasp*. Experimento realizado 5 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos Swiss, machos, de 10 a 12 semanas. **A)** teste do cilindro, animais tratados com sarcosina melhora alternância de patas contralateral. **B)** Teste *Limb Clasp*, animais que foram tratados com sarcosina apresentaram diminuição na torção de membros. Dados apresentados como (média \pm erro padrão da média) para o teste do Cilindro e mediana (IIQ; quartil 25%- quartil 75%) para o teste *Limb Clasp*, N= 8. Teste do Cilindro (MCAO vs. SHAM *** $p < 0,0001$, MCAO vs. 125 mg/kg ** $p < 0,003$, MCAO vs. 250 mg/kg * $p < 0,01$, MCAO vs. 500 mg/kg ** $p < 0,001$, *One-way ANOVA* seguido por *Kruskal-Wallis*). Teste *Limb Clasp* (MCAO vs. 125 mg/kg ** $p < 0,0049$, MCAO vs. 250 mg/kg * $p < 0,026$, MCAO vs. 500 mg/kg * $p < 0,034$, *One-way ANOVA* seguido por *Kruskal-Wallis*).

5.2. Tratamento crônico com Sarcosina previne prejuízo neurológico em camundongos submetidos ao modelo de MCAO

Uma vez que observamos um efeito de recuperação da área lesionada após o tratamento de curto prazo com sarcosina, decidimos investigar se o tratamento de longo prazo com 28 dias também seria benéfico para os animais submetidos ao modelo de MCAO. Inicialmente, conduzimos o teste comportamental *Limb Clasp*, coletando dados em três momentos distintos: no 7º, 14º e 28º dia. Esses dados forneceram informações importantes para avaliar diversos parâmetros neurológicos.

Foi observado que os resultados no teste comportamental “*Limb Clasp*” realizado no dia 7, apresentou diferença significativa entre os animais que compõem os grupos controle positivo SHAM, apresentaram uma mediana 0,00 (IIQ; 0,00-0,00), ($p < 0,0001$. *One-way ANOVA*, seguido por *Kruskal-Wallis*), enquanto o controle negativo grupo MCAO apresentou a mediana 1,50 (IIQ; 1,00-2,00). Os animais do grupo experimental SHAM não apresentaram nenhum tipo de torção de membro que indique dano motor na realização do teste, por outro

lado, os animais do grupo experimental MCAO apresentaram torção do membro que indicava dano motor.

Os resultados indicam que a sarcosina possui um efeito neuroprotetor significativo em animais submetidos à isquemia cerebral. Os grupos tratados com diferentes doses de sarcosina foram comparados com o grupo MCAO. Após 7 dias de tratamento, observou-se uma diminuição na torção de membros nos animais do grupo que receberam 125 mg/kg de sarcosina 0,00 (IIQ; 0,00-1,00), ($p < 0,001$). Além disso, o grupo que recebeu 500 mg/kg de sarcosina também apresentou uma mediana de 0,00 (IIQ; 0,00-1,00), ($p < 0,001$), **Figura 14.A**.

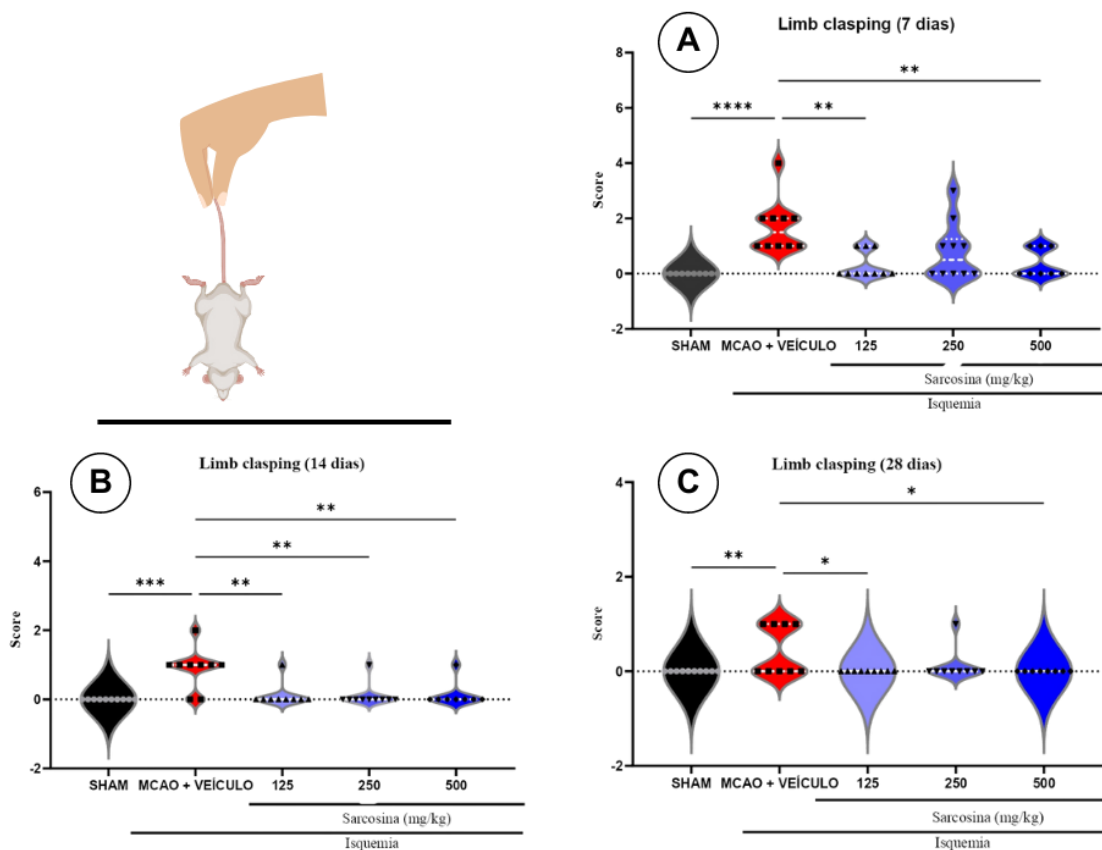


Figura 14. Gráfico representativo para o teste comportamental (*Limb Clasp*). Experimento realizado nos dias 7, 14 e 28 após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, de 10 a 12 semanas. **A)** Animais MCAO apresentam torção de membro acentuada em relação ao grupo SHAM, animais tratados com sarcosina nas doses 125 mg/kg e 500 mg/kg apresenta melhora após 7 dias. **B)** Animais tratados com sarcosina apresentam diminuição na torção de membro após 14 dias de tratamento com sarcosina. **C)** Animais tratados com sarcosina por 28 dias apresentam melhora no comprometimento motor em relação ao grupo MCAO. Dados apresentados como mediana (IIQ; quartil 25%- quartil 75%) para o teste *Limb Clasp*, N= 10. 7 dias (MCAO vs. SHAM **** $p < 0,0001$, MCAO vs. 125 mg/kg ** $p < 0,001$, MCAO vs. 500 mg/kg ** $p < 0,009$, *One-way ANOVA*, seguido por *Kruskal-Wallis*). 14 dias (MCAO vs SHAM *** $p < 0,0001$, MCAO vs. 125 mg/kg

**p<0,002, MCAO vs. 250 mg/kg **p<0,001, MCAO vs. 500 mg/kg **p<0,004, *One-way ANOVA*, seguido por *Kruskal-Wallis*). 28 dias (MCAO vs. SHAM **p<0,009, MCAO vs. 125 mg/kg *p<0,01, MCAO vs. 500 mg/kg *p<0,01, *One-way ANOVA*, seguido por *Kruskal-Wallis*).

O tratamento com sarcosina reverteu parcialmente o dano ocasionado pelo processo isquêmico após 14 dias de tratamento. Isso resultou em uma diminuição na torção do membro nos grupos 125 mg/kg que apresentou a mediana 0,00 (IIQ; 0,00-1,00), (p< 0,002. *One-way ANOVA*, seguido por *Kruskal-Wallis*), 250 mg/kg com mediana 0,00 (IIQ; 0,00-1,00), (p< 0,002. *One-way ANOVA*, seguido por *Kruskal-Wallis*) e o grupo 500 mg/kg com mediana 0,00 (IIQ; 0,00-1,00), (p< 0,002. *One-way ANOVA*, seguido por *Kruskal-Wallis*), **Figura 14.B.** Com 28 dias foi possível observar redução da torção de membro nos grupos 125mg/kg que apresentou uma mediana igual à 0,00 (IIQ; 0,00-1,00) p < 0,01. *One-way ANOVA*, seguido por *Kruskal-Wallis*, e o grupo 500mg/kg com mediana 0,50 (IIQ; 0,00-1,00), (p< 0,01. *One-way ANOVA*), seguido por *Kruskal-Wallis*, **Figura 14.C.**

Os resultados do teste do Cilindro foram utilizados para avaliar o comprometimento motor e sensorial ocasionado pelo quadro isquêmico nos animais. Avaliou-se a alternância das patas contralateral e ipsilateral na exploração dos animais em diferentes dias. No dia 7 dias foi observado que houve um aumento na utilização da pata ipsilateral em animais do grupo MCAO que apresentou média (113,7 ±4,5), enquanto os animais SHAM apresentaram média de alternância entre as patas igual à (100,0 ± 0,29), (p< 0,04. *One-way ANOVA*), no decorrer do processo exploratório do aparato cilíndrico.

Os animais que receberam tratamento com a dose na concentração de 125 mg/kg tiveram aumento na média (97,3 ± 1,3), (p< 0,03. *One-way ANOVA*) de alternância da pata contralateral apresentaram uma melhora em comparação ao grupo MCAO que apresentou uma média (113,7 ± 4,5). Nos demais grupos de tratamento, 250mg/kg (99,6 ± 1,5) e 500mg/kg (98,8 ± 1,4) não houve diferença no uso da pata ipsilateral a em relação ao grupo Veículo (113,7 ± 4,5), **Figura 15. A.**

A sarcosina melhorou a média de alternância das patas em animais que foram tratados com sarcosina por 14 dias. Os animais do grupo 125 mg/kg apresentaram a média (95,44 ± 3,31), (p<0,024. *One-way ANOVA*). A dose de 250 mg/kg teve média (99,11 ± 2,64), (p<0,003. *One-way ANOVA*) e o grupo 500mg/kg (98,39±1,65), (p<0,025. *One-way ANOVA*). Conforme ilustrado na **Figura 15. B.**

Os animais tratados com sarcosina por 28 dias nas doses de 125 mg/kg apresentaram uma média igual à (104,8 ± 1,10), (p<0,01. *One-way ANOVA*), o grupo de 250 mg/kg teve média (102,9±1,84), (p<0,002. *One-way ANOVA*) enquanto o grupo 500 mg/kg apresentou

uma média igual a $(100,4 \pm 2,02)$, ($p < 0,003$. *One-way ANOVA*). A média encontrada nos grupos de tratamento foi menor que a média do grupo MCAO ($116,8 \pm 2,83$) Figura 15. C.

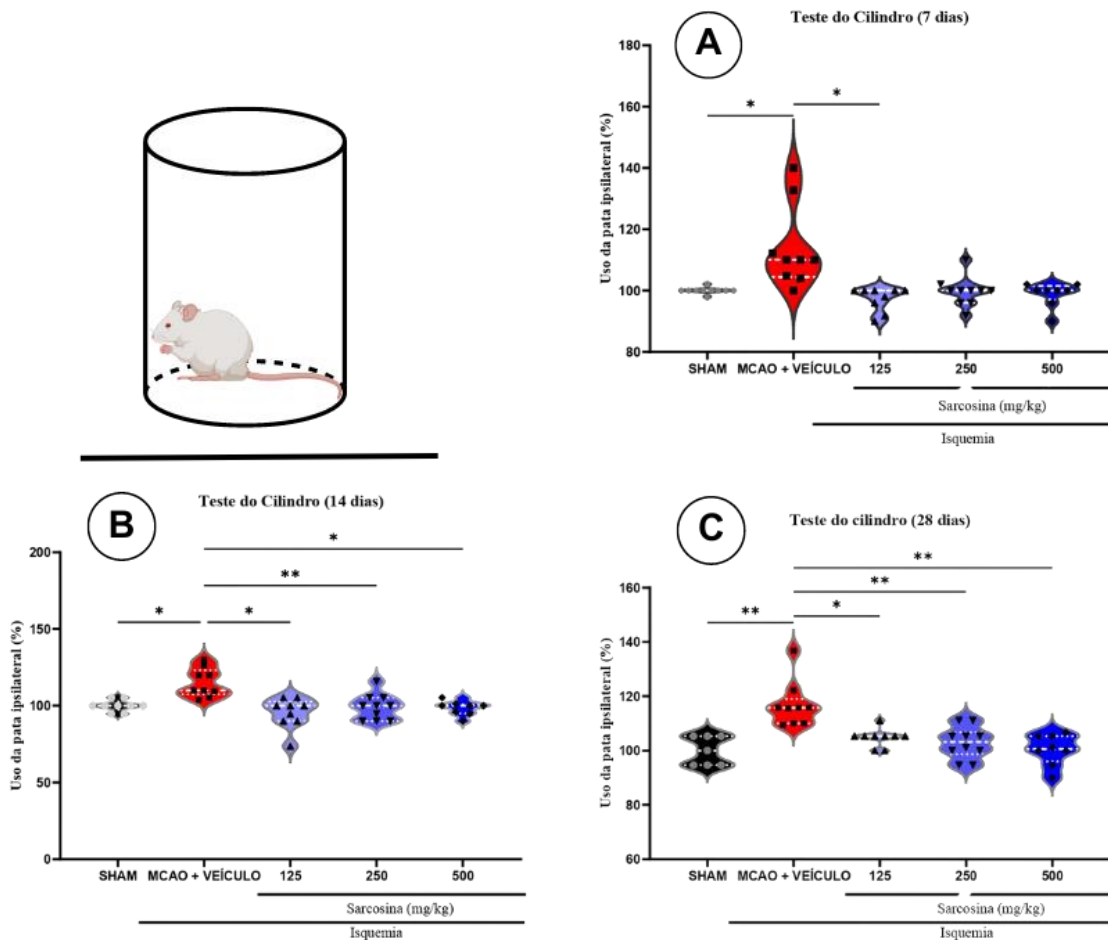


Figura 15. Gráfico representativo para o teste do cilindro. Experimento realizado nos dias 7, 14 e 28 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, 10 a 12 semanas. **A)** Animais do grupo MCAO apresentam dano motor em relação ao grupo SHAM, grupos tratados com a dose 125 mg/kg apresentam melhora após tratado com sarcosina. **B)** Animais tratados com sarcosina apresentam diminuição do uso da pata IPSILATERAL. **C)** O tratamento com sarcosina melhora o dano motor depois de 28 dias de tratamento nos grupos: 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg. Dados apresentados como (média \pm erro padrão da média) $N = 10$.

5.3. O tratamento crônico com sarcosina previne o déficit cognitivo em camundongos submetidos ao modelo de MCAO

A avaliação cognitiva dos animais submetidos à cirurgia de oclusão de MCAO foi realizada para compreender as implicações do tratamento ao longo de um período de 28 dias. Esses testes comportamentais visam dois objetivos principais: primeiro, fornece informações

sobre as capacidades mnemônicas dos animais ao longo do experimento; segundo identificar potenciais déficits cognitivos resultantes do modelo de MCAO, possibilitando a comparação entre grupos tratados e controle.

Para alcançar esses fins, o teste comportamental *Object Location Test* (OLT) foi empregado, com sua validade reforçada por meio do teste de campo aberto (*Open Field Test*). Os resultados, ilustrados na **Figura 16, A e B**, indicam que não houve diferenças estatisticamente significativas na mobilidade dos animais, conforme evidenciado pela distância percorrida e pelo número de cruzamentos de zonas. Esses dados indicam que os animais mantiveram uma atividade locomotora adequada durante os testes, sustentando a validade do OLT como método de avaliação comportamental no contexto deste estudo.

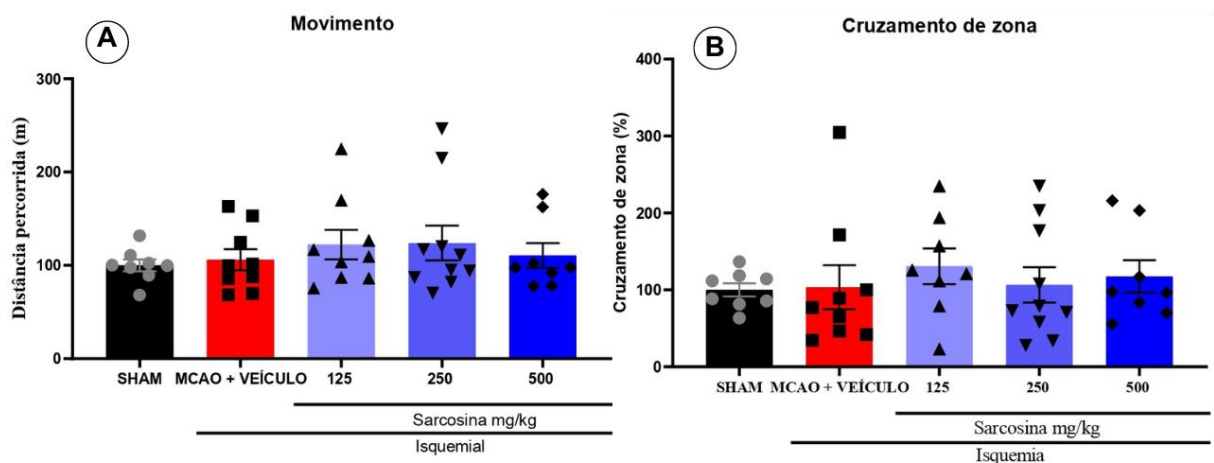


Figura 16. Teste de comportamento de campo aberto (*Open Field*). Experimento realizado 26 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, de 10 a 12 semanas. **A)** Teste comportamental realizado no dia 26 antecedendo os testes de memória. Não houve diferença entre os grupos no cruzamento de zonas (periferia e centro). **B)** Avaliação da distância percorrida em metro dentro do tempo de 10 minutos, não houve diferença entre os grupos. Todos os animais estavam aptos para realização dos testes de memória. Os dados foram apresentados como (Média \pm Erro da média), N=10.

A avaliação da memória nos animais iniciou no dia 26, quando foi conduzida a fase de habituação, necessária para ser realizada 24 horas antes da execução do teste. Esse procedimento foi aproveitado para realizar o teste comportamental de campo aberto, denominado "Open Field". No dia 27, foi iniciada a etapa de treinamento, cujo propósito é permitir que os animais se aclimatem ao ambiente e aos objetos utilizados. Essa fase de treino viabilizou a exploração dos objetos pelos animais, a formação de memórias do ambiente e dos

objetos, proporcionando, assim, uma base sólida para a etapa subsequente de teste. Como pode ser observado na **Figura 16.A**, os animais não apresentaram preferência por nenhum objeto durante esta fase do experimento.

Teste OLT

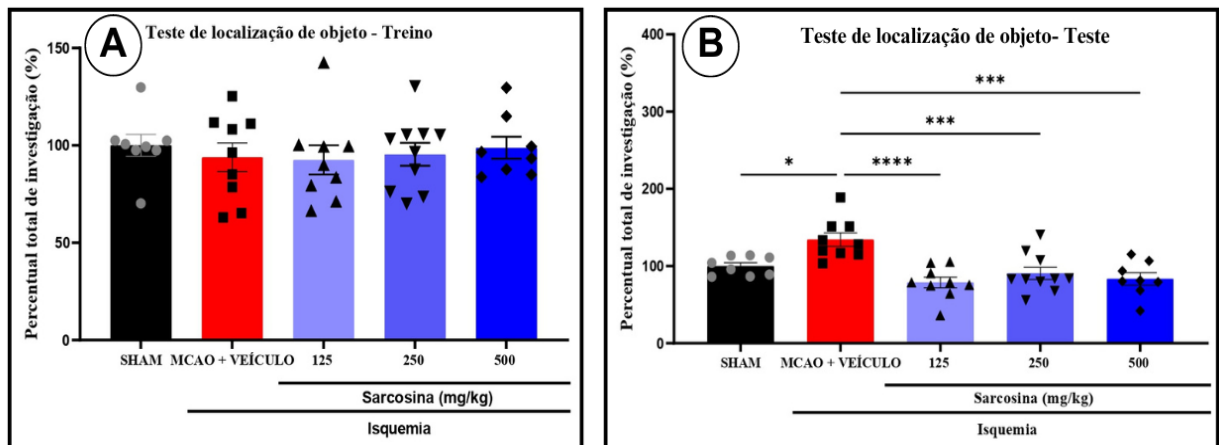


Figura 17. Teste de Localização de objetos. Experimento realizado 27 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, de 10 a 12 semanas. **A)** Foi realizado o treino para realização do teste OLT para avaliar se havia preferência dos animais por algum objeto. Nenhum animal mostrou preferência prévia aos objetos. **B)** Os animais tratados com sarcosina nas doses de 125,250 e 500mg/kg apresentam melhor índice de investigação de objetos em relação ao grupo MCAO. Resultado apresentado como (média ± erro padrão da média) N= 10.

Os resultados obtidos no teste de localização de objeto (OLT) realizado no dia 28 mostraram que os animais do grupo MCAO ($134,2 \pm 8,66$) apresentaram um comportamento anormal, indicativo de não reconhecimento do objeto movido. Os animais SHAM tiveram uma média ($100 \pm 4,30$), ($p < 0,010$, *One-way ANOVA*), mostrando assim que tinham uma preferência pela exploração do objeto que havia sido movido, **Figura 17, B**.

O tratamento com sarcosina melhorou a média do grupo 125 mg/kg ($78,7 \pm 7,0$), ($p < 0,0001$), o grupo 250 mg/kg apresentou a média ($90,5 \pm 7,92$), ($p < 0,0004$), e o grupo de 500 mg/kg apresentou a média ($83,3 \pm 8,03$), ($p < 0,0001$). A média desses grupos está abaixo da média dos animais MCAO ($134,2 \pm 8,66$). Esse resultado pode ser um indicativo que o tratamento com sarcosina pode estar revertendo o dano cognitivo, pois os animais dos grupos tratados com sarcosina demonstraram um maior interesse pela novidade, indicando uma melhora na memória e na aprendizagem.

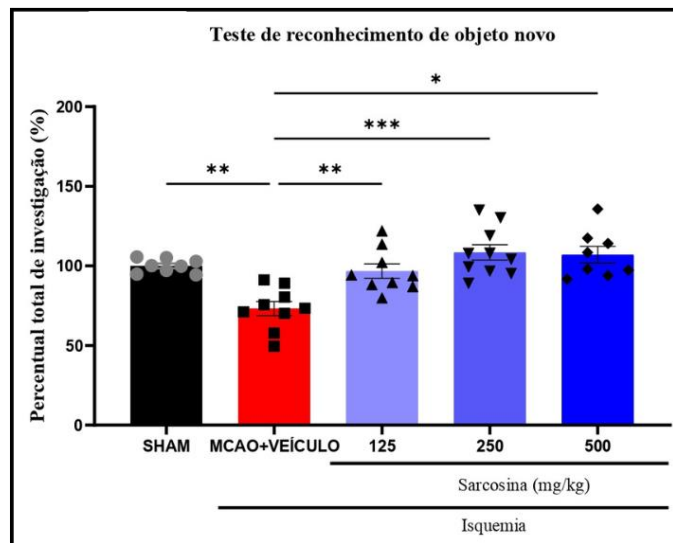


Figura 18. Teste de reconhecimento de objeto novo. Experimento realizado 28 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos Swiss, machos, de 10 a 12 semanas. Animais tratados com sarcosina apresentam melhora cognitiva no percentual de investigação. Resultado apresentado como (média \pm erro padrão da média) N= 10.

Realizamos o teste de reconhecimento de objeto novo (NORT), para complementar os testes comportamentais para avaliação da memória dos animais. Foi observado que o grupo MCAO apresentou uma média de investigação de novo objeto igual à (73,1 \pm 4,48). O tratamento com sarcosina contribuiu com a melhora da média de investigação do novo objeto nos grupos experimentais 125mg/kg que apresentou uma média igual à (96,7 \pm 4,52), ($p < 0,005$), no grupo de 250mg/kg a média foi (108,5 \pm 4,81), ($p < 0,0002$) e o grupo tratado com a dose de 500mg/kg teve a média (107,1 \pm 5,29), ($p < 0,01$) **Figura 18**.

6. Análise molecular por *Western Blotting*

6.1. Avaliação de proteínas associadas aos transportadores de glicina (Glyt1 e Glyt2), e aos receptores de glicina (GlyR).

Para investigar o impacto da sarcosina, um inibidor dos transportadores de glicina, sobre a expressão de GlyR e o neuroreparo em condições de isquemia, foram realizados experimentos com camundongos submetidos à isquemia induzida por oclusão da artéria cerebral média (MCAO). Os camundongos tratados com sarcosina em concentrações de 125 mg/kg (112,5 \pm 3,22), 250 mg/kg (111,3 \pm 10,88) e 500 mg/kg (128,4 \pm 8,08) mostraram uma expressão aumentada de GlyR em comparação com os animais tratados com solução salina MCAO (128,4 \pm 8,08), **Figura 19.A**.

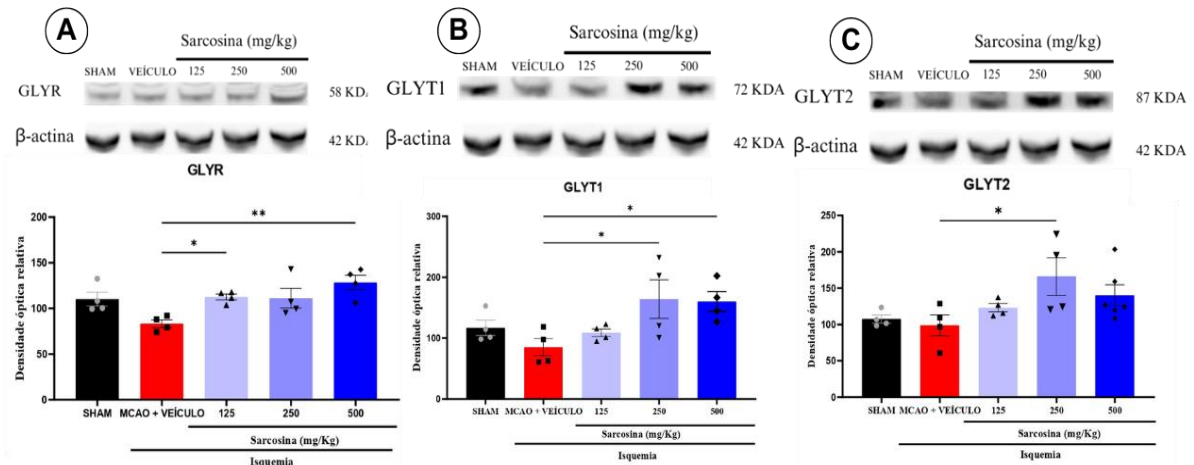


Figura 19. Imagem ilustrativa para análise de *Western Blotting*, GlyR, Glyt1 e Glyt2. Experimento realizado 28 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, de 10 a 12 semanas. **A)** Animais tratados com sarcosina apresentam aumento no nível de subunidade do receptor de glicina GLYR. **B)** Grupos tratados com sarcosina melhoram o nível de expressão de Glyt1. **C)** Tratamento com sarcosina aumenta o nível de Glyt2 após tratamento com dose 250mg/kg. Resultado apresentado como (média \pm erro padrão da média) N= 4.

Os animais do grupo SHAM apresentaram uma média de expressão de proteínas GlyR igual à $(110,2 \pm 7,72)$, ($p < 0,06$), essa média indica o nível basal de expressão da proteína GlyR em animais sem o quadro isquêmico. O tratamento com sarcosina aumentou o nível de expressão de GlyR nos grupos 125 mg/kg, média $(112,5 \pm 3,22)$, ($p < 0,04$) e no grupo 500mg/kg com média $(128,4 \pm 8,0)$, ($p < 0,002$).

A subunidade Glyt1 é importante para a regulação dos níveis de glicina no sistema nervoso central, influenciando tanto a neurotransmissão inibitória via receptores de glicina quanto a função dos receptores NMDA. Os resultados obtidos através da análise de western Blotting indicaram que houve aumento no nível da expressão de Glyt1 no grupo 250 mg/kg, média $(164,1 \pm 31,69)$, ($p < 0,02$) e no grupo 500 mg/kg, média $(160,1 \pm 16,24)$, ($p < 0,03$) em comparação com o grupo MCAO com média $(84,98 \pm 14,09)$, **Figura 19B**. A avaliação da expressão da subunidade Glyt2 mostra diferenças entre as médias dos grupos experimentais. Os animais do grupo SHAM com média $(107,5 \pm 5,57)$, grupo MCAO, média $(98,95 \pm 14,31)$, 125 mg/kg, média $(123,0 \pm 5,73)$ e o grupo 500 mg/kg, média $(140,3 \pm 14,4)$, não apresentaram resultados significativos na expressão de Glyt2. O nível de Glyt2 teve expressão significativa no grupo de tratamento com a dose de 250 mg/kg, média $(166,1 \pm 25,88)$, ($p < 0,02$), **Figura 19.C**.

6.2. Avaliação das subunidades do receptor N-metil-D-aspartato: GluN1, GluN2A e GluN2B

Os dados referentes a subunidade GLUN1, mostra que os níveis de proteína para os diferentes grupos foram: SHAM, média ($112 \pm 7,13$), grupo MCAO, média ($94,29 \pm 10,62$), 125 mg/kg, média ($132,1 \pm 12,65$), 250 mg/kg, média ($129,9 \pm 22,47$) e 500 mg/kg de sarcosina, média ($152,1 \pm 34,68$). Não teve diferença na expressão da subunidade GLUN1 como apresentado na **Figura 20.A**.

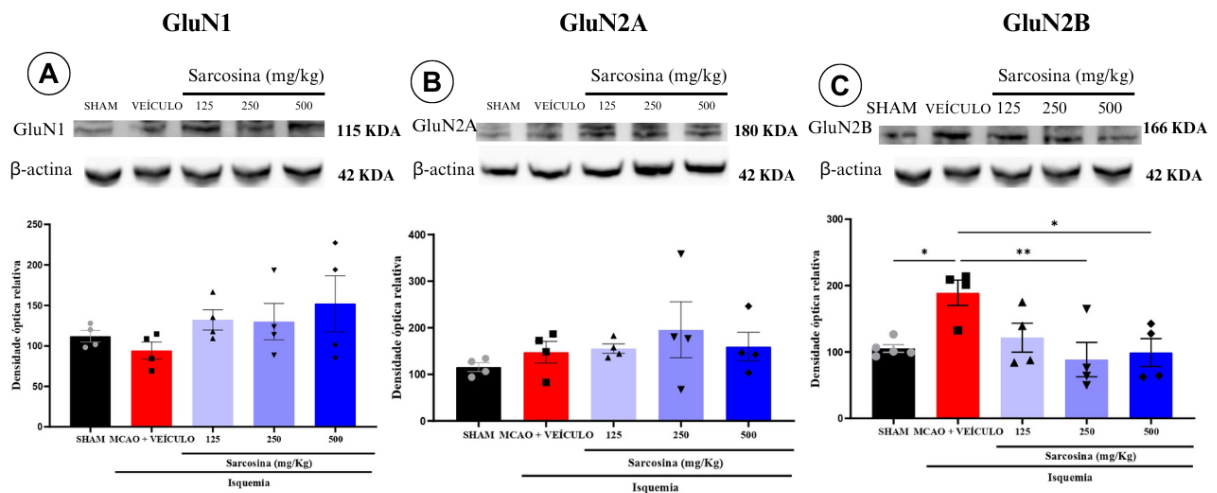


Figura 20. Gráfico representativo para avaliação de proteínas GluN1, GluN2A, GluN2B. Experimento realizado 28 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, de 10 a 12 semanas. **A)** O tratamento com sarcosina aumenta o nível de expressão de proteína GluN1 nos grupos de tratamento, mas não houve diferença significativa. **B)** Animais tratados apresentam elevação no nível de expressão de proteína GluN2A, não houve resultado significativo. **C)** Os níveis de proteínas GluN2B aumentam devido ao dano isquêmico, animais tratados diminuíram a expressão de GluN2B. Resultado apresentado como (média \pm erro padrão da média) N= 4.

A avaliação da subunidade GLUN2A, mostraram os seguintes níveis de expressão para subunidade GLUN2A de acordo com a média obtida: SHAM ($115,4 \pm 9,31$), grupo MCAO ($147,4 \pm 23,6$), 125 mg/kg ($155,1 \pm 10,22$), 250 mg/kg ($195,4 \pm 60,19$) e 500 mg/kg ($159,4 \pm 30,53$). Conforme representado no gráfico na **Figura 20.B**, não houve diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de subunidade GLUN2B, foram avaliados pela média de cada grupo experimental: SHAM ($105 \pm 5,67$), grupo MCAO ($189,2 \pm 19,09$), 125 mg/kg ($121,6 \pm 21,86$), 250 mg/kg ($88,64 \pm 25,90$) e 500 mg/kg ($99,20 \pm 20,96$). Esses resultados mostram a expressão de GLUN2B aumentada significativamente no grupo MCAO, indicando uma resposta ao dano isquêmico. O nível normal de expressão da subunidade GLUN2B está representado pela média do grupo SHAM ($105,3 \pm 5,67$), ($p < 0,01$). Os animais tratados com sarcosina nas doses de 250 mg/kg ($88,64 \pm 25,90$), ($p < 0,007$) e 500 mg/kg ($99,20 \pm 20,96$), ($p < 0,01$) mostraram que houve uma diminuição nos níveis de expressão de proteínas associadas a subunidade GLUN2B,

sugerindo que o controle da expressão da subunidade está ligado a um possível mecanismo de neuroreparo, **Figura 20.C**.

6.3. O tratamento crônico com sarcosina modula a via de CaMKII/CaMK IV/CREB em camundongos submetidos ao modelo de MCAO

Avaliamos a modulação das vias de sobrevivência celular associadas ao CREB no neuroreparo em animais isquêmicos que foram tratados em um experimento crônico com sarcosina por 28 dias.

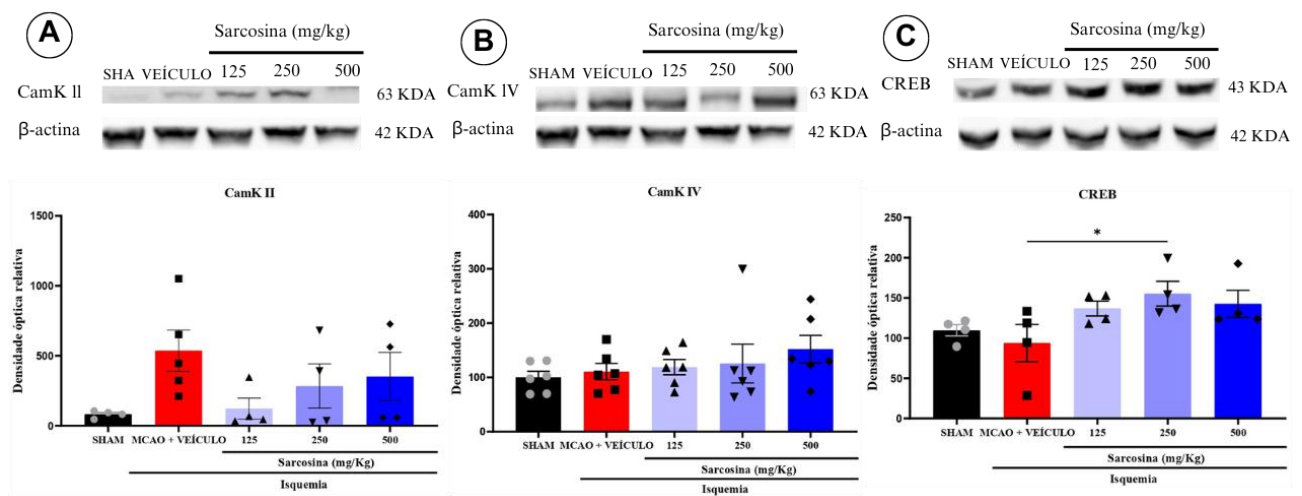


Figura 21. Gráfico representativo de níveis de proteínas CaMKII, CaMK IV e CREB. Experimento realizado 28 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, de 10 a 12 semanas. **A)** O nível de proteína CaMKII aumentou devido ao dano isquêmico, não houve resultado significativo entre os grupos. **B)** O nível de expressão da proteína CaMK IV variou pouco entre os grupos SHAM, MCAO, 125mg/kg, 250mg/kg e 500mg/kg. **C)** Os níveis de expressão de proteína CREB variaram significativamente nos grupos tratados com a dose de 250mg/kg. Resultado apresentado como (média \pm erro padrão da média) N= 4.

Os resultados obtidos para a avaliação da proteína CaMKII mostraram que os animais SHAM apresentaram uma expressão reduzida de CaMKII, com média igual a $(82,32 \pm 12,74)$ em comparação com os animais submetidos à isquemia, grupo MCAO, média $(536,4 \pm 148)$, porém, não houve diferença no nível de expressão da proteína CaMKII. Os grupos tratados com sarcosina nas doses de 125 mg/kg, média $(123,1 \pm 74,93)$, 250 mg/kg, média $(284,1 \pm 157,7)$ e 500 mg/kg, média $(351,4 \pm 172,9)$ não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo MCAO **Figura 21.A**.

Na avaliação da proteína CaMKIV, os níveis de expressão foram bastante próximos entre os diferentes grupos: SHAM $(100 \pm 11,14)$, grupo MCAO $(110,6 \pm 15,15)$, 125 mg/kg

(118,9±14,05), 250 mg/kg (125,6±35,70) e 500 mg/kg (152,1±25,33). Isso indica que não houve diferença significativa na expressão de CaMK IV entre os animais normais, animais com isquemia e animais tratados, conforme mostrado no gráfico da **Figura 21.B**.

A análise da proteína CREB não mostrou diferenças no nível de expressão da proteína entre os grupos SHAM (109,7±7,09) e grupo MCAO (93,84±23,19), ($p<0,8$). Os animais que compõem o grupo tratado na dose de 250 mg/kg (155,3±15,47), ($p<0,04$), as doses de 250mg/kg (155,3±15,4) e 500 mg/kg (142,7±16,78) apresentaram uma pequena redução em comparação à dose de 250 mg/kg, e não apresentaram resultado significância. Esses dados estão organizados na **Figura 21.C**. e indicam que a sarcosina pode ter um efeito positivo na recuperação dos níveis de CREB em animais submetidos à isquemia cerebral.

6.4. O tratamento crônico com Sarcosina aumenta a expressão de BDNF em camundongos submetidos ao modelo de MCAO

Os resultados mostraram que os animais do grupo SHAM, média (105,6±4,58), ($p<0,001$. One-way ANOVA) apresentaram níveis de BDNF normais, sem nenhum tipo de alteração. Enquanto, no grupo MCAO, média (64,61±10,79), o nível de BDNF diminuiu drasticamente, indicando um impacto negativo significativo ocasionado pelo processo isquêmico. Os animais que receberam tratamento com sarcosina na dose de 125 mg/kg (113,4±3,42), ($p<0,0003$. One-way ANOVA) mostraram uma recuperação significativa nos níveis de BDNF. Os animais tratados com doses de 250 mg/kg (97,36±4,22), ($p<0,008$. One-way ANOVA) e 500 mg/kg (101,9±6,24), ($p<0,003$. One-way ANOVA), também mostraram melhoras significativas nos níveis de BDNF, **Figura 22.A**.

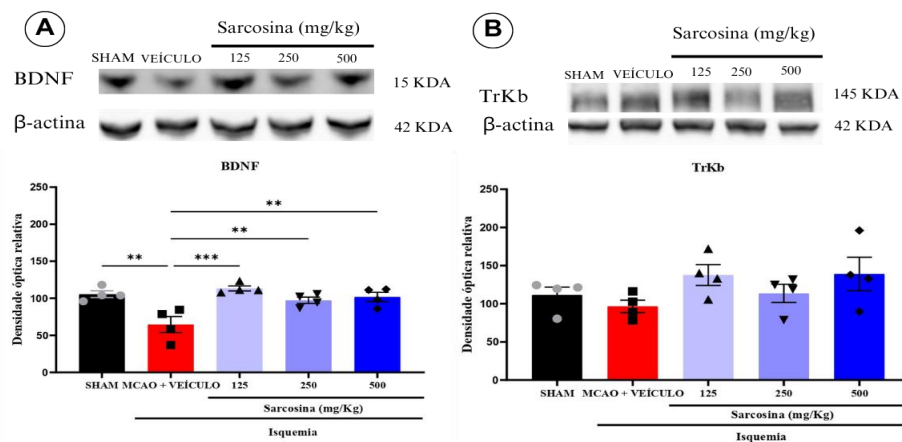


Figura 22. Gráfico representativo da expressão de proteínas BDNF e TrKb. Experimento realizado 28 dias após a indução do modelo de MCAO em camundongos *Swiss*, machos, de 10 a 12

semanas. **A)** O tratamento com sarcosina aumenta os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro nos grupos de tratamento. **B)** Os níveis de expressão da proteína TrkB entre os grupos não houve alteração significativa. Resultado apresentado como (média \pm erro padrão da média) N= 4.

Os níveis de expressão de proteína TrkB nos grupos: SHAM (111.4 ± 10.38), MCAO (96.50 ± 8.23), 125 mg/kg (137.6 ± 13.65), 250 mg/kg (113.6 ± 11.88) e 500 mg/kg (139 ± 21.85), teve leves variações na média dos grupos, no entanto, não houve valor significativo entre os grupos conforme ilustrado na **Figura 22.B**.

7. Discussão

O tratamento com sarcosina apresentou um efeito benéfico em tratamentos agudos e crônicos no modelo de isquemia cerebral focal. Inicialmente, avaliamos o processo isquêmico e conduzimos uma análise histoquímica utilizando o cloreto de 2,3,5-Trifenitetrazólio (TTC) para determinar o volume do infarto após 5 dias de tratamento com sarcosina. Foi observado que os animais submetidos ao tratamento com sarcosina nas concentrações de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg apresentaram uma redução significativa na área total da lesão. Isso sugere que o tratamento com sarcosina ao longo desses 5 dias resultou em uma diminuição da área isquêmica. Esse achado é consistente com os resultados obtidos por Pinto e colaboradores no ano de 2015, (67).

Em 2016, Huang e colaboradores descreveram o papel da glicina, um neurotransmissor inibitório que é sensível à estricnina e atua no sistema nervoso central. A glicina é regulada por dois transportadores específicos, GlyT1 e GlyT2. Conforme evidenciado na literatura, os receptores de glicina (GlyR) são essenciais para o funcionamento do hipocampo e do córtex cerebral, onde coativa os receptores NMDA em conjunto com o glutamato. Estudos têm demonstrado que a glicina desempenha um papel fundamental tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, incluindo a plasticidade sináptica e a resposta pós-isquêmica no sistema nervoso central (SNC). Pesquisas mais recentes, como as citadas por Marques et al., em 2020 e estudos de Shahsavari et al., em 2021, indicam que o bloqueio do transportador de glicina tipo 1 (GlyT1) pode resultar em um aumento na ativação da transmissão sináptica dependente dos receptores NMDAR. Este mecanismo sugere um potencial terapêutico na modulação de GlyT1, particularmente em condições patológicas que afetam a neurotransmissão e a neuroplasticidade, (37-68-69).

Realizamos um experimento crônico com 28 dias para avaliar o efeito da sarcosina no processo isquêmico. Os dados comportamentais coletados em três tempos distintos possibilitam acompanhar o desempenho da sarcosina como possível mediador no processo de neuroproteção e neuro reparação como indicado no estudo de Tanas et al., 2022, (70). Os dados comportamentais mostram que, durante o teste comportamental *Limb Clasp* realizado no dia 7, constatou que houve uma diferença significativa entre os animais SHAM e MCAO. A torção de membro foi mais acentuada entre os animais do grupo MCAO em relação aos animais do grupo SHAM, os grupos que foram tratados com sarcosina tiveram uma melhora na torção do membro indicando que a sarcosina atuou positivamente no processo de recuperação ao dano isquêmico.

Houve diminuição na torção dos membros nos animais que foram tratados com sarcosina, esses dados foram consistentes até os últimos testes comportamentais. Isso indica que a sarcosina promoveu uma proteção e ajudou na redução do dano ocasionado pela isquemia, esse resultado é corroborado por estudos anteriores (46-67). Também sugerem que o composto sarcosina atua inibindo seletivamente o transportador de GlyT1, o que contribui para a proteção das regiões afetadas pelo dano isquêmico, preservando as funções motoras e cognitivas do animal.

Realizamos a avaliação do uso alternado de patas nos animais por meio do teste do cilindro. Aqueles que apresentaram dano isquêmico induzido na região direita do cérebro manifestaram comprometimento na movimentação da pata dianteira CONTRALATERAL do animal, o que levou a um aumento no uso da pata IPSILATERAL, conforme detalhado no estudo de Roome et al. (71). Os comportamentos dos animais foram registrados nos dias 7, 14 e 28. Esse acompanhamento nos permitiu observar que após 7 dias de tratamento, apenas a dose de 125 mg/kg demonstrou ter um efeito protetor, melhorando o uso da pata CONTRALATERAL.

No dia 14 da avaliação, ficou evidente que o tratamento com sarcosina levou os animais dos grupos 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg apresentaram médias significantes no uso alternado das patas IPSILATERAL e CONTROLATERAL quando comparados aos animais do grupo MCAO. Esse resultado reforça que o tratamento com sarcosina ao longo do tempo tende a promover uma melhora no dano. Esse resultado foi corroborado pela pesquisa de Rojas et al. e pelos resultados comportamentais observados no dia 28, onde os animais dos grupos tratados que inicialmente demonstraram uma menor mobilidade na pata contralateral apresentaram uma notável recuperação em comparação ao grupo submetido à isquemia e tratado com salina (72).

Além de avaliarmos a função motora dos animais, realizamos testes comportamentais para avaliar a memória desses animais após 28 dias do processo isquêmico. Como cada teste comportamental possui sua especificidade, realizamos o teste de campo aberto (*Open Field*) para validar os testes de memória. A partir dos dados coletados durante a aplicação desse teste, observamos que os animais não apresentaram diferenças significativas na distância percorrida e nem no cruzamento de zonas entre os grupos amostrais. Essa informação foi essencial para concluir que todos os animais estavam aptos para realizar os testes de memória. Os resultados obtidos no treino do teste OLT demonstraram que nenhum dos animais apresentou preferência por objetos específicos colocados no aparato. Durante a execução do teste OLT, observamos que os animais do grupo MCAO continuaram a explorar ambos os objetos, indicando um déficit na memória desses animais. Em contrapartida, os animais do grupo SHAM demonstraram interesse na novidade, que, neste caso, era o objeto movido de lugar. Esse mesmo padrão de comportamento foi observado nos grupos de tratamento (125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg), esse resultado é corroborado por trabalho Denninger et al., em 2018, em seu estudo.

O tratamento com o composto sarcosina resultou na melhora da função cognitiva dos animais dos grupos tratados após o período de 28 dias. Isso sugere que a sarcosina atua modulando vias importantes para a formação de memória e para a recuperação ao dano isquêmico (73). Em 2019 foram publicados estudos que propõem que o tratamento com glicina resulta na redução do volume de infarto cerebral, nos escores de função neurológica e na morte neuronal e microglial na lesão de acidente vascular cerebral isquêmico. Esse resultado corrobora com o achado deste trabalho ao qual observamos desempenho da sarcosina no processo de neuroproteção e possivelmente atuação no neuroreparo, esses achados também se assimilam com resultados obtidos por Pinto e colaboradores, (67-73-74).

Após realizar o experimento de *Western Blotting* para investigar a expressão de GlyR, GlyT1 e GlyT2 em condições de isquemia e avaliação do neuroreparo, observamos resultados significativos nos grupos de camundongos tratados com sarcosina. Os animais tratados com sarcosina nas concentrações de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg mostraram uma expressão aumentada de GlyR em comparação com os animais do grupo MCAO. Esses resultados indicam que a sarcosina, ao bloquear os transportadores de glicina, aumentam a disponibilidade de glicina na fenda sináptica, resultando em uma maior expressão de GlyR e favorecendo o processo de neuroreparo na isquemia cerebral, como sugere o estudo de Ribeiro et al., (75). Os níveis de GlyR nos animais do grupo SHAM se assimilam aos níveis dos animais tratados com sarcosina, corroborando a eficácia do tratamento com sarcosina no processo de restaurar ou manter os níveis normais de GlyR.

A análise de *Western Blotting* para avaliar os níveis de expressão de GlyR, GlyT1 e Glyt2 em animais isquêmicos mostraram que a sarcosina aumenta a expressão de GlyR e Glyt1. Por outro lado, o nível de Glyt2 aumentou nos animais MCAO sugere que embora essa proteína está associada como processo de recaptação da glicina na fenda sináptica esse processo pode ser comprometido com o dano isquêmico, esse achado é bastante similar ao trabalho realizado em 2017 por Francisco Zafra e colaboradores, (76). Essa modulação na expressão dos níveis de GlyR, GlyT1 e Glyt2 nos grupos que receberam tratamento com sarcosina pode ser um indicador de um mecanismo de resposta ao aumento da disponibilidade de glicina na fenda sináptica. A sarcosina, ao bloquear os transportadores de glicina, impede a remoção desta do espaço sináptico, o que pode levar a uma regulação compensatória na expressão de GlyT1 para tentar restaurar a homeostase, (37). Esse aumento no nível de GlyT1 e Glyt2 pode influenciar mecanismos de neuroproteção e possivelmente atuar nos mecanismos de neuroreparo, pois permite modular a quantidade de glicina na fenda sináptica.

Os resultados da expressão das subunidades GluN1, GluN2A e GluN2B nos grupos SHAM, MCAO, 125mg/kg, 250, mg/kg e 500mg/kg de Sarcosina, evidenciaram as complexidades da resposta neural após um evento isquêmico e o potencial terapêutico da sarcosina. Para as subunidades GluN1 e GluN2A, observou-se um leve aumento na expressão, mas não apresentou resultado estatístico significativo.

Avaliamos os níveis de expressão de subunidades associadas ao receptor NMDA, em específico, a expressão das subunidades GluN1, GluN2A e GluN2B em animais tratados com sarcosina 28 dias após a indução do modelo de MCAO. Foi observado que a sarcosina ocasionou um leve aumento no grupo tratado com sarcosina, porém, os níveis de expressão da subunidade GluN1 e GluN2A não tiveram valor significativo. No ano de 2021 Mihym e colaboradores descreveram em seu trabalho que o aumento de expressão de GluN1 e GluN2A, contribui em um possível mecanismo de neuro reparação. O trabalho sugere que o aumento seletivo da ativação do receptor NMDA contendo GluN2A pode ser uma terapia promissora para o acidente vascular cerebral, pois o aumento da atividade extrasináptica do receptor NMDA desencadeia a morte celular após o acidente vascular cerebral, (77).

O tratamento com sarcosina aumentou a expressão da subunidade GluN2B no grupo MCAO, houve um aumento significativo na expressão desta proteína quando comparado ao grupo SHAM, sugerindo que a GluN2B pode estar associada a uma desregulação ocasionada pelo dano isquêmico. Por outro lado, o tratamento com sarcosina nos animais tratados com sarcosina nas doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg normalizou o nível de expressão da proteína GluN2B. Isso sugere que o controle da expressão da GluN2B está possivelmente ligado

a mecanismos que favorecem processos de neuroproteção e neuroreparo como sugeriu também HAN e colaboradores. em seu estudo, (78).

A inibição da subunidade GluN2B do NMDA em camundongos pode reduzir a excitotoxicidade e proteger as células cerebrais normais, melhorando potencialmente. Esses resultados, em conjunto, sugerem que a sarcosina pode influenciar a expressão de subunidades específicas dos receptores NMDA de forma dose-dependente, potencialmente modulando respostas celulares após a isquemia e promovendo a neuroproteção e possivelmente atua em vias essenciais para o neuroreparo, (79-80).

Avaliamos os níveis de proteínas que estão associadas a via CREB, as proteínas CaMKII e CaMK IV foram analisadas nos animais após o tratamento de 28 dias com a sarcosina. Foi observado que os níveis de CaMKII aumentaram no grupo MCAO e expressou uma leve queda aproximando dos níveis normais, porém, não houve resultado significativo. A CaMK IV mostrou que os animais que foram tratados com sarcosina aumentaram o nível de expressão dessa proteína, mas não houve resultado significativo entre os cinco grupos após o tratamento com sarcosina. O nível de proteína CREB foram analisadas no processo isquêmico após 28 dias de tratamento com sarcosina. Observamos que os níveis de proteínas associadas a CREB sofrem uma diminuição após o processo de isquemia, por outro lado, os grupos que foram tratados com sarcosina modulam os níveis de proteínas CREB, melhorando a condição isquêmica dos animais. Esse resultado é respaldado por trabalhos encontrados na literatura e pode sugerir que a sarcosina fornece neuroproteção através da ativação de CREB, levando animais isquêmicos a melhora cognitiva e motora em relação ao MCAO (81-82).

Para avaliar o nível de expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) após 28 dias da indução do modelo de isquemia. Observamos que os níveis de BDNF nos animais que compõem o grupo MCAO apresentaram níveis baixos de expressão, mostrando que o quadro isquêmico compromete a expressão desse fator no cérebro. O nível de BDNF aumentou consideravelmente nos animais tratados com sarcosina nas concentrações de 125mg/kg, 250mg/kg e 500mg/kg. Esses resultados sugerem que a sarcosina atenua os efeitos negativos ocasionados pela isquemia sobre os níveis de expressão de BDNF, contribuindo para a recuperação da via de sinalização celular associada ao fator neurotrófico.

Além disso, estudos relacionados mostram que o aumento da expressão de BDNF em ratos neonatos promove a sobrevivência neuronal e a regeneração axonal através da regulação negativa de VDAC1 e da regulação positiva de Stx1b, oferecendo um potencial tratamento para isquemia cerebral e defeitos neurológicos induzidos por hipóxia. Esses achados, em conjunto, sugerem que a sarcosina tem um efeito benéfico na modulação dos níveis de CREB e BDNF,

bem como na expressão das subunidades dos receptores NMDA após isquemia, contribuindo para a neuroproteção e pode estar associado a ativação dos mecanismos de reparo, (83-84-85).

8. Conclusão

Concluimos que o tratamento com sarcosina demonstrou ser uma intervenção promissora no contexto do acidente vascular encefálico isquêmico induzido em animais. Ao longo do estudo, observamos uma redução significativa na área total da lesão isquêmica em animais submetidos ao tratamento com diferentes doses de sarcosina, indicando um efeito benéfico do tratamento sobre o dano isquêmico.

Além disso, a melhora observada tanto na função motora quanto na cognitiva destes animais reforça a eficácia da sarcosina como agente neuroprotetor e possivelmente neuroreparador. Estes resultados, respaldados por pesquisas anteriores, sugerem que a sarcosina pode representar um avanço promissor na busca por terapias para a recuperação de danos causados pelo processo isquêmico.

Assim, este estudo reforça a hipótese de que a sarcosina apresenta potencial terapêutico na recuperação neuronal e na redução do dano isquêmico, isso representa um avanço importante no campo da terapia para casos de isquemia cerebral. Entretanto, é necessário ressaltar a necessidade de pesquisas adicionais para uma compreensão mais abrangente e aprofundada do mecanismo de ação deste tratamento.

9. Anexos



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



CERTIFICADO

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

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

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



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada " **Avaliação do efeito do tratamento com sarcosina em modelos animais de demência vascular e isquemia cerebral**", registrada com o protocolo nº **049/23**, sob a responsabilidade de **Eduardo Rosa da Silva** e **Mauro Cunha Xavier Pinto** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **31/07/2023**.

- Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 31/07/2023 a 30/12/2027
- Espécie/linhagem/raça: Camundongos Swiss
- N° de animais autorizados: 214
- Peso/Idade: 30 a 50 gramas; 8 a 10 semanas
- Sexo: machos
- Instalação onde serão mantidos os animais: Biotério DCiF/DFAR
- Origem (fornecedor): Biotério Central da UFG

10. Referências

1. Acidente Vascular Cerebral (AVC, AVE ou derrame). Disponível em: <<https://www.sbgg-sp.com.br/acidente-vascular-cerebral-avc-ave-ou-derrame/>>. Acesso em: 15 jul. 2024.
2. KRISHNAMURTHI, R.V.; IKEDA, T.; FEIGIN, V. L. Global, Regional, and Country-Specific Burden of Ischemic Stroke, Intracerebral Hemorrhage, and Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Neuroepidemiology*, v. 2, p. 171-179, 2020.
3. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>>. Acesso em: 15 jul. 2024.
4. VIKTORISSON, A.; et al. Associations of prestroke physical activity with stroke severity and mortality after intracerebral hemorrhage compared with ischemic stroke. *Neurology*, v. 99, n. 19, p. e2137-e2148, 2022.
5. Números do AVC no Brasil e no Mundo. Disponível em: <<https://avc.org.br/sobre-a-sbavc/numeros-do-avc-no-brasil-e-no-mundo/>>. Acesso em: 15 jul. 2024.
6. SACCO, R. L.; et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, v. 44, n. 7, p. 2064-2089, 2013.
7. BARTHELIS, D.; DAS, H. Current advances in ischemic stroke research and therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 4, p. 165260, 2020.
8. FUKUTA, T.; et al. Combination therapy with liposomal neuroprotectants and tissue plasminogen activator for treatment of ischemic stroke. *The FASEB Journal*, v. 31, n. 5, p. 1879-1890, 2017.
9. CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS). Recomendação nº 5 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Agudo. Brasília – DF, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/ptbr/midias/consultas/relatorios/2021/20211230_relatorio_recomendacao_avci_agudo_cp110.pdf. Acesso em: 14 de maio de 2024.
10. CRAMER, S. C. Recovery after stroke. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, v. 26, n. 2, p. 415-434, 2020.
11. BERKHEMER, O. A.; et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *New England Journal of medicine*, v. 372, n. 1, p. 11-20, 2015.

12. BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Agudo. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/ptbr/midias/consultas/relatorios/2021/20211230_relatorio_recomendacao_avci_agudo_cp110.pdf>. Acesso em: 12 de nov. 2023.
13. Dastur, C.; Yu, W. Current management of spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke and Vascular Neurology*, v. 2, p. 21-29.2017
14. KLEINDORFER, D.; et al. guideline for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, v. 52, n. 7, p. e364-e467, 2021.
15. YE, S.; et al. Shenzhen stroke emergency map improves access to rt-PA for patients with acute ischaemic stroke. *Stroke and Vascular Neurology*, v. 4, n. 3, 2019.
16. ZHU, T.; et al. Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: Applications for natural compounds from medicinal herbs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 148, p. 112-719, 2022.
17. HAUPT, M.; et al. Quest for Quality in Translational Stroke Research—A New Dawn for Neuroprotection?. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 10, p. 5381, 2022.
18. BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery*, v. 111, n. 6, p. 483-495, 2009.
19. SZYDŁOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium*, v. 47, n. 2, p. 122-129, 2010.
20. PEREZ, P.; MIGUEL, A.; DAVE, K. R.; RAVAL, A. P. Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. *Antioxidants & redox signaling*, v. 7, n. 9-10, p. 1150-1157, 2005.
21. PUISIEUX, F.; et al. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. *Brain research*, v. 1027, n. 1-2, p. 30-37, 2004.
22. KURIAKOSE, D.; XIAO, Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 20, p. 7609, 2020.
23. MORETTI, A.; FERRARI, F.; VILLA, R. F. Neuroprotection for ischaemic stroke: status and challenges. *Pharmacology & therapeutics*, v. 146, p. 23-34, 2015.
24. HAUPT, M.; et al. Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 5, p. 34-43, 2023.

25. LA RUSSA, D.; et al. Zeaxanthin exerts anti-inflammatory effects in vitro and provides significant neuroprotection in mice subjected to transient middle cerebral artery occlusion. *PharmaNutrition*, v. 10, n. 3, p. 68, 2024.
26. CHIA, G. Y.Y.; et al. Neuroprotective agents in acute ischemic stroke. *Exploration of Neuroprotective Therapy*, v. 3, n. 1, p. 47-70, 2023.
27. SMITH, S. J.; VON ZASTROW, M. A molecular landscape of mouse hippocampal neuromodulation. *Frontiers in Neural Circuits*, v. 16, p. 836-930, 2022.
28. ROYO, J. Performances cognitives et neurogenèse au cours du vieillissement chez un primate non-humain. 2020. Tese de Doutorado. Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.
29. ZHAO, C.; JOLKKONEN, J. Neurorepair Strategies After Stroke. *Stroke Revisited: Pathophysiology of Stroke: From Bench to Bedside*, p. 281-291, 2020.
30. KASAHARA, Y.; et al. L-DOPA-induced Neurogenesis in the Hippocampus is Mediated through GPR143, a Distinct Mechanism of Dopamine. *Stem Cells*, v. 40, n. 2, p. 215-226, 2022.
31. MUSAELYAN, K.; et al. Chronic stress induces significant gene expression changes in the prefrontal cortex alongside alterations in adult hippocampal neurogenesis. *Brain Communications*, v. 2, n. 2, p.153, 2020.
32. COLUCCI-D'AMATO, L.; SPERANZA, L.; VOLPICELLI, F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 20, p. 77-77, 2020.
33. BAI, L.; et al. Brain-derived neurotrophic factor induces thioredoxin-1 expression through the TrkB/Akt/CREB pathway in SH-SY5Y cells. *Biochemistry*, v. 160, p. 55-60, 2019.
34. MELO, C. V.; et al. Spatiotemporal resolution of BDNF neuroprotection against glutamate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, v. 237, p. 66-86, 2013.
35. LAI, T. W.; SHYU, W. C.; WANG, Y. T. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends in molecular medicine*, v. 17, n. 5, p. 266-275, 2011.
36. HILL, J. D.; et al. Activation of GPR55 induces neuroprotection of hippocampal neurogenesis and immune responses of neural stem cells following chronic, systemic inflammation. *Brain, behavior, and immunity*, v. 76, p. 165-181, 2019.

37. MARQUES, B. L.; et al. Neurobiology of glycine transporters: From molecules to behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 118, p. 97-110, 2020.
38. JAYARAMAN, K.; et al. SLC6 transporter oligomerization. *Journal of Neurochemistry*, v. 157, n. 4, p. 919-929, 2021.
39. ULLAH, R.; et al. Glycine, the smallest amino acid, confers neuroprotection against D-galactose-induced neurodegeneration and memory impairment by regulating c-Jun N-terminal kinase in the mouse brain. *Journal of Neuroinflammation*, v. 17, p. 1-21, 2020.
40. YOO, M.; et al. Glycine transporter 1 (GlyT1) is a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, v. 18, n. 6, p. 44-68, 2022.
41. RODEK, P.; et al. Association Study of the SLC1A2 (rs4354668), SLC6A9 (rs2486001), and SLC6A5 (rs2000959) Polymorphisms in Major Depressive Disorder. *Journal of Clinical Medicine*, v. 11, n. 19, p. 5914, 2022.
42. ERDEM, F. A.; et al. A comparison of the transport kinetics of glycine transporter 1 and glycine transporter 2. *Journal of General Physiology*, v. 151, n. 8, p. 1035-1050, 2019.
43. JIMÉNEZ, E.; et al. Regulation of the Glycine Transporter GLYT1 by microRNAs. *Neurochemical Research*, p. 1-10, 2021.
44. HARSING JR, L. G.; et al. Glycine transporter type-1 and its inhibitors. *Current medicinal chemistry*, v. 13, n. 9, p. 1017-1044, 2006.
45. BAE, M.; et al. SLC6A20 transporter: a novel regulator of brain glycine homeostasis and NMDAR function. *EMBO Molecular Medicine*, v. 13, n. 2, p. e12632, 2021.
46. PINTO, M. C. X., et al. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning. *Neurochemistry international*, v. 61, n. 5, p. 713-720, 2012.
47. PEI, Ju-Chun et al. Therapeutic potential and underlying mechanism of sarcosine (N-methylglycine) in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor hypofunction models of schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology*, v. 33, n. 10, p. 1288-1302, 2019.
48. ZHANG, H.; X.; HYRC, K.; THIO, L. L. The glycine transport inhibitor sarcosine is an NMDA receptor co-agonist that differs from glycine. *The Journal of physiology*, v. 587, n. 13, p. 3207-3220, 2009.
49. MATTE, A.; et al. Bitopertin, a selective oral GLYT1 inhibitor, improves anemia in a mouse model of β -thalassemia. *JCI insight*, v. 4, n. 22, 2019.

50. UMBRICHT, D.; et al. Effect of bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, on negative symptoms of schizophrenia: a randomized, double-blind, proof-of-concept study. *JAMA psychiatry*, v. 71, n. 6, p. 637-646, 2014.
51. ZHANG, W.; et al. Glycine/glycine N-methyltransferase/sarcosine axis mediates benzene-induced hematotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 428, p. 115682, 2021.
52. ZAKOWICZ, P.; PAWLAK, J. Glycine transporters in schizophrenia. A new hope or informational noise? *Psychiatria Polska*, v. 56, n. 2, p. 217-228, 2022.
53. CHIANG, T.; MESSING, R. O.; CHOU, W. H. Modelo de rato de oclusão da artéria cerebral média. *JoVE (Jornal de Experimentos Visualizados)*, n. 48, p. 27-61, 2011.
54. MCTI. Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15.02.2018. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_37_de_15022018.html#:~:text=Baixa%20a%20Diretriz%20da%20Pr%C3%A1tica>. Acesso em: 23 out. 2023.
55. SCHALLERT, T.; FLEMING, S. M.; LEASURE, J. L.; TILLERSON, J. L. *et al.* CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 39, n. 5, p. 777-787, 2000.
56. CONTI, E.; CARLINI, N.; PICCARDI, B.; MASCARO, A. L. A. et al. Photothrombotic Middle Cerebral Artery Occlusion in mice: a novel model of ischemic stroke. *eneuro*, 10, n. 2, 2023.
57. MIEDEL, C. J.; PATTON, J. M.; MIEDEL, A. N.; MIEDEL, E. S. et al. Assessment of spontaneous alternation, novel object recognition and limb claspings in transgenic mouse models of amyloid- β and tau neuropathology. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 123, p. e55523, 2017.
58. PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.
59. NADEL, J. A.; PAWELKO, S. S.; COPES-FINKE, D.; NEIDHART, M. et al. Lesion of striatal patches disrupts habitual behaviors and increases behavioral variability. *PLoS One*, 15, n. 1, p. e0224715, 2020.
60. KRAEUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. *Pre-clinical models: techniques and protocols*, p. 99-103, 2019.

61. VOGEL, C. A.; WOOD, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. *Current protocols in neuroscience*, v. 69, n. 1, p. 8.31. 31-38.31. 17, 2014.
62. DENNINGER, J. K.; SMITH, B.; KIRBY, E. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 141, p. 85-93, 2018.
63. JOSHI, C. N.; JAIN, S. K.; MURTHY, P. S. R. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain research protocols*, 13, n. 1, p. 11-17, 2004.
64. VAYANAPERUMAL, K. Western Blotting a review: Principle, protocol and problem solving. *GSC Advanced Research and Reviews*, v. 16, n. 3, p. 178-187, 2023.
65. KANG, C. C.; et al. Single cell-resolution western blotting. *Nature protocols*, v. 11, n. 8, p. 1508-1530, 2016.
66. BEGUM, H.; MURUGESAN, P.; TANGUTUR, A. D. Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*, v. 73, n. 1, p. 58-69, 2022.
67. PINTO, M. C. X.; et al. Glycine transporters type 1 inhibitor promotes brain preconditioning against NMDA-induced excitotoxicity. *Neuropharmacology*, v. 89, p. 274-281, 2015.
68. HUANG, B.; et al. GlyT1 inhibitor NFPS exerts neuroprotection via GlyR alpha1 subunit in the rat model of transient focal cerebral ischaemia and reperfusion. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 1952-1962, 2016.
69. SHAHSAVAR, A.; STOHLER, P.; et al. Insights estruturais sobre an inibição da recaptação de glicina. *Nature*, v.5, n.91, p. 677 - 681.2021
70. TANAS, A.; et al. Efeitos neuroprotetores in vitro e in vivo da sarcosina. *Pesquisa BioMed internacional*, v. 1, n.5, p. 467-498, 2022.
71. ROOME, R. B.; VANDERLUIT, J. L. Paw-dragging: a novel, sensitive analysis of the mouse cylinder test. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 98, p. e52701, 2015.
72. ROJAS, V.; ARMSHAW, J.; BECKER, A. M. Abstract TP239: The Cylinder Project: Pre-And Post-stroke Assessment. *Stroke*, v. 54, n. 1, p. 239-239, 2023.
73. MODARRESI, F.; et al. A novel knockout mouse model of the noncoding antisense Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) gene displays increased endogenous Bdnf protein and improved memory function following exercise. *Heliyon*, v. 7, n. 7, 2021.

74. LIU, R.; et al. Glycine exhibits neuroprotective effects in ischemic stroke in rats through the inhibition of M1 microglial polarization via the NF- κ B p65/Hif-1 α signaling pathway. *The Journal of Immunology*, v. 202, n. 6, p. 1704-1714, 2019.
75. RIBEIRO, R. I.; et al. Inhibition of the glycine transporter-1 by NFPS promotes neuroprotection against striatal damage models. *Neuroscience Letters*, v. 826, p. 137-715, 2024.
76. ZAFRA, F.; IBÁÑEZ, I.; GIMÉNEZ, C. Glycinergic transmission: glycine transporter GlyT2 in neuronal pathologies. *Neuronal Signaling*, v. 1, n. 1, p. 201-600, 2016.
77. BAE, M.; et al. SLC6A20 transporter: a novel regulator of brain glycine homeostasis and NMDAR function. *EMBO Molecular Medicine*, v. 13, n. 2, p. e12632, 2021.
78. HAN, W.; et al. Opportunities for precision treatment of GRIN2A and GRIN2B gain-of-function variants in triheteromeric N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 381, n. 1, p. 54-66, 2022.
79. ZHOU, X.; et al. Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 33, p. 24151-24159, 2013.
80. BAI, L.; et al. Brain-derived neurotrophic factor induces thioredoxin-1 expression through the TrkB/Akt/CREB pathway in SH-SY5Y cells. *Biochemistry*, v. 160, p. 55-60, 2019.
81. SUN, P.; et al. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & development*, v. 8, n. 21, p. 2527-2539, 1994.
82. MOZAFFARI, S.; et al. Crocin acting as a neuroprotective agent against methamphetamine-induced neurodegeneration via CREB-BDNF signaling pathway. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, v. 18, n. 2, p. 745, 2019.
83. XU, L.Z.; et al. NMDA receptor GluN2B subunit is involved in excitotoxicity mediated by death-associated protein kinase 1 in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 91, n. 2, p. 877-893, 2023.
84. LEJKOWSKA, R.; et al. Pre-clinical evaluation of the long-term neuroprotective effects of BDNF-engineered mesenchymal stromal cells as intravitreal therapy for chronic retinal degeneration in Rd6 mutant mice. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 3, p. 777, 2019.

85. PRADHAN, J.; NOAKES, P. G.; BELLINGHAM, M. C. The role of altered BDNF/TrkB signaling in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 13, p. 368, 2019.