



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Efeito Neuroprotetor da Inibição do Transportador de Glicina do Tipo 1

Mauro Cunha Xavier Pinto

Belo Horizonte

2014

Mauro Cunha Xavier Pinto

Efeito Neuroprotetor da Inibição do Transportador de Glicina do Tipo 1

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Co-orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Belo Horizonte

2014

Colaboradores

Prof. Dr. Marcus Vinícius Gomez ⁱ

Prof. Dr. Marco Aurélio Romano-Silva ⁱⁱ

Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira ⁱⁱⁱ

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende ^{iv}

- i. Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Santa Casa de Belo Horizonte.
- ii. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.
- iii. Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- iv. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Suporte Financeiro

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPEMIG- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CNPq- Conselho Nacional de Pesquisa

Dedico este trabalho a meus pais, Mauro e Margaret, a meu irmão, Danilo, e ao meu amor, Cristina, que são a minha motivação, força e inspiração.

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam.”

Bernard Shaw

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Renato Santiago Gomez, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por sua contribuição científica e pelo exemplo pessoal para minha formação.

Ao Laboratório de Neurociências e aos professores Prof. Dr. Marcus Vinicius Gomez e Prof. Dr. Marco Aurélio Romano-Silva, pela contribuição científica e possibilitar a realização de experimentos de microscopia, bioquímica e neuroquímica.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Massensini, pela contribuição científica nos procedimentos para isquemia cerebral e estresse oxidativo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende e a Prof^a. Dr^a. Maria José Nunes de Paiva, pela contribuição científica nos procedimentos de análise de neurotransmissores por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

Ao Prof. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, pelas discussões científicas e pelo apoio na nova fase deste projeto.

Á Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Leite, por gentilmente ceder o laboratório para avaliações no espectrofotômetro.

Ao Prof. Bruno Rezende de Souza, pelo exemplo e por apresentar novos horizontes que a pesquisa científica nos possibilita explorar.

Á Dr^a. Daniela Valadão, pela contribuição científica e treinamento na arte de fazer um Western Blot.

Ao Dr. Fabrício Simão, pela contribuição científica na realização da cirurgia de isquemia cerebral.

Aos meus colegas de laboratório, Flávio Mourão, Nancy Binda, Hércules Leite, Flávia Lages, Onésia Cristina, Daniela Valadão e Isabel Vieira por todo apoio na realização dos experimentos e desenvolvimento do projeto.

Á minha família, pela confiança, suporte e pela educação que me guiou para este caminho e me levará muito mais adiante.

Aos meus amigos e colegas Flávio Carvalho, Mateus, Luana, Marco Antônio, Lockmann, Soraia, Paula, Isabel, Daniel, Elizete, Célio que contribuíram com ótimas conversas e boas risadas.

À Cristina, minha namorada, pelo amor, carinho, dedicação e a companhia durante todo o tempo de realização deste projeto, por ser minha inspiração e fonte de motivação.

Sumário

1.	Introdução	18
1.1.	Neurotransmissão Glutamatérgica	18
1.2.	Neurotransmissão Glicinérgica	21
1.3.	Isquemia Cerebral e Excitotoxicidade	24
1.4.	Tolerância isquêmica e pré-condicionamento cerebral	27
1.5.	Inibidores dos Transportadores de Glicina do Tipo I	29
2.	Premissas e Hipótese	31
3.	Justificativa	32
4.	Objetivos	33
4.1.	Objetivo Geral	33
4.2.	Objetivos específicos	33
5.	Material e Métodos	34
5.1.	Animais	34
5.2.	Fármacos e regime de tratamento	34
5.3.	Soluções	34
5.4.	Preparação de material para análises	35
5.4.1.	Preparação de fatias de hipocampo para o processo de isquemia	35
5.4.2.	Preparação de fatias de hipocampo para análises bioquímicas	35
5.4.3.	Preparação de fatias de hipocampo para análises neuroquímicas	35
5.5.	Modelo de privação de oxigênio-glicose (POG) em fatias de hipocampo	36
5.5.1.	Isquemia em fatias de hipocampo	36
5.5.2.	Determinação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos	36
5.5.3.	Atividade da Lactato desidrogenase	36
5.5.4.	Avaliação de ativação de Caspase-3	37
5.6.	Modelo de isquemia cerebral global	37
5.6.1.	Oclusão de quatro vasos (4VO)	38
5.6.1.	Avaliação da viabilidade celular por marcação histológica com HE	38
5.7.	Modelo de excitotoxicidade	39

5.7.1. Aplicação intrahipocampal de NMDA	39
5.7.2. Avaliação da viabilidade celular por marcação histológica com Fluoro Jade C	39
5.8. Avaliações Bioquímicas	40
5.8.1. Produção de espécies reativas de oxigênio – EROs	40
5.8.2. Produção de óxido nítrico – NO	40
5.8.3. Conteúdo de Glutathione reduzida	40
5.8.4. Atividade da Catalase	41
5.8.5. Atividade de superóxido dismutase (SOD)	41
5.8.6. Atividade de glutathione peroxidase	41
5.8.7. Atividade de glutathione redutase	42
5.8.8. Atividade de glutathione-S-transferase	42
5.9. Avaliações Neuroquímicas	43
5.9.1. Avaliação da liberação de glutamato	43
5.9.2. Avaliação da captação de [3H]glutamato e [3H]glicina	43
5.9.3. Avaliação do conteúdo de aminoácidos	43
5.9.4. Avaliação da expressão de receptores e transportadores	44
5.10. Estatística	45
6. Resultados	46
6.1. Indução farmacológica de tolerância isquêmica pelo pré-condicionamento com sarcosina	46
6.1.1. O pré-condicionamento com sarcosina induz tolerância à isquemia induzida por POG em fatias de hipocampo de ratos	46
6.1.2. Efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com sarcosina	49
6.1.3. O pré-condicionamento com sarcosina reduz a liberação de fatores excitotóxicos em fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG	51
6.1.4. O pré-condicionamento com sarcosina reduz o dano oxidativo durante a isquemia em fatias de hipocampo de ratos	52
6.1.5. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a atividade das enzimas antioxidantes após a isquemia em fatias de hipocampo de ratos	53
6.1.6. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a atividade das enzimas do sistema glutathione após a isquemia em fatias de hipocampo de ratos	54

6.1.7. O pré-condicionamento com sarcosina altera o perfil neuroquímico no hipocampo de ratos	56
6.1.8. O pré-condicionamento com sarcosina altera a expressão de GlyTs	57
6.1.9. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a expressão de transportadores de glutamato	58
6.1.10. O pré-condicionamento com sarcosina altera o transportador de [3H]-Glicina no hipocampo de ratos	59
6.1.11. O pré-condicionamento com sarcosina altera a expressão da subunidade NR2B do receptor de NMDA no hipocampo	60
6.2. Indução farmacológica de tolerância à excitotoxicidade pelo preconditionamento com NFPS	62
6.2.1. Efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NFPS em modelo de excitotoxicidade	62
6.2.2. O pré-condicionamento com NFPS altera o perfil neuroquímico no hipocampo de camundongos	65
6.2.3. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão de transportadores de glicina	66
6.2.4. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão de transportadores de glutamato	67
6.2.5. O pré-condicionamento com NFPS altera a captação de [3H]-glicina e [3H]-glutamato no hipocampo de camundongos	68
6.2.6. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão das subunidades NR2 do receptor de NMDA no hipocampo	69
7. Discussão	70
7.1. Tolerância isquêmica em ratos pré-condicionados com sarcosina	70
7.2. Tolerância isquêmica no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NFPS	77
8. Conclusão	80
9. Perspectivas	81
10. Referências bibliográficas	82
11. Apêndices	93
11.1. Protocolo do CETEA 42/2011	93
11.2. Protocolo do CETEA 182/2013	94
11.3. Publicações	95

11.3.1. Artigos publicados ou aceitos para publicação	95
11.3.2. Artigos submetidos ou em preparação	95
11.3.3. Resumos publicados em anais de congressos	95
12. Anexos	97
12.1. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices	97
12.2. Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography–mass spectrometry method	98

Índice de Figuras

Figura 1. Neurotransmissão glutamatérgica	19
Figura 2. Vias glicinérgicas do SNC	22
Figura 3. Processo de excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos	25
Figura 4. Inibição dos transportadores de glicina do tipo 1	29
Figura 5. O pré-condicionamento com sarcosina induz tolerância à POG em fatias de hipocampo de ratos	47
Figura 6. Imagens representativas do dano isquêmico	49
Figura 7. O pré-condicionamento com sarcosina induz neuroproteção contra a isquemia cerebral global	50
Figura 8. O pré-condicionamento com sarcosina reduz a liberação de fatores excitotóxicos durante a isquemia em fatias de hipocampo de ratos	51
Figura 9. O pré-condicionamento com sarcosina reduz o dano oxidativo durante a isquemia em fatias de hipocampo de ratos	52
Figura 10. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a atividade das enzimas antioxidantes após a isquemia em fatias de hipocampo de ratos	53
Figura 11. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a atividade das enzimas do sistema glutatona após a isquemia em fatias de hipocampo de ratos	54
Figura 12. O pré-condicionamento com sarcosina altera o perfil neuroquímico do hipocampo	56
Figura 13. O pré-condicionamento com sarcosina altera a expressão de transportadores de glicina	57
Figura 14. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a expressão de transportadores de glutamato	58
Figura 15. O pré-condicionamento com sarcosina altera a captação de glicina no hipocampo	59

Figura 16. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a expressão dos sítios de ligação de glicina nos receptores de glicina e NMDA	60
Figura 17. O pré-condicionamento com sarcosina altera a expressão da subunidade NR2B do receptor de NMDA	61
Figura 18. Imagens representativas da proteção gerada pelo pré-condicionamento com NFPS no hipocampo de camundongos submetidos ao insulto excitotóxico	63
Figura 19. O pré-condicionamento com NFPS induz neuroproteção contra o insulto excitotóxico em camundongos	64
Figura 20. O pré-condicionamento com NFPS altera o perfil neuroquímico do hipocampo	65
Figura 21. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão de transportadores de glicina	66
Figura 22. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão de transportadores de glutamato	67
Figura 23. O pré-condicionamento com NFPS altera a captação de [³ H]-glicina e [³ H]-glutamato no hipocampo de camundongos	68
Figura 24. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão da subunidade NR2B do receptor de NMDA	69
Figura 25. Mecanismo de neuroproteção durante o evento excitotóxico	73
Figura 26. Mecanismo de neuroproteção proposto do pré-condicionamento com inibidores do transportador de glicina do tipo 1	75

Lista de abreviaturas

4VO - modelo de oclusão de quatro vasos;

AMPA - Alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato;

AVE - Acidente vascular encefálico;

CAT - Catalase;

CG-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;

DAN - 2,3-diaminonaftaleno;

DCF-DA - Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína;

DNPH - 2,4-Dinitrofenilhidrazina;

EROs - Espécies reativas de oxigênio;

EAAT - Transportador de aminoácidos excitatórios;

PLC - fosfolipase C; I/R, Isquemia e reperfusão;

LDH - Lactato desidrogenase;

GlyR - Receptor de glicina;

GlyT - Transportador de glicina;

GPX - Glutaciona peroxidase;

GST - Glutaciona-S-transferase;

GR - Glutaciona redutase;

LTP - potenciação de longa duração (do inglês “long-term potentiation”);

MCAO - Oclusão da artéria cerebral média;

MDA - Malonaldeído;

NMDA - N-methyl-D-aspartato;

NMDAR - Receptor de NMDA;

NO - Óxido nítrico;

NOS - Óxido nítrico sintase;

PCI - pré-condicionamento isquêmico;

POG - Privação de oxigênio e glicose;

SFCA - Solução de Fluido Cérebro-espinhal artificial;

SOD - Superoxido dismutase;

TBARS - Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico.

Resumo

A tolerância à isquemia cerebral é um mecanismo de neuroproteção desencadeado por um estímulo pré-condicionante não tóxico que prepara os neurônios contra diversos tipos de danos. Este fenômeno pode ser induzido pela ativação de receptores de NMDA (NMDAR) em neurônios. Estudos recentes têm demonstrado que os inibidores dos transportadores de glicina do tipo 1 (GlyT-1) podem potencializar a neurotransmissão glutamatérgica através de NMDAR, sugerindo uma via alternativa de pré-condicionamento cerebral. Neste trabalho, nós avaliamos o efeito do pré-condicionamento cerebral utilizando dois tipos de inibidores de GlyT-1 (sarcosina e NFPS) em diferentes modelos de dano cerebral. Na primeira etapa, nós testamos a sarcosina, um bloqueador competitivo de GlyT-1, a qual foi administrada durante sete dias consecutivos antes da indução de modelos de isquemia em ratos. O pré-condicionamento com sarcosina reduziu a morte celular em fatias de hipocampo submetidas à privação de oxigênio glicose (POG) e preveniu a morte neuronal no modelo de oclusão de quatro vasos (4VO). Durante o período de isquemia, os animais pré-condicionados com sarcosina apresentaram uma redução da liberação de glutamato, da produção de óxido nítrico e de espécies reativa de oxigênio. Estes efeitos estavam associados à redução da expressão de transportadores de glicina (GlyT-1 e GlyT-2), redução da captação de [³H]-glicina e redução do conteúdo de glicina no hipocampo. Além disso, o pré-condicionamento com sarcosina reduziu a expressão da subunidade NR2B de NMDAR, a qual é comumente associada à excitotoxicidade. Na segunda etapa, nós avaliamos o efeito do pré-condicionamento com NFPS, um bloqueador não competitivo de GlyT-1, em camundongos submetidos à um dano excitotóxico induzido pela injeção intrahipocampal de NMDA. O pré-condicionamento com NFPS reduziu o número de neurônios degenerados no hipocampo, sendo este efeito também associado à redução da expressão da subunidade NR2B de NMDAR. Este estudo demonstra que o pré-condicionamento com inibidores de GlyT-1 induz tolerância à isquemia cerebral e resistência à excitotoxicidade, sendo este efeito associado a modulação das vias glicinérgicas hipocampais e com a redução da subunidade NR2B de NMDAR.

Palavras-chave: Pré-condicionamento cerebral, neuroproteção, transportador de glicina do tipo 1, isquemia, neurotransmissão glutamatérgica.

Abstract

Brain ischemic tolerance is a protective mechanism achieved by a preconditioning stimulus that prepares the tissue against a harmful insult. This phenomenon can be induced by activation of NMDA receptors (NMDAR) in neurons. Recently, the glycine transporters type 1 (GlyT-1) have been shown to potentiate glutamate neurotransmission through NMDA receptors, suggesting an alternative pathway to induce brain preconditioning. In this study, we evaluated the brain preconditioning induced by two GlyT-1 inhibitors (sarcosine and NFPS) in different models of brain damage. In the first part, we tested sarcosine, a competitive blocker of GlyT-1, which was administered for seven consecutive days before the induction of ischemia models in rats. Sarcosine preconditioning reduced cell death in hippocampal slices submitted to oxygen glucose deprivation (OGD) and four vessels occlusion (4VO) model. During the period of ischemia, the preconditioned animals with sarcosine showed a reduction of glutamate release, the production of nitric oxide and reactive oxygen species. These effects were associated with reduction in glycine transporters expression (GlyT-1 and GlyT-2), reduction of [³H]-glycine uptake and reduction in the glycine level in hippocampus. Interestingly, sarcosine preconditioning reduced expression of NR2B-containing NMDAR, which is associated with high susceptibility to excitotoxicity. In the second step, we evaluated the effect of preconditioning with NFPS, a noncompetitive blocker of GlyT-1, in mice submitted to excitotoxic damage induced by intrahippocampal injection of NMDA. NFPS preconditioning generated a neuroprotective effect in hippocampus, being this effect also related to reduction of NR2B-containing NMDAR. This study demonstrates that brain preconditioning with GlyT-1 inhibitors induces ischemic tolerance and resistance against excitotoxicity, being that neuroprotection related to neuromodulation of glycinergic neurotransmission and reduction of NR2B-containing NMDAR.

Keywords: Brain preconditioning, neuroprotection, glycine transporter type 1, ischemia, glutamatergic neurotransmission.

1. Introdução

1.1. Neurotransmissão Glutamatérgica

O glutamato é o mais importante neurotransmissor excitatório presente no sistema nervoso central – SNC (Conn e Pin, 1997), (Kenny e Markou, 2004), (Liguz-Leczmar e Skangiel-Kramska, 2007). Além de neurotransmissor, o glutamato é um aminoácido constituinte da estrutura de proteínas e pode ser usado como fonte de energia nas células. O glutamato pode ser sintetizado via ciclo de Krebs e posterior transaminação do α -cetoglutarato. Outra forma de produção de glutamato é através do ciclo de glutamato/glutamina que ocorre tanto nos neurônios quanto nos astrócitos. Primeiramente, o glutamato citoplasmático é transportado para o interior de vesículas sinápticas de glutamato através de um mecanismo dependente de gradiente próton-eletróquímico promovido por uma ATPase vacuolar (Liguz-Leczmar e Skangiel-Kramska, 2007), (Fuller, Münch e Steele, 2009). Após um estímulo despolarizante seguido pelo influxo de Ca^{2+} , o glutamato vesicular é liberado na fenda sináptica. Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato é captado pelos astrócitos onde é convertido à glutamina pela enzima glutamina sintetase e posteriormente liberado por transportadores de glutamina no meio extracelular. A glutamina então é captada pelas células neuronais e reconvertida a glutamato (Fuller, Münch e Steele, 2009). Além da liberação neuronal, há uma liberação astrocitária de glutamato que modula a função dos neurônios e também a liberação de glutamato mediada pela reversão de transportadores (Fuller, Münch e Steele, 2009).

Os receptores de glutamato são classificados de acordo com suas características farmacológicas e moleculares em ionotrópicos e metabotrópicos, geralmente presentes em uma mesma sinapse (Conn e Pin, 1997), (Madden, 2002), (Sanacora *et al.*, 2008). Três tipos de receptores ionotrópicos foram identificados e classificados farmacologicamente por afinidades com agonistas sintéticos, sendo eles os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), os receptores AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato) e os receptores de cainato. Os receptores de NMDA são formados pelas subunidades de NR1 e NR2 (NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D) Estas subunidades são importantes para a ancoragem dos receptores na proteína PSD-95, bem como na sua interação com a proteína nNOS e com a molécula de glutamato. A ativação desses receptores permite um alto influxo de Ca^{2+} para o interior das células, sendo seu potencial de repouso mantido pelas concentrações extracelulares de Mg^{+2} (Madden, 2002), (Popescu, 2005).

Os receptores AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato), com as subunidades GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4, permeáveis aos íons Na^+ ou Ca^{+2} (na ausência da subunidade GluR2) geram um potencial excitatório rápido e consequente rápida dessensibilização do receptor

(Madden, 2002). O receptor de cainato, com suas subunidades GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2 diferencia-se dos receptores AMPA principalmente pela condutância e desativação mais lentas. (Madden, 2002), (Bloss, Hunter e Gerald, 2010). Estes receptores estão amplamente distribuídos em todo o cérebro, sendo densamente localizados no córtex e hipocampo (Madden, 2002), (Popescu, 2005), (Bloss, Hunter e Gerald, 2010).

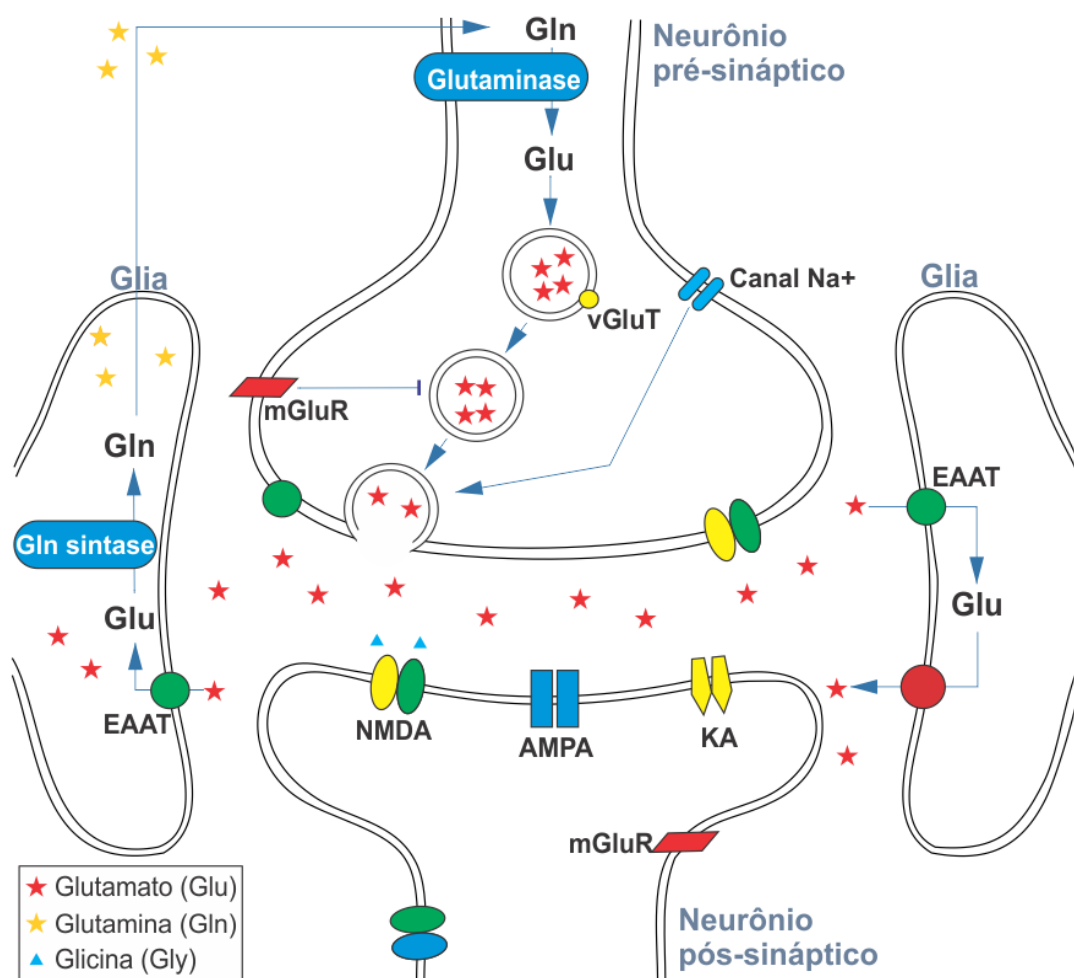


Figura 1. Neurotransmissão glutamatérgica. A despolarização dos neurônios leva liberação de glutamato na fenda sináptica através do processo de exocitose. Uma vez liberado, o glutamato pode atuar sobre receptores metabotrópicos (mGluR) ou receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e KA), gerando uma resposta em neurônios pós-sinápticos. Os níveis de glutamato na fenda sinápticos são controlados pelos transportadores de glutamato (EAATs). O glutamato captado pelas células gliais é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintase, sendo esta glutamina transportada para os terminais extra-sinápticos. A glutamina é captada pelos neurônios e convertida novamente à glutamato pela enzima glutaminase. No citoplasma, glutamato recém-produzido é transportado para as vesículas pelo transportador vesicular de glutamato (vGluT), estando novamente pronto para ser liberado na fenda sináptica.

A liberação de glutamato das vesículas sinápticas produz um potencial de ação pós-sináptico excitatório por ativar inicialmente os receptores AMPA. A ligação de glutamato nos receptores AMPA medeia a entrada de Na^+ para o interior do neurônio, despolarizando-o. Esta despolarização permite a liberação do Mg^{2+} e o desbloqueio de receptores NMDA. Uma vez que o receptor NMDA esteja desbloqueado, a união de glutamato e de seus co-agonistas (D-serina e glicina) a este receptor permitem a entrada de Ca^{2+} no neurônio (Figura 1). Deste modo, a disponibilidade de glicina na fenda sináptica, determinada pela sua liberação ou captação, pode modelar o equilíbrio de ativação de receptores de NMDA, o qual é controlado por transportadores específicos que mantêm os níveis do co-agonista abaixo dos níveis de saturação (Supplisson e Bergman, 1997), (Bergeron *et al.*, 1998).

Dentre os receptores metabotrópicos glutamatérgicos foram descritas três classes distintas que vão do mGluR1 ao mGluR8, estando relacionados tanto a efeitos excitatórios quanto inibitórios, os quais estão localizados nos terminais sinápticos e nas células gliais (Conn e Pin, 1997). O grupo I (mGluR1 e mGluR5) é composto por receptores excitatórios que estão predominantemente localizados nos terminais pós-sinápticos onde se acoplam a proteínas G para ativar a fosfolipase C (PLC), que catalisa a produção de inositol (1,4,5)-trifosfato, o qual conduz a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (Conn e Pin, 1997), (Sanacora *et al.*, 2008). O grupo II (GluRm2 e GluRm3) é composto por receptores inibitórios acoplados à proteína Gi/o que modulam negativamente a atividade da adenilato ciclase, sendo encontrados tanto nos terminais pré como pós-sinápticos (Conn e Pin, 1997), (Sanacora *et al.*, 2008). O grupo III (GluRm4, GluRm6, GluRm7 e GluRm8) é também composto por receptores inibitórios que modulam a atividade da adenilato ciclase, os quais se localizam predominantemente no terminal pré-sináptico onde atuam como auto-receptores (Conn e Pin, 1997), (Kenny e Markou, 2004), (Sanacora *et al.*, 2008).

A captação do glutamato ocorre quando um transportador de aminoácidos excitatórios (EAAT) capta uma molécula de glutamato e três moléculas de Na^+ , trocando-as por uma molécula de K^+ , sendo este mecanismo dependente da atividade de Na^+/K^+ ATPase, que mantém o gradiente de concentração de Na^+ (Zerangue e Kavanaugh, 1996), (Levy, Warr e Attwell, 1998). Atualmente, são conhecidos cinco tipos de transportadores de glutamato, o EAAT-1 (GLAST) um transportador de glutamato abundante em astrócitos; o EAAT-2 (GLT-1) é um transportador glial de glutamato, sendo o mais abundante no SNC o EAAT-3 (EAAC1) é um transportador neuronal de glutamato, sendo amplamente distribuído no cérebro; o EAAT-4 está localizado principalmente nas células de Purkinje e o EAAT-5 localizado principalmente na retina (Jiang e Amara, 2010).

1.2. Neurotransmissão Glicinérgica

O aminoácido glicina é um importante neurotransmissor inibitório do SNC dos mamíferos. A glicina pode ser produzida a partir do aminoácido serina pela enzima serina hidroximetiltransferase ou a partir do metabolismo de colina à sarcosina que, posteriormente, é metabolizada em glicina pela enzima sarcosina dehidrogenase (Danysz e Parsons, 1998).

A ação da glicina é mediada através de receptores ionotrópicos da família de receptores nicotínicos de acetilcolina que contêm um poro seletivo ao íon cloreto (Aragón e López-Corcuera, 2003), (Lynch, 2004). Os receptores de glicina (GlyR) são mais conhecidos por suas ações inibitórias na neurotransmissão na medula espinhal e no tronco encefálico, embora na última década seu papel na neurotransmissão excitatória tenha sido descrito (Lynch, 2004). Estes receptores são estruturas pentaméricas compostas por subunidade alfa e beta, sendo atualmente conhecidas 4 subunidades alfa ($\alpha 1$ à $\alpha 4$) e uma subunidade beta responsável pela ancoragem na membrana plasmática (Lynch, 2004). Duas vias glicinérgicas distintas são propostas para entender a ação da glicina no SNC. A primeira via é composta por receptores sensíveis à estriknina, que produzem um potencial pós-sináptico inibitório e estão principalmente localizados na medula espinhal, tronco encefálico e cerebelo (Zafra, Aragon *et al.*, 1995), (Zafra, Gomeza *et al.*, 1995). A segunda via é composta por sítios estriknina-insensíveis que se co-localizam com o receptor de NMDA para modular a neurotransmissão excitatória glutamatérgica, estando localizados principalmente no córtex e hipocampo (Danysz e Parsons, 1998). Além disso, a estimulação de GlyR pré-sinápticos por concentrações elevadas de glicina pode aumentar a liberação de glutamato, o que contribui para a ativação dos receptores de NMDA (Waseem e Fedorovich, 2010).

As ações da glicina são finalizadas por uma rápida absorção através dos transportadores de alta afinidade à glicina e co-transporte dos íons Na^+ e Cl^- , sendo o gradiente de Na^+ mantido pela proteína de membrana plasmática Na^+/K^+ -ATPase (Aragón e López-Corcuera, 2003). Até o momento, dois tipos distintos de transportadores de glicina foram descritos: GlyT-1 e GlyT-2, que apresentam 50% de homologia estrutural, porém apresentam localizações distintas bem como diferem-se quanto ao influxo de Na^+ , como mostrado na figura 2 (Aragón e López-Corcuera, 2003). Diferentemente do GlyT-2, o GlyT-1 também opera no modo reverso, o que torna a captação de glicina por GlyT-2 mais eficiente em manter as concentrações citosólicas de glicina (Aubrey *et al.*, 2007). Outra diferença marcante entre esses transportadores é a sensibilidade farmacológica à sarcosina, uma vez que esta é substrato para GlyT-1, porém não interage com GlyT-2 (Supplisson e Bergman, 1997).

O GlyT-1 depende do influxo de dois Na^+ e um Cl^- para transportar a glicina, sendo

encontrado em áreas desprovidas de receptores sensíveis à estricnina como diencéfalo, retina, bulbo olfatório e hemisférios cerebrais (Zafra, Aragon *et al.*, 1995), (Zafra, Gomeza *et al.*, 1995), estando estreitamente associada com os receptores NMDA, onde desempenha um papel na captação de glicina (Zafra, Aragon *et al.*, 1995), (Zafra, Gomeza *et al.*, 1995), (Cubelos, Gimenez e Zafra, 2005). GlyT-1 é expresso em neurónios e células gliais e foi demonstrada a sua distribuição sobre a membrana plasmática da linhagem de células PC12 (Geerlings *et al.*, 2002).

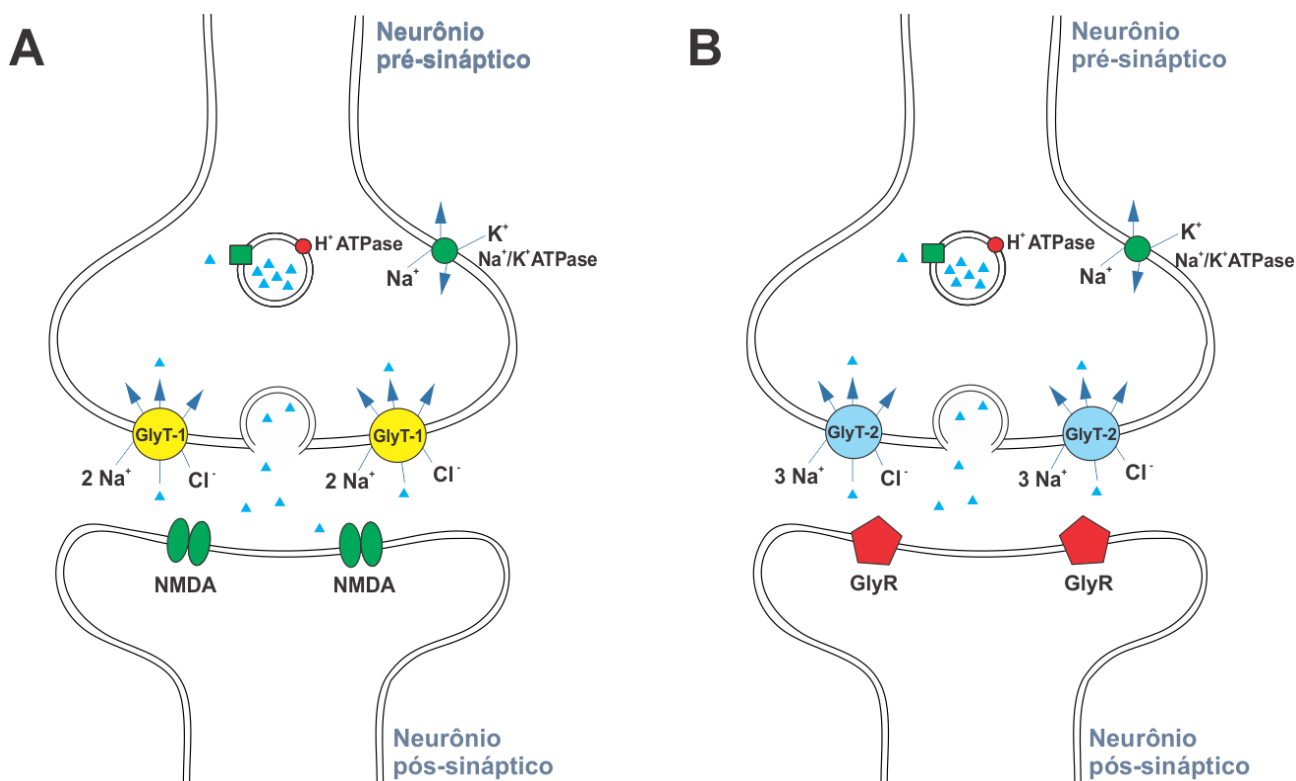


Figura 2. Vias glicinérgicas do SNC. (A) Via glicinérgica insensível à estricnina, este tipo de neurotransmissão está fortemente associado à neurotransmissão glutamatérgica no córtex e hipocampo, sendo a atividade de GlyT-1 fundamental para o funcionamento dos receptores de NMDA. (B) Via glicinérgica sensível à estricnina, este tipo de neurotransmissão é muito importante para a medula espinhal e tronco cerebral, tendo função inibitória e os níveis de glicina regulados por GlyT-2.

Estudos recentes apontam uma associação espacial entre os GlyT-1 e sinapses glutamatérgicas, o que sugere um importante papel destas proteínas na neurotransmissão mediada pelos receptores de NMDA no cérebro (Cubelos, Gimenez e Zafra, 2005). O GlyT-2 é mais expresso na medula espinhal (altamente expresso no corno dorsal e ventral), tronco cerebral, cerebelo, sistema auditivo e em núcleos de nervos cranianos (Zafra, Aragon *et al.*, 1995), (Zafra, Gomeza *et al.*, 1995). Na

verdade, GlyT-2 mostra-se como um marcador para neurônios glicinérgicos, estando principalmente co-localizado com receptores de glicina sensíveis à estricnina (Zafra, Aragon *et al.*, 1995), (Zafra, Gomeza *et al.*, 1995).

As sinapses glicinérgicas apresentam importante papel no equilíbrio entre neurotransmissão excitatória e inibitória no SNC. Um maior entendimento do papel da glicina na neurotransmissão glutamatérgica é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias para doenças do SNC.

1.3. Isquemia Cerebral e Excitotoxicidade

De acordo com o Ministério da Saúde (2011), as doenças cerebrovasculares representam a principal causa de morte no Brasil, sendo mais incidentes em homens que em mulheres (Sim, 2011). Estima-se que anualmente, 17 milhões de pessoas no mundo sofrem com o acidente vascular encefálico (AVE), sendo que um terço destas pessoas morre e outro terço fica permanentemente incapacitado devido a sequelas neurológicas. É importante ressaltar que um episódio de AVE aumenta significativamente a chance de novo episódio (Who, 2004).

A patogênese da isquemia cerebral resulta da diminuição do aporte sanguíneo focal ou global (Szydłowska e Tymianski, 2010), (Hoffmann *et al.*, 2010). Esse processo é acompanhado pela redução repentina da quantidade de oxigênio e glicose no sistema nervoso central (SNC), gerando um colapso energético que desencadeia a morte das células (Hoffmann *et al.*, 2010) (Szydłowska e Tymianski, 2010). 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 (Brouns e De Deyn, 2009), (Szydłowska e Tymianski, 2010). Devido a isso, a gravidade da lesão cerebral depende do tempo de duração e da extensão da localização do AVE.

Caso haja um o reestabelecimento 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 (Perez-Pinzon, Dave e Raval, 2005), (Liu, Sheng e Qin, 2009). 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) (Puisieux *et al.*, 2004). 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 (NMDAR) 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.

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 mantêm o equilíbrio osmótico da membrana plasmática (Brouns e De Deyn, 2009). Consequentemente, isto 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 (Brouns e De Deyn, 2009), (Szydłowska e Tymianski, 2010). Além disso, o aumento do influxo de Ca^{+2} causa a liberação descontrolada de neurotransmissores e desencadeia a morte de células adjacentes por excitotoxicidade (Szydłowska e Tymianski, 2010).

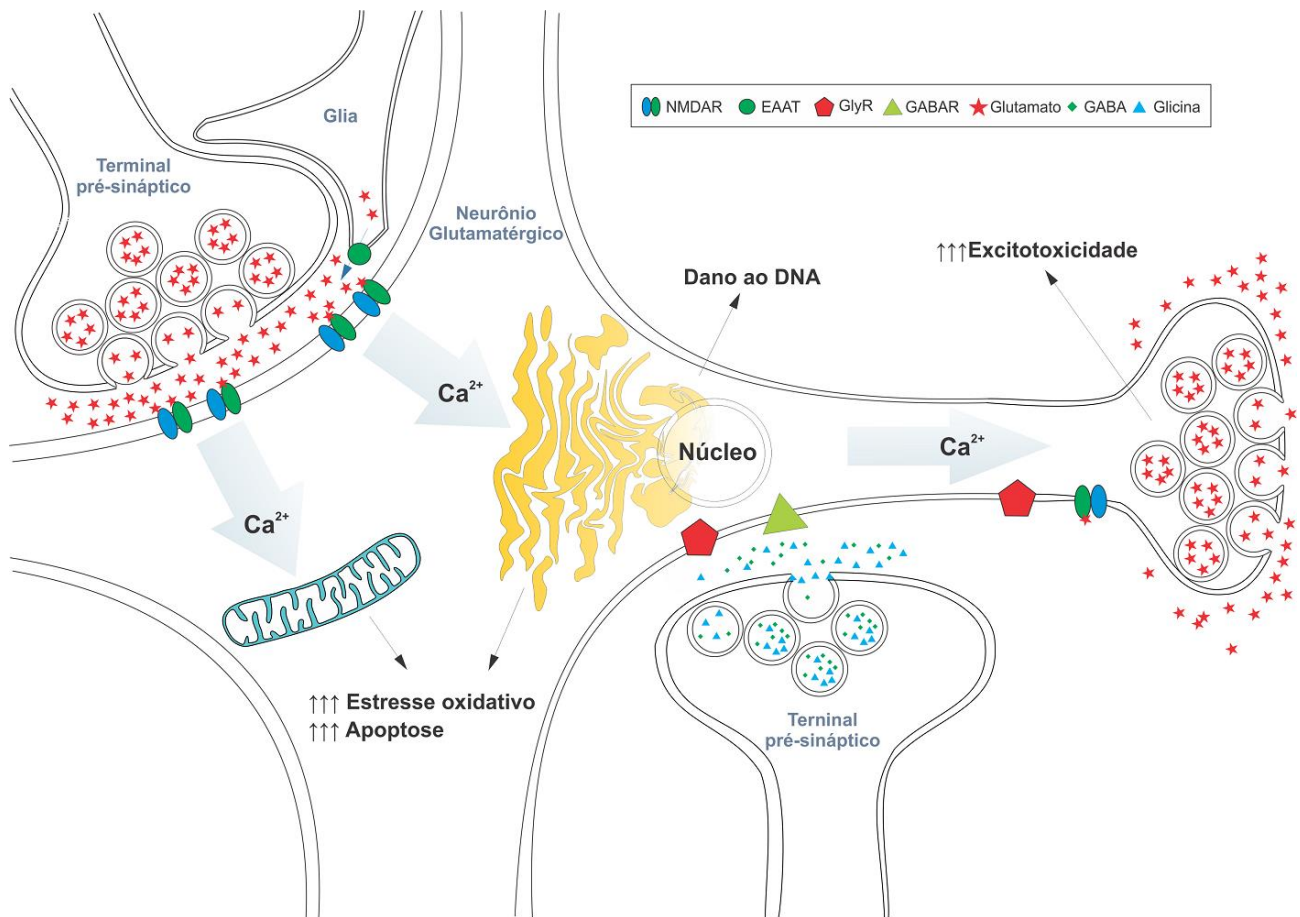


Figura 3. Processo de excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos. Durante a cascata excitotóxica, a liberação exacerbada de glutamato gera um grande influxo de Ca^{+2} através do receptor de NMDA. O aumento exacerbado de Ca^{+2} dentro da célula gera acúmulo na mitocôndria, o que pode desencadear aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e levar as células à morte por apoptose. A estimulação exacerbada destes neurônios também desencadeia a exocitose de mais neurotransmissores, que por sua vez, ampliam o fenômeno de excitotoxicidade.

O principal neurotransmissor envolvido no processo de excitotoxicidade é o glutamato, que apresenta efeito excitatório no sistema nervoso central – SNC (Szydłowska e Tymianski, 2010). A liberação de glutamato pelos terminais pré-sinápticos causa a ativação de receptores ionotrópicos, e consequentemente, influxo de cálcio em terminais pós-sinápticos. O cálcio é um íon fundamental para as funções fisiológicas dos neurônios, porém em grandes quantidades, como no caso da

excitotoxicidade, causa lesão e morte celular. Existem diferentes explicações para as lesões causadas pelo aumento súbito de cálcio nos neurônios. Uma hipótese é que os níveis de cálcio acima de um determinado limiar sobrecarregam as funções celulares levando as células à morte por hiperativação. A outra hipótese defende que a ativação de proteínas e vias bioquímicas específicas seriam responsáveis pela lesão excitotóxica. Existem trabalhos que fundamentam ambos os argumentos, sendo aceito que o aumento súbito de cálcio ativa diversas vias bioquímicas, porém certas vias contribuem mais para a morte celular do que outras (Szydłowska e Tymianski, 2010).

Os principais receptores envolvidos neste processo são os do tipo NMDA, porém os receptores AMPA/Cainato também são ativados, causando o influxo de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- e H_2O através do gradiente osmótico o que causa edema, lise celular e, conseqüentemente, maior liberação de glutamato (Stocca e Vicini, 1998), (Chen, Muhlhauser e Yang, 2003), (Papouin *et al.*, 2012). Essa maior liberação de glutamato, por sua vez, gera a morte por excitotoxicidade de outras células dando seqüência a um ciclo de degeneração no tecido (Szydłowska e Tymianski, 2010).

A aplicação de NMDA em roedores é capaz de causar convulsões e morte celular em neurônios glutamatérgicos (Silakova, Hewett e Hewett, 2004), (Hewett, Silakova e Hewett, 2006), (Khosravani *et al.*, 2008). O bloqueio farmacológico destes receptores é capaz de prevenir a morte neuronal causada pelo evento isquêmico em diferentes modelos (**Simon *et al.*, 1984**), (**Newell, Barth e Malouf, 1995**), (Wei *et al.*, 1997). Nos últimos anos, a distribuição e diferentes tipos de NMDAR têm sido associados à sobrevivência e morte neuronal (Papouin *et al.*, 2012), (Choo *et al.*, 2012). Os receptores NMDA do tipo NR1/NR2A são descritos como predominantemente sinápticos no cérebro de animais adultos, e ativam vias de sobrevivência, enquanto receptores de NMDAR do tipo NR1/NR2B são expressos tanto em terminais sinápticos quanto extra-sinápticos, sendo a ativação destes receptores extra-sinápticos associados a um maior acúmulo de Ca^{+2} , intumescimento mitocondrial e degeneração neuronal (Choo *et al.*, 2012), (Martel *et al.*, 2012). Neste contexto, a ativação diferencial de NMDAR é fundamental para o equilíbrio de vida e morte dos neurônios (Lim, Hoang e Berger, 2004).

1.4. Tolerância isquêmica e pré-condicionamento cerebral

A tolerância isquêmica é caracterizada pela proteção dos neurônios gerada por um estímulo pré-condicionante (sub-tóxico) que reduz a vulnerabilidade dos neurônios a um insulto subsequente (Gidday, 2006). O pré-condicionamento cerebral é um estímulo capaz de causar uma modulação nas vias bioquímicas celulares envolvidas no equilíbrio de vida e morte das células e deslocar este balanço para aumentar a resistência à morte celular (Gidday, 2006), (Liu, Sheng e Qin, 2009), (Simão *et al.*, 2011), (Pinto *et al.*, 2012). Este fenômeno causa a diminuição na morte celular por necrose e apoptose através da atenuação da excitotoxicidade, stress oxidativo e nitrosativo, prevenção da disfunção metabólica e inflamação (Gidday, 2006).

As primeiras evidências de pré-condicionamento cerebral foram observados na década de 1960, quando foi relatado que um breve período de anóxia era capaz de proteger o SNC contra danos isquêmicos prolongados (**Dahl e Balfour, 1964**), (**Schurr *et al.*, 1986**). Chamado de pré-condicionamento isquêmico (PCI), este fenômeno apresenta-se efetivo em modelos de isquemia *in vitro* e *in vivo* (Liu, Sheng e Qin, 2009). Os mecanismos intracelulares para indução de tolerância por PCI envolve a produção de ROS, sinalização de NO, ativação de vias de sobrevivência e infra-regulação de vias apoptóticas (família Bcl-2) (Liu, Sheng e Qin, 2009).

Posteriormente, foi relatado que apesar da tolerância isquêmica ser mediada por um mecanismo complexo de plasticidade cerebral envolvendo múltiplas vias, ela estava intimamente relacionada com a neurotransmissão glutamatérgica e os receptores NMDA (Chu *et al.*, 2007), (Turovskaya *et al.*, 2011). Na realidade, o bloqueio de receptores de NMDA em modelos *in vitro* e *in vivo* causam a interrupção dos efeitos neuroprotetores gerados por PCI (**Kato *et al.*, 1992**), (**Kasischke, Ludolph e Riepe, 1996**). Além disto, a aplicação de doses sub-convulsivantes de NMDA são capazes de produzir efeitos neuroprotetores contra modelos de isquemia cerebral e modelos de excitotoxicidade induzidos por ácido quinolínico ou cainato (Ogita *et al.*, 2003), (Boeck *et al.*, 2004), (Miao *et al.*, 2005), (Soriano *et al.*, 2006). Isto ocorre porque neurônios expostos a baixas doses de NMDA ativam predominante a sinalização sináptica de NMDAR em detrimento da extra-sináptica, gerando a ativação da via de sobrevivência AKT, ERK1/2 e CREB. Por outro lado, altas doses de NMDA favorecem a ativação extra-sináptica de NMDAR, que gera inativação da via de ERK1/2 e causam acúmulo de cálcio nos neurônios (Soriano *et al.*, 2006). Estes resultados demonstram que o equilíbrio de ativação dos receptores de NMDA é fundamental para entender a tolerância cerebral á danos, uma vez que baixas doses de NMDA ativam vias de sobrevivência, enquanto doses elevadas de NMDA promovem toxicidade em neurônios (Soriano *et al.*, 2006).

Um ponto fundamental relacionado ao estímulo pré-condicionante é a produção de espécies

reativas de oxigênio (EROs), uma vez que a inibição de nNOS ou a eliminação de NO e O₂ durante o período de pré-condicionamento atenua significativamente o processo de tolerância (Mori *et al.*, 2000), (Puisieux *et al.*, 2004), (Cho *et al.*, 2005), (Furuichi *et al.*, 2005). Na realidade, estratégias que aumentem de forma controlada a produção de ROS e NO podem gerar neuroproteção. Como exemplo cita-se o pré-condicionamento cerebral induzido por sevoflurano, em que o aumento de ROS gera um aumento capacidade antioxidante de enzimas do cérebro de ratos, e consequentemente, reduz a morte por apoptose e gera neuroproteção (Codaccioni *et al.*, 2009), (Yang *et al.*, 2011).

A ativação de algumas vias é fundamental para indução de tolerância pelo pré-condicionamento cerebral. O pré-condicionamento com NMDA é dependente da ativação das vias de PKA, PI3K, MAPK/ERK e CREB e inativação de JNK (Navon *et al.*, 2012), (De Araújo Herculano *et al.*, 2011). No PCI há ativação de PKC ϵ , que atua sobre da proteína de choque térmico 90 que gera o aumento plasmático da proteína SIRT-1, associada com resistência à morte (Thompson *et al.*, 2013). Os efeitos pré-condicionantes do fármaco resveratrol também estão associados ao aumento da expressão de SIRT-1 (Raval, Dave e Perez-Pinzon, 2006), (Raval *et al.*, 2008), sendo também importantes as vias de PI3K, CREB e GSK-3 β para os efeitos protetores no SNC (Zamin *et al.*, 2006), (Simão *et al.*, 2011). A redução de atividade de caspase, o aumento de fatores tróficos (NGF, BDNF, IGF1, bFGF), o aumento de proteínas chaperomas e proteínas de choque térmico também são comumente associados ao pré-condicionamento cerebral (Gidday, 2006).

A sobrevivência celular programada é um mecanismo complexo de plasticidade cerebral que envolve ativação de proteínas e modificações pós-transducionais estreitamente relacionadas com os níveis de ativação de NMDAR (Soriano *et al.*, 2006). Estas evidências são pistas importantes para o desenvolvimento de novos fármacos neuroprotetores, uma vez que novos fármacos capazes de potencializar a função de NMDAR na fenda sináptica podem ter a capacidade de induzir um pré-condicionamento cerebral e tolerância à isquemia.

1.5. Inibidores dos Transportadores de Glicina do Tipo 1

Os transportadores de glicina do tipo 1 (GlyT-1) são bem expressos em sinapses glutamatérgicas, onde mantêm os níveis de glicina subsaturados para modular a função de NMDAR (Zafra, Aragon *et al.*, 1995), (Zafra, Gomeza *et al.*, 1995), (Cubelos, Gimenez e Zafra, 2005). Nos últimos anos, novos compostos que bloqueiam GlyT-1 e potencializam a neurotransmissão glutamatérgica pelo aumento da concentração de glicina na fenda sináptica têm sido desenvolvidos com a finalidade de tratar condições relacionadas à hipofunção glutamatérgica, em condições patológicas como esquizofrenia, epilepsia e dor crônica (Lim, Hoang e Berger, 2004), (Harvey e Yee, 2013). Esta abordagem é especialmente interessante, uma vez que aumenta a probabilidade de ativação do receptor de NMDA sem necessariamente causar excitotoxicidade, normalmente associada à agonistas de NMDAR.

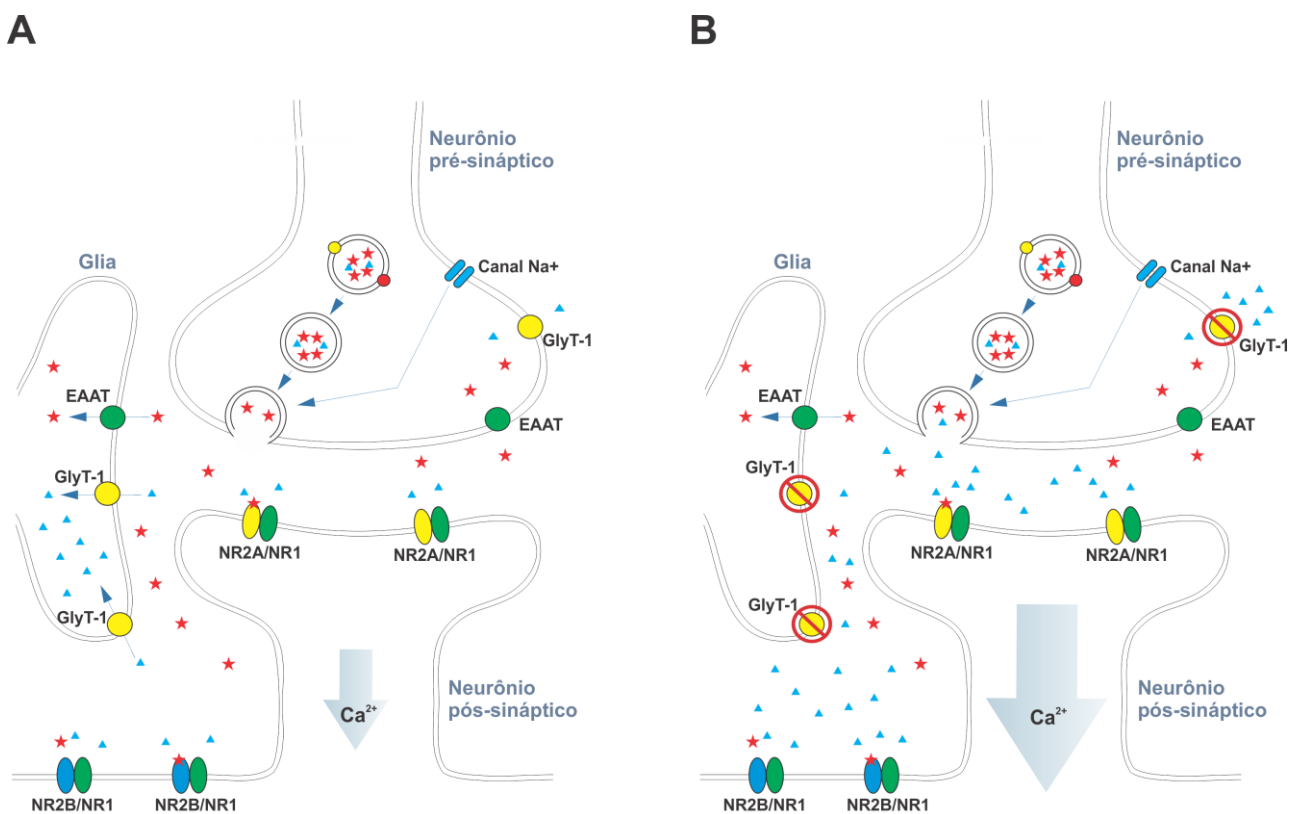


Figura 4. Inibição dos transportadores de glicina do tipo 1. A) Neurotransmissão glutamatérgica normal. B) Neurotransmissão glutamatérgica após o bloqueio dos transportadores de glicina do tipo 1 (GlyT-1). O bloqueio de GlyT-1 aumenta os níveis de glicina na fenda sináptica, aumentando a probabilidade de ativação dos receptores de NMDA e potenciando a ativação destes.

Há uma década, estudos realizados em roedores mostraram que a inibição de GlyT-1 apresentava um efeito antipsicótico pronunciado e também uma melhora na memória social, o que

foi atribuído á um aumento na sinalização glutamatérgica (Harsing Jr *et al.*, 2003), (Shimazaki, Kaku e Chaki, 2010). Posteriormente, estudos realizados em humanos mostraram que os pacientes que tomaram diariamente 2 g de sarcosina, um inibidor seletivo da GlyT-1, apresentaram uma redução nos sintomas positivos e negativos de esquizofrenia (Tsai, Lane *et al.*, 2004), (Hsien-Yuan *et al.*, 2008). Neste aspecto, o tratamento com bloqueadores de GlyT-1 trouxeram uma evolução para o tratamento da esquizofrenia, pois os tratamentos convencionais com bloqueadores dopaminérgicos atuam principalmente sobre os sintomas positivos, surtindo poucos efeitos para os sintomas negativos, associados à hipofunção glutamatérgica (Harvey e Yee, 2013).

A manipulação farmacológica dos bloqueadores de GlyT-1 também se aplica ao campo de estudos em epilepsia. Foi demonstrado que a administração sistêmica de sarcosina atrasa o começo e reduz a duração de convulsões induzidas por eletrochoque em roedores, porém não apresentam efeito nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (Socala *et al.*, 2010). O tratamento com diferentes bloqueadores de GlyT-1 (NFPS, SSR504734, Lu AA21279, Org 25935, SB-710622 e GSK931145) também geraram redução das crises de animais no modelo de eletrochoque (Kalinichev *et al.*, 2010). Estes trabalhos sugerem que os inibidores de GlyT-1 possam ser usados como adjuvantes na terapia antiepilética, porém os mecanismos pelos quais houve a redução das convulsões ainda não estão claros (Harvey e Yee, 2013).

Além das aplicações acima citadas, a manipulação farmacológica de GlyT-1 vêm sendo amplamente estudada em modelos de dor crônica e estudos mnemônicos. Em dor crônica experimental foi demonstrado que o aumento nos níveis endógenos de glicina via inibição de GlyT-1 interfere na transmissão de sinais da dor ao nível da espinha, bem como reduz a perturbação cognitiva causada pela dor (Tanabe *et al.*, 2008), (Kodama, Ono e Tanabe, 2011). Entretanto, um aumento exagerado de glicina pelo bloqueio de GlyT-1 pode gerar inibição da atividade motora e respiratória (Perry *et al.*, 2008). Os estudos referentes a memória demonstram que o bloqueio de GlyT-1 tem sido associado à melhora de desempenho cognitivo em modelos de déficit mnemônico. Similarmente, animais deficientes para GlyT-1 apresentam melhor desempenho na memória espacial do que animais selvagens (Möhler *et al.*, 2011), (Harada *et al.*, 2012).

Apesar dos avanços no entendimento da função fisiológica de GlyT-1 e dos efeitos farmacológicos de seu bloqueio, os efeitos dos inibidores de GlyT-1 sobre a sobrevivência neuronal e neuromodulação permanecem desconhecidos (Hsien-Yuan *et al.*, 2008). Assim, estudos são necessários para desvendar o potencial farmacológico destes inibidores, uma vez que eles aumentam a amplitude das correntes excitatórias pós-sinápticas geradas pelos receptores de NMDA, que estão diretamente ligadas ao equilíbrio de sobrevivência e morte dos neurônios (Bergeron *et al.*, 1998), (Tanabe, Nitta e Ono, 2010).

2. Premissas e Hipótese

Para o desenvolvimento deste projeto, nós trabalhamos com duas premissas: Primeiro, o pré-condicionamento cerebral pode ser induzido pela ativação de receptores de NMDA no cérebro; segundo, os bloqueadores de transportadores de glicina do tipo 1 potencializam a ativação dos receptores de NMDA.

Com base nestas premissas, construímos a seguinte hipótese: O pré-condicionamento cerebral com inibidores de transportadores de glicina do tipo 1 induz a tolerância contra danos isquêmicos e excitotóxicos.

3. Justificativa

Nos últimos anos, um grande número de pesquisas tem buscado aumentar a resistência de neurônios contra danos excitotóxicos, esta estratégia apresenta implicações tanto para área de isquemia cerebral quanto para doenças neurodegenerativas (Gidday, 2006). A descoberta de novos fármacos capazes de aumentar a resistência dos neurônios contra diferentes danos pode reduzir o número de óbitos associados a esta patologia, bem como melhorar o prognóstico dos pacientes (Gidday, 2006). Por este motivo, escolhemos essa abordagem para este trabalho.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial efeito neuroprotetor do pré-condicionamento cerebral mediado pela inibição dos transportadores de glicina do tipo 1 (GlyT-1).

4.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do pré-condicionamento com inibidores de GlyT-1 em modelos de dano cerebral mediados por isquemia ou excitotoxicidade.

Avaliar o efeito do pré-condicionamento com inibidores de GlyT-1 na produção e liberação de fatores excitotóxicos.

Avaliar o efeito do pré-condicionamento com inibidores de GlyT-1 na produção, liberação e degradação de fatores associados ao estresse oxidativo .

Avaliar o efeito do pré-condicionamento com inibidores de GlyT-1 na neuroquímica de roedores.

5. Material e Métodos

5.1. Animais

Os animais utilizados para os procedimentos experimentais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG. Para a avaliação do efeito neuroprotetor em modelo de isquemia cerebral, foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, com peso entre 180 e 200 gramas. Para a avaliação do efeito neuroprotetor em modelo de excitotoxicidade, foram utilizados camundongos C57bl/6, machos com peso entre 25 e 30 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. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e registrados com número de protocolos 042/11 para teste com ratos e 182/13 para testes com camundongos.

5.2. Fármacos e regime de tratamento

O tratamento com sarcosina (Sigma Aldrich, USA) foi realizado em ratos, nas doses de 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg ou 500 mg/kg. O fármaco foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%) e injetado por via intraperitoneal uma vez ao dia, durante 7 dias. Os animais controle foram tratados com a solução salina. Os experimentos foram realizados 24 horas após a última injeção.

O tratamento com N-[3-([1,1-Bifenil]-4-iloxi)-3-(4-fluorofenil)propil]-N-metilglicina (NFPS) (Tocris, Bioscience, UK) foi realizado em camundongos 24 horas antes dos procedimentos experimentais (dose única), nas doses de 1,25 mg/kg, 2,50 mg/kg, 5,0 mg/kg. O fármaco foi diluído em solução salina contendo 10% de hidropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD) e injetado por via intraperitoneal. Os animais controle foram tratados com a solução salina contendo 10% de HP- β -CD. Os experimentos foram realizados 24 horas após a última injeção.

5.3. Soluções

A Solução de Fluido Cérebro-espinhal artificial (SFCA) foi preparada com reagentes da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) contendo: 127.0 mmol/L NaCl, 2.0 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 26.0 mmol/L NaHCO_3 , 2.0 mmol/L MgSO_4 , 2.0 mmol/L CaCl_2 , 10.0 mmol/L ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico (HEPES) e 10.0 mmol/L glicose, aerada com mistura carbogênica (95% v/v O_2 e 5% v/v CO_2) e com pH ajustado para 7,4.

A solução de tampão de fosfato 50 mM foi preparada com reagentes da Sigma-Aldrich (St.

Louis, MO, EUA), com acréscimo de 140 mM de KCl. O pH foi ajustado para 7,4.

A solução tampão de lise foi preparada utilizando o coquetel de inibidores de proteases Sigma-FAST[®] (St. Louis, MO, EUA) contendo 2 mmol/L de fluoreto de 4-(2-aminoetil)- sulfonil benzeno, 1 mmol/L de fosfoamidona, 130 mmol/L de bestatina, 14 mmol/L E-64, 1.0 mmol/L de leupeptina, 0.2 mmol/L de aprotinina, e 10 mmol/L de pepstatina A. Foram adicionados 50 mmol/L de fluoreto de sódio e 1 mmol/L de ortovanato de sódio. O pH foi ajustado para 7,4.

Os padrões de aminoácidos foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) sendo eles: L-Glicina, L-Glutamato e Sarcosina. A solução padrão de cada aminoácido foi preparada na concentração de 1.0 mg/mL em H₂O e estocada a -20 °C. A solução padrão com todos os aminoácidos foi preparada na concentração de 10 µg/mL em H₂O e estocadas a 4 °C.

5.4. Preparação de material para análises

5.4.1. Preparação de fatias de hipocampo para o processo de isquemia

Os ratos foram sacrificados por decapitação em guilhotina e o cérebro foi removido imediatamente e submergido em solução gelada (4°C) de SFCA. O hipocampo foi dissecado e fatiado a 400 µm de espessura com a utilização de um chopper (McIlwain Tissue Chopper).

5.4.2. Preparação de fatias de hipocampo para análises bioquímicas

As fatias de hipocampo após a lesão de isquemia e reperfusão causada pela POG foram transferidas para tubos de 1,5 mL e homogeneizados em solução tampão de fosfato 50 mM, contendo 140 mM de KCl, a 4 °C (pH 7,4), (1:10; w/v). Após vigorosa homogeneização, o homogenato foi centrifugado a 1.000 x g durante 10 min a 4° C. O sobrenadante foi recolhido em tubos de 1,0 mL e posteriormente congelado a -70 °C, para futuras avaliações bioquímicas. O conteúdo de proteínas foi medido de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão (1 mg/mL).

5.4.3. Preparação de fatias de hipocampo para análises neuroquímicas

Os hipocampus de animais tratados foram rapidamente dissecados e transferidos para tubo de 1,5 mL e homogeneizados em solução tampão de lise. Após homogeneização, o homogenato foi centrifugado a 1.000 x g durante 15 min a 4° C. O sobrenadante foi recolhido em tubos de 1,5 mL e posteriormente congelado a -70 °C, para análises de Western Blot e GC/MS. O conteúdo de proteínas foi medido de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão (1 mg/mL).

5.5. Modelo de privação de oxigênio-glicose (POG) em fatias de hipocampo

5.5.1. Isquemia em fatias de hipocampo

As fatias de hipocampo foram incubadas nas câmaras para fatias de tecido em meio SFCA aerado (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas à temperatura de 37°C por um período de 90 minutos para recuperação do trauma mecânico da dissecação. Após a recuperação, as fatias foram submetidas à POG através da perfusão das câmaras com meio contendo 4 mM de glicose e aeradas com uma mistura gasosa contendo 95% de N₂ e 5% de CO₂, durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado para análises bioquímicas. Após o processo de isquemia, as fatias de hipocampo foram mantidas em solução com glicose e oxigênio para recuperação por mais 4 horas (reperfusão). Após a reperfusão, as fatias de hipocampo foram coletadas para análise de microscopia e bioquímica.

5.5.2. Determinação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos

O procedimento utilizado para determinação da viabilidade celular em fatias de hipocampo seguiu a padronização de Pinheiro *et al.* (2009) (Pinheiro *et al.*, 2009). Brevemente, os tecidos isquemiados foram marcados com 2,0 mM de etídio homodímero-1, em um volume final de 1,0 mL da solução SFCA rica em oxigênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e protegido da luz durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após a marcação, as fatias foram lavadas com SFCA durante 15 minutos, montadas em lamínulas e levadas para análise em um microscópio de fluorescência Imager M2 - Zeiss (Germany).

Com a utilização do programa (ZEN 2012 lite, Carl Zeiss, Germanay) foram adquiridas imagens consecutivas ao longo do eixo Z nos comprimentos de onda com excitação de 568 nm e emissão 598/40, sendo que estes parâmetros foram mantidos em todos os experimentos. As imagens foram gravadas em escala de cinza e a intensidade de fluorescência foi analisadas no programa ImageJ 1.43r.

5.5.3. Atividade da Lactato desidrogenase

A avaliação da morte celular foi determinada com o kit de desidrogenase láctica Ref.37, conforme especificações do fabricante (Labtest, Brasil). Brevemente, o sobrenadante proveniente do processo de isquemia das fatias de hipocampo foi coletado após 20 minutos de isquemia. A atividade de LDH foi mensurada através de ensaio colorimétrico e a leitura foi feita com uso de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e apresentados como porcentagem do controle.

5.5.4. Avaliação de ativação de Caspase-3

A avaliação da ativação de caspase-3 foi determinada com o EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1, conforme especificações do fabricante (Molecular Probes, USA). Este ensaio baseia-se na detecção do substrato para caspase-3, o Z-DEVD (substrato) ligado ao AMC (7-amino-4-metilcumarina) que é fracamente fluorescente no comprimento de onda UV (excitação/emissão 330/390 nm), mas após a clivagem proteolítica este mesmo substrato produz forte fluorescência. A leitura do experimento foi feita utilizando o espectrofotômetro de fluorescência (excitação/emissão 342/482 nm).

As fatias de hipocampo foram homogeneizadas com 500 µL de tampão de lise. O tecido lisado foi centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado para o ensaio fluorimétrico de caspase-3 e para dosagem proteica pelo método de Bradford (1976). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram adicionadas a 50 µL da solução tampão de reação com 10 mM do substrato Z-DEVD-AMC e mantidas a temperatura ambiente durante 30 minutos. As amostras foram levadas ao espectrofotômetro de fluorescência para a realização da leitura.

5.5.4. Avaliação do estresse oxidativo por peroxidação lipídica

A determinação da lipoperoxidação foi realizada como descrito por Ohkawa et al, 1979 (Ohkawa, Ohishi e Yagi, 1979). Resumidamente, as fatias de hipocampo foram coletadas após o período de reperfusão e lisadas como descrito na seção 5.4.2. Brevemente, a peroxidação lipídica foi determinada medindo a acumulação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados e expressa como teor de malonaldeído (MDA), que foi medida a 532 nm (UV / visível Espectrofotômetro U-200L, Hitachinaka, Japão). Os resultados foram expressos como percentagem de aumento na TBARS (nmol de MDA / mg de proteína) em relação aos seus respectivos controles.

5.6. Modelo de isquemia cerebral global

5.6.1. Oclusão de quatro vasos (4VO)

Isquemia cerebral global foi induzida pelo método de oclusão de quatro vasos descrito por Pulsinelli et al. 1982 (Pulsinelli, Brierley e Plum, 1982), com pequenas modificações (Simão *et al.*, 2011). Durante a operação cirúrgica, os ratos foram anestesiados com uma mistura gasosa de óxido nítrico (70%), oxigênio (30%) e halotano (1,5 %). As artérias vertebrais foram permanentemente eletrocoaguladas através do forame alar na primeira vértebra cervical. Em seguida, as artérias carótidas comuns foram expostas, cuidadosamente separadas do nervo vago e isoladas. A isquemia cerebral global foi realizada por oclusão bilateral das artérias carótidas comum com clips de aneurisma durante 10 min. A reperfusão começou quando os cliques de aneurisma foram removidos e permeabilidade das artérias foi confirmada por inspeção. A temperatura corporal foi monitorizada (termômetro retal) e mantida a $37 \pm 0,5$ ° C com ajuda de uma manta térmica. Os animais que não apresentaram perda do reflexo de endireitamento ou convulsão durante o episódio isquêmico foram excluídos. Os animais do grupo simulado (sham) foram submetidos aos mesmos procedimentos, exceto para a oclusão de artérias carótidas.

5.6.1. Avaliação da viabilidade celular por marcação histológica com Hematoxilina-Eosina

A morte celular dos neuronios foi avaliada através de exame histológico de fatias de cérebro de animais eutanaziados 3 dias após isquemia e corados com hematoxilina e eosina. Para isso, os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral (500 mg/kg) e, em seguida, perfundidos pelo coração com solução salina seguida por 4% de paraformaldeído em tampão fosfato (0,1 mol/L, pH 7,4). Após a perfusão, os cérebros foram removidos e imersos em 4% de paraformaldeído por 12 horas a 4°C. Após o período de fixação, foram preparadas fatias coronais de 20 µm ao nível do hipocampo dorsal (3,0-4,0 µm posterior ao bregma) com um criostato (Leica Microsystems, Alemanha). A cada 4 fatias, uma era selecionada para a coloração com hematoxilina-eosina. Fatias adicionais foram usadas para marcação com Fluoro-Jade C, a fim de identificar neurônios degenerados (Secção 4.4.3.2). O número de neurônios piramidais sobreviventes por cada camada de células piramidais CA1 foi contado em seis fatias por animal utilizando microscópio de luz com um aumento de 40X.

5.7. Modelo de excitotoxicidade

5.7.1. Aplicação intrahipocampal de NMDA

Camundongos C57/BL6 foram utilizados para avaliação do efeito excitotóxico mediado por NMDA. Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de quetamina (85 mg/Kg) e xilazina (15 mg/kg) , e subsequentemente foram posicionados em um estereotáxico. Foram inseridas cânulas guia (7 mm) no hipocampo dos animais nas seguintes coordenadas estereotáxicas: 2,0 milímetros caudal ao bregma, 2,0 mm lateral à linha média e 2,0 mm ventral ao bregma. Um período de 5 dias foi adotado para recuperação dos animais e resolução dos efeitos centrais dos anestésicos. Após a recuperação, os animais foram tratados com a droga de estudo por via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após o tratamento, os animais receberam uma injeção intrahipocampal de NMDA (1 µL de NMDA 40 mM em solução salina) com o auxílio de uma bomba de infusão ajustada para aplicar 0,5 µL/min. A agulha foi mantida por 2 minutos adicionais para minimizar vazamentos. Os animais controles receberam somente a solução salina.

5.7.2. Avaliação da viabilidade celular por marcação histológica com Fluoro Jade C

Um dia após a injeção de NMDA, os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina e perfundidos primeiramente com PBS e, depois, com paraformaldeído 4% (PFA) em PBS. Os cérebros foram removidos, colocados em PFA 4% durante a noite a 4 °C e, posteriormente, desidratados em solução de sacarose 30% em PBS durante um dia. Os cérebros foram congelados a -80° e posteriormente foram fatiados em cortes coronais de 25 µm na área compreendida entre -1,46 a 2,54 mm referente ao bregma com uso de um criostato. As fatias foram montadas em lâminas de vidro. Após a secagem, o material foi imerso em solução de NaOH 1% em álcool 80% por 5 min. As lâminas foram lavadas duas vezes em H₂O por 2 min e depois mergulhadas em solução de permanganato de potássio 0,06%. Após 20 minutos, as lâminas foram novamente lavadas duas vezes em H₂O por 2 min e banhadas em solução de Fluoro Jade C (FJC) 0,0001% por 20 min. Após a marcação com FJC, as lâminas foram lavadas três vezes com H₂O por 1 min. O excesso de líquido foi drenado em papel toalha e as lâminas foram colocadas em uma estufa a 37°C por aproximadamente 5 min. Após secagem, as laminas foram banhadas com xilol por 1 min e depois montadas usando o reagente DPX (Sigma-Aldrich). As imagens foram adquiridas usando uma câmera acoplada ao microscópio de fluorescência Imager M2 - Zeiss (Germany). Para análise quantitativa da morte neural foram obtidas imagens da área CA1 do hipocampo, sendo fotografadas três fatias por animal. As análises das imagens foram feitas usando o software Macbiophotonics Imagej (Versão 1.42l, NIH, USA).

5.8. Avaliações Bioquímicas

5.8.1. Produção de espécies reativas de oxigênio – EROs

O protocolo foi feito como descrito por Siqueira et al, 2004 (Siqueira *et al.*, 2004). Resumidamente, as dosagens foram realizadas utilizando a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) (Sigma-Aldrich, Wien, Austria). Após a isquemia do hipocampo, 20 µL do sobrenadante foi incubado com 80 µL de DCF-DA (125 µM) a 37 ° C durante 30 min e protegida da luz. A formação do derivado oxidado fluorescente (DCF) foi monitorada nos comprimentos de onda de 488 nm (excitação) e 525 nm (emissão), respectivamente, em um leitor de placas fluorescente (Cary Eclipse, Varian, EUA). Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como percentagem do controle.

5.8.2. Produção de óxido nítrico – NO

O protocolo foi feito baseado em método de fluorescência anteriormente descrito por Misko et al, 1993 (Misko *et al.*, 1993). As dosagens foram realizadas usando a sonda 2,3-diaminonaftaleno (DAN) (Sigma-Aldrich, Viena, Áustria), que é específica para o nitrito oriundo da degradação do óxido nítrico - NO. Após a isquemia do hipocampo, 15 µL de sobrenadante foram adicionados a 200 µL de meio de incubação contendo 3,2 mM de DAN. A reação foi realizada a 25°C e protegida da luz durante 10 minutos, sendo o processo finalizado pela adição de 15 µL de NaOH (2,8 M). A formação de produto fluorescente foi medida utilizando um leitor de placas fluorescente (Care Eclipse, Varian, EUA) com comprimentos de onda de 360 nm de excitação e de 440 nm de emissão. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como percentagem do controle.

5.8.3. Conteúdo de Glutathiona reduzida

O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi determinado de acordo com Tietze (1969) (Tietze, 1969). Resumidamente, 25 µL de sobrenadante foi adicionado na placa de 96 poços, contendo 165 µL de tampão de fosfato 0,1 M e EDTA 1,0 mM (pH 8,0) e 10 µL de 100 mM de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico - DTNB. A placa foi incubada durante 30 min e a absorbância foi lida após 5 min a 412 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como percentagem do controle isquemia.

5.8.4. Atividade da Catalase

A atividade de catalase-CAT foi realizada com base na decomposição de H_2O_2 como descrito por Shangari e O'Brien, 2006 (Shangari e O'brien, 2006). Resumidamente, após o processo de reperfusão, as fatias de hipocampo foram lisadas, centrifugadas e o sobrenadante foi coletado (Procedimento 4.2.2). A reação foi iniciada pela adição de 10 μ L de sobrenadante em 50 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) contendo 7,5 mM de H_2O_2 . A taxa de decomposição de H_2O_2 foi monitorada por espectrofotometria em intervalos de 15 segundos durante 1,5 min, no comprimento de onda de 240 nm (25°C). Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como porcentagem do controle isquemia.

5.8.5. Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade de superóxido dismutase - SOD foi avaliada utilizando o método espectrofotométrico descrito por Marklund e Marklund, 1974 (Marklund e Marklund, 1974). Resumidamente, após o processo de reperfusão, as fatias de hipocampo foram lisadas, centrifugadas e o sobrenadante foi coletado (Procedimento 4.2.2). O sobrenadante de hipocampo foi incubado numa solução contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio e 50 mM de EDTA, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de pirogalol. A oxidação de pirogalol foi monitorada a 420 nm por 5 min, em intervalos de 30 seg, no espectrofotômetro (UV/visível U-200L, Hitachinaka, Japão). Uma inibição de 50% foi definida como uma unidade de SOD (U), e os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como porcentagem do controle isquemia.

5.8.6. Atividade de glutathiona peroxidase

A atividade da glutathiona peroxidase (GPX) foi determinada de acordo com Paglia e Valentine (1967) (Paglia e Valentine, 1967). Resumidamente, a solução da reação foi preparada em 580 μ L de tampão de fosfato (100 mM, pH 7,0) contendo EDTA 5 mM, 100 μ L de NADPH 8,4 mM, 10 μ L de glutathiona redutase (100 UI/mg de proteína/mL), 10 μ L de NaN_3 1,125 M, 100 μ L de glutathiona reduzida 0,15 M e 100 μ L da amostra. A reação enzimática foi iniciada por adição de 250 μ L de H_2O_2 (2,2 mM). A conversão de NADPH para NADP foi monitorada durante 4 minutos, em intervalos de 30 segundos no espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão). Unidade de enzima foi determinada pela oxidação de 1,0 mol de NADPH por minuto e foi calculada com base na absorbância de NADPH em 340 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como porcentagem do controle isquemia.

5.8.7. Atividade de glutathiona redutase

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi determinada de acordo com a Carlberg e Mannervik (1975) (Carlberg e Mannervik, 1975). Resumidamente, 100 μL da amostra foram adicionados a 900 μL de tampão fosfato de potássio (0,10 M) e 0,5 mM de EDTA com 67 mM de NADPH e 133 mM de glutathiona oxidada (pH 7,6). Unidade de enzima foi determinada pela oxidação de 1,0 mol de NADPH por minuto e foi calculada com base na absorção molar de NADPH em 340 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como percentagem do controle isquemia.

5.8.8. Atividade de glutathiona-S-transferase

A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi realizada de acordo com Habig *et al.* (1974) (Habig, Pabst e Jakoby, 1974). Resumidamente, 50 μL da amostra foi adicionada a 850 μL de tampão fosfato (0,1 M) e EDTA 1,0 mM (pH 6,5) com GSH (1,06 mM) e 1-cloro-2 ,4-dinitrobenzeno (1,06 mM) (Sigma-Aldrich). Os reagentes foram colocados diretamente em cubetas e as leituras foram feitas em um espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) a 345 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como percentagem do controle isquemia.

5.9. Avaliações Neuroquímicas

5.9.1. Avaliação da liberação de glutamato

A concentração de glutamato no sobrenadante de fatias de hipocampo foi dosada como descrito por Leite *et al.*, 2012 (Leite *et al.*, 2012). Resumidamente, após o processo de isquemia o sobrenadante foi coletado e centrifugado (1000 x g, a 4 °C durante 5 min). A liberação de glutamato foi medida através de reação enzimática mediada pela glutamato desidrogenase (GSH), onde a formação de NADPH é monitorada no fluorímetro no comprimento de onda de 340 nm. A concentração de glutamato no sobrenadante é proporcional à produção de NADPH e foi determinada utilizando a concentração padrão de 5 nM. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína e expressa como porcentagem do controle isquemia.

5.9.2. Avaliação da captação de [³H]glutamato e [³H]glicina

A captação de [³H]glutamato e [³H]glicina foi avaliada conforme descrito por Brown et al, 2003 (Brown, Brotchie e Fitzjohn, 2003) com algumas modificações. As fatias de hipocampo foram incubadas durante 30 min em solução de SFCA oxigenado a 37 °C para recuperação. Em seguida, as câmaras individuais, contendo as fatias de hipocampo, foram incubadas com SFCA contendo 1 mmol/L de [³H]glutamato (1,0 µCi/mmol) ou [³H]glicina (1,0 µCi/mmol) durante 5 min a 37 °C.

As fatias de hipocampo foram recolhidas e ressuspensas em 500 µL de solução tampão de lise e homogeneizadas vigorosamente. As fatias foram centrifugadas a 15000 rpm durante 15 minutos à 4°C, sendo o homogenato recolhido após o processo. Alíquotas de 100 µL do homogenato foram adicionados a 1 mL de coquetel de cintilação. Teor de trítio das amostras foi medida por espectroscopia de cintilação líquida em um espectrofotômetro de cintilação (Tri-Carb 2910TR, Perkin Elmer).

5.9.3. Avaliação do conteúdo de aminoácidos

O processo de derivatização foi realizada como descrito por Paiva et al. 2013 (Paiva *et al.*, 2013) e adaptado por Pinto et al., 2014 (Pinto *et al.*, 2014). A solução tampão de lise foi utilizada como um controle sem aminoácidos. Seis diferentes concentrações foram analisadas em triplicata e as curvas de calibração foram calculadas para cada um dos padrões. A linearidade entre 0,02-100,00 mmol/L foi estabelecida para todos os analítos.

Para análise do conteúdo de aminoácidos no hipocampo dos animais, as amostras foram

preparadas como descritos anteriormente (Seção 5.4.3). Cem microlitros do homogenato foram transferidos para um tubo de 1,5 mL, juntamente com 900 µL de metanol à temperatura de -10°C. A solução foi homogeneizada, vigorosamente, durante 1 min e centrifugada a 10000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, 100 µL de sobrenadante foram transferidos para um frasco de vidro e evaporado à temperatura ambiente por N₂. Em seguida, 15 µL de metoxiamina em piridina com 20 mg/mL, foi adicionado, juntamente com 35 µL de BSTFA com 1% TMCS. A solução foi agitada num vórtex durante 30 segundos e submetidos à irradiação de microondas em forno de microondas doméstico (700 W de potência) durante 3 minutos. A solução final foi utilizada para análise por GC-MS. Mais detalhes sobre a técnica podem ser encontrados no Apêndice 1.

5.9.4. Avaliação da expressão de receptores e transportadores

Para avaliação da expressão de receptores e de transportadores de membrana, foi utilizada a técnica de Western blot. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente (Seção 5.4.3). Foram utilizados os seguintes anticorpos da Santa Cruz Biotechnology: NMDA ζ 1 (sc-1467, anti-goat IgG), NMDA ϵ 1 (sc-1468, anti-goat IgG), NMDA ϵ 2 (sc-1469, anti-goat IgG), GlyR β (sc-20134, anti-rabbi IgG), GlyT-1 (sc-16701, anti-goat IgG); GlyT-2 (sc-30129, anti-rabbit IgG); EAAT-2 (sc-7760, anti-goat IgG), EAAT-3 Antibody (sc-7761, anti-goat IgG) e o anticorpo anti-actina (MAB1501R, Chemicon).

Inicialmente, 4 µL da amostra contendo 50 µg de proteína foi adicionado ao tampão de amostra ajustado para um volume final de 18 µL em água destilada. Após 10 minutos, as proteínas foram levadas ao termo ciclador a 70°C e deixadas por 10 minutos para o processo desnaturação. Após a desnaturação das proteínas, 18 µL das amostras foram aplicadas nos poços, juntamente com 10 µL do padrão. A corrida foi feita na cuba de eletroforese em gel de poliacrilamida com 120 V por cerca de 1:30 h, até que o tampão da amostra estivesse no limite inferior do gel. Após a eletroforese, o gel foi colocado sobre a membrana de nitrocelulose embebida em tampão de transferência. Foi montado o aparato de transferência e levado novamente para cuba, por onde foi exposto a 30 V por 2 horas. A cuba foi colocada dentro do gelo até o final desta etapa.

Finalizada a transferência, as proteínas foram reveladas com a solução de Ponceau, e, posteriormente, lavadas com a solução de TBS Tween 20. Com as proteínas reveladas, foram feitos diferentes cortes na membrana, usando o padrão como referência, para avaliar a expressão de diferentes proteínas. Com as tiras separadas, o material foi levado para solução de bloqueio (TBS Tween 20 5%BSA) e deixado sobre agitação por 50 minutos. Após o bloqueio, as tiras foram lavadas 3 vezes com TBS Tween 20 por 5 minutos. As tiras já bloqueadas foram incubadas com

diferentes anticorpos primários durante a noite e avaliados no dia seguinte. Os anticorpos foram preparados em solução de TBS Tween 20 0.1% e incubado durante a noite nas seguintes proporções: NMDA ζ 1 (1:400), NMDA ϵ 1 (1:400), NMDA ϵ 2 (1:400), GlyR β (1:400), GlyT-1 (1:400); GlyT-2 (1:400); EAAT-1 (1:600), EAAT-2 (1:400), EAAT-3 (1:400) e o anticorpo anti-actina (1:7000).

No dia seguinte, as tiras foram novamente lavadas em TBS Tween 20 e, posteriormente, incubadas com anticorpos secundários durante 1 hora. Os anticorpos secundários foram o goat anti-rabbit IgG (1:10.000), o goat anti-mouse IgG (1:5.000) e donkey anti-goat IgG (1:4.000) (Santa Cruz Biotechnology). A solução reveladora ECL Plus foi colocada sobre as tiras e deixada por 4 minutos. As tiras já marcadas foram colocadas sobre placas de acrílico e levadas para o aparelho ImageQuant para captura do sinal quimioluminescente e formação da imagem. A análise de densitometria foi feita usando o software versão Beta 4.0.2 (Scion Corporation, NIH, USA).

5.10. Estatística

Os experimentos de viabilidade celular foram analisados utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os experimentos com duas variáveis independentes (Tratamento e Insulto) foram analisados com análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os experimentos com uma variável independente foram analisados com o teste de T-Student. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm SEM.

6. Resultados

6.1. Indução farmacológica de tolerância isquêmica pelo pré-condicionamento com sarcosina

Nesta seção são mostrados os resultados do pré-condicionamento com sarcosina em modelos *ex vivo* e *in vivo* de isquemia cerebral em ratos Wistar. A morte celular foi investigada na região de CA1 do hipocampo. Foram investigados os principais fatores associados ao fenômeno de excitotoxicidade, tais como liberação de glutamato, produção de NO e de EROs, bem como a participação de enzimas antioxidantes. Também foram investigadas as principais proteínas relacionadas ao mecanismo de ação da sarcosina, bem como as alterações neuroquímicas causadas pelo tratamento.

6.1.1. O pré-condicionamento com sarcosina induz tolerância à isquemia induzida por POG em fatias de hipocampo de ratos

Inicialmente, para testar o efeito pré-condicionante do tratamento com sarcosina os grupos de animais foram tratados, diariamente, por sete dias com diferentes doses de sarcosina (30 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg). As doses foram selecionadas baseando-se em achados comportamentais de artigos na literatura. Após o processo de isquemia, as fatias de hipocampo foram marcadas com etídio homodímero, um marcador específico de morte celular, sendo analisadas diretamente no microscópio de fluorescência.

A dose de 30 mg/kg de sarcosina após 7 dias de tratamento não promoveu efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo submetidas à POG ($p > 0,05$, ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni). No entanto, a dose de 100 mg/kg de sarcosina apresentou efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo submetidas à POG com $55,05 \pm 6,26\%$ de morte celular ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni).

O grupo de animais tratados com 300 mg/kg de sarcosina apresentou o maior efeito neuroprotetor com $38,00 \pm 3,33\%$ de morte celular ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni), sendo este valor equivalente ao encontrado no hipocampo do grupo controle sem a POG ($29,28 \pm 2,47\%$ de morte celular). Estes resultados apontam para um efeito neuroprotetor, dose-dependente, do pré-condicionamento com sarcosina em fatias de hipocampo submetidas à POG (Figura 5 A-B).

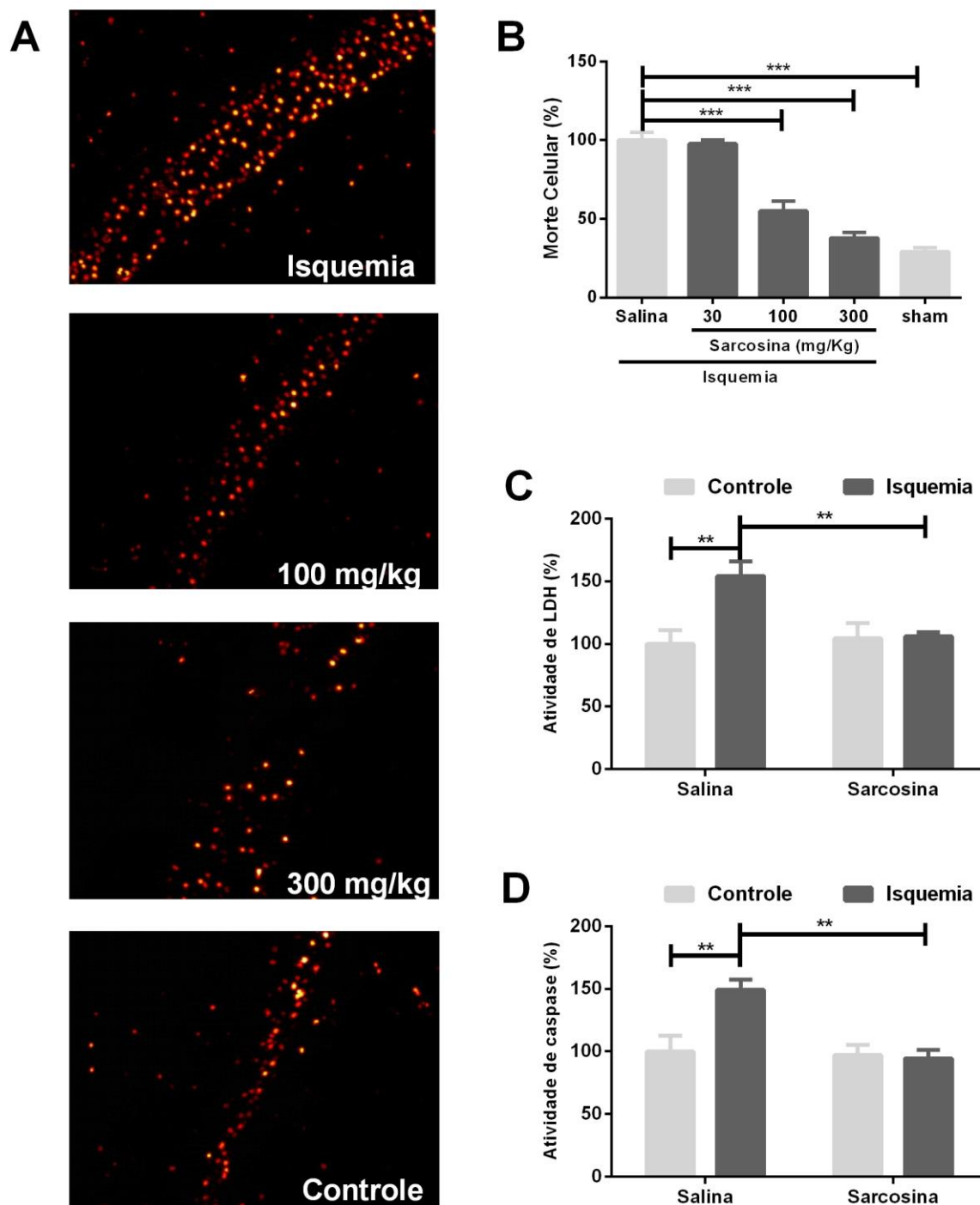


Figura 5. O pré-condicionamento com sarcosina induz tolerância à POG em fatias de hipocampo de ratos. (A) Imagem representativa de fatias de hipocampo do grupo salina e sarcosina. (B) Morte celular avaliada pela marcação com etídio homodímero (***) $p < 0,001$, ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni). (C) Atividade LDH no sobrenadante de fatias de hipocampo (** $p < 0,01$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni). (D) Atividade de capase 3 no homogenato de fatias de hipocampo. Os resultados expressam a média \pm SEM de pelo menos cinco animais por grupo.

A dose de 300 mg/kg foi escolhida para confirmar a tolerância à isquemia induzida pelo pré-condicionamento com sarcosina. Dessa forma, foram analisados o sobrenadante e o homogenato das fatias de hipocampo dos animais tratados. Primeiramente, utilizando o sobrenadante, o conteúdo de lactado desidrogenase (LDH) foi avaliado como indicador de morte celular (necrose) no tecido (Figura 5 C). Após 20 minutos de POG, o sobrenadante do grupo sarcosina apresentou uma menor atividade de LDH ($106,0 \pm 3,45\%$) do que o grupo salina ($154,3 \pm 11,57\%$) ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni). Além disso, a atividade de LDH no sobrenadante de fatias de hipocampo do grupo de animais tratados com sarcosina submetidos ou não à POG foi equivalente. A segunda avaliação foi realizada usando o homogenato de hipocampo após a lesão de isquemia e reperfusão (I/R). A proteína caspase-3 foi avaliada por ser ativada durante o processo de morte celular por apoptose, sendo a principal responsável pela destruição da célula neste fenômeno. Após o processo de I/R, as fatias do grupo tratado com sarcosina ($94,62 \pm 18,33\%$) apresentaram uma menor ativação de caspase-3 do que o grupo tratado com salina ($149,27 \pm 22,68\%$), sendo os níveis de ativação equivalentes aos controles não isquemiados ($97,11 \pm 23,73\%$) (Figura 5 D). Em conjunto, estes resultados indicam que o pré-condicionamento com sarcosina produz tolerância à isquemia em fatias de hipocampo submetidas à POG.

6.1.2. Efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com sarcosina

Neste experimento foi realizado o pré-tratamento com diferentes doses de sarcosina (300 e 500 mg/kg) ou salina durante 7 dias em ratos Wistar. 24 horas após a última injeção, os animais foram submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global (Figura 10).

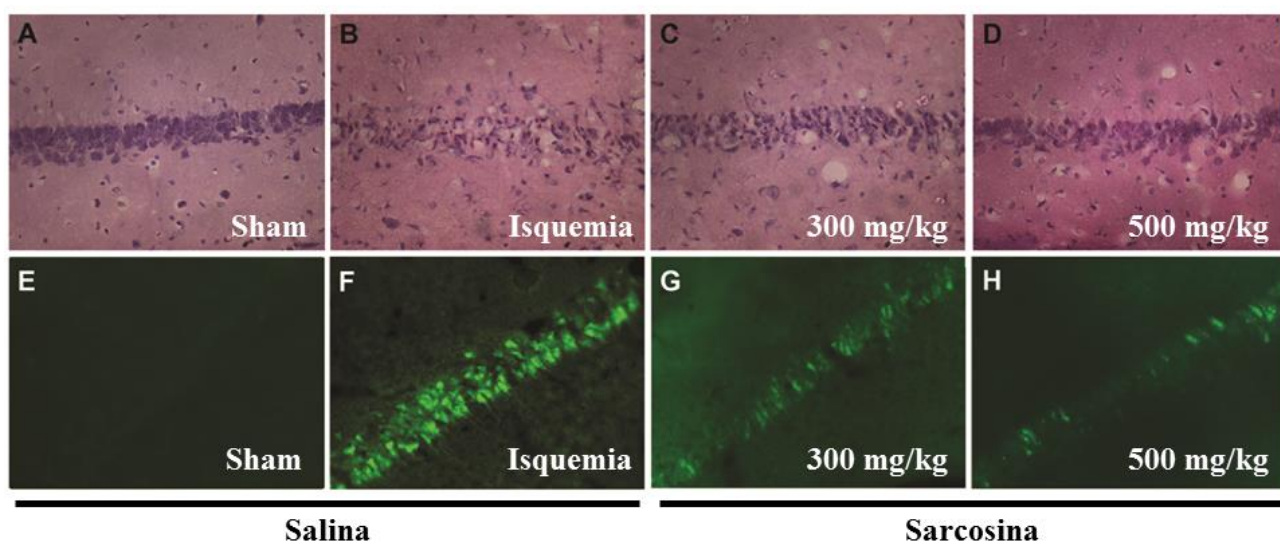


Figura 6. Imagens representativas do dano isquêmico. Neurônio da região CA1 do hipocampo após 10 minutos de isquemia, seguido de 3 dias de reperfusão. As figuras no topo (A-D) representam fatias coradas com hematoxilina e eosina e as figuras abaixo representam as figuras coradas com Fluoro-Jade C (E-H). A sarcosina foi administrada durante 7 dias antes da indução de isquemia cerebral. O aumento original foi de 40X.

O tratamento com sarcosina a 300 mg/kg apresentou efeito neuroprotetor com $28,27 \pm 1,94$ de neurônios viáveis após o insulto causado pelo modelo de 4VO ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey). Os animais tratados com 500 mg/kg de sarcosina apresentaram $42,36 \pm 2,65$ de neurônios viáveis na região de CA1 do hipocampo ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey). Ambas as doses de sarcosina foram capazes de proteger o hipocampo da isquemia cerebral quando comparados ao grupo salina submetido à isquemia, que apresentou apenas $14,90 \pm 2,63$ neurônios viáveis na região de CA1 do hipocampo. Estes resultados indicam que o pré-condicionamento com sarcosina produz tolerância à isquemia contra um insulto causado pelo modelo de isquemia de 4VO.

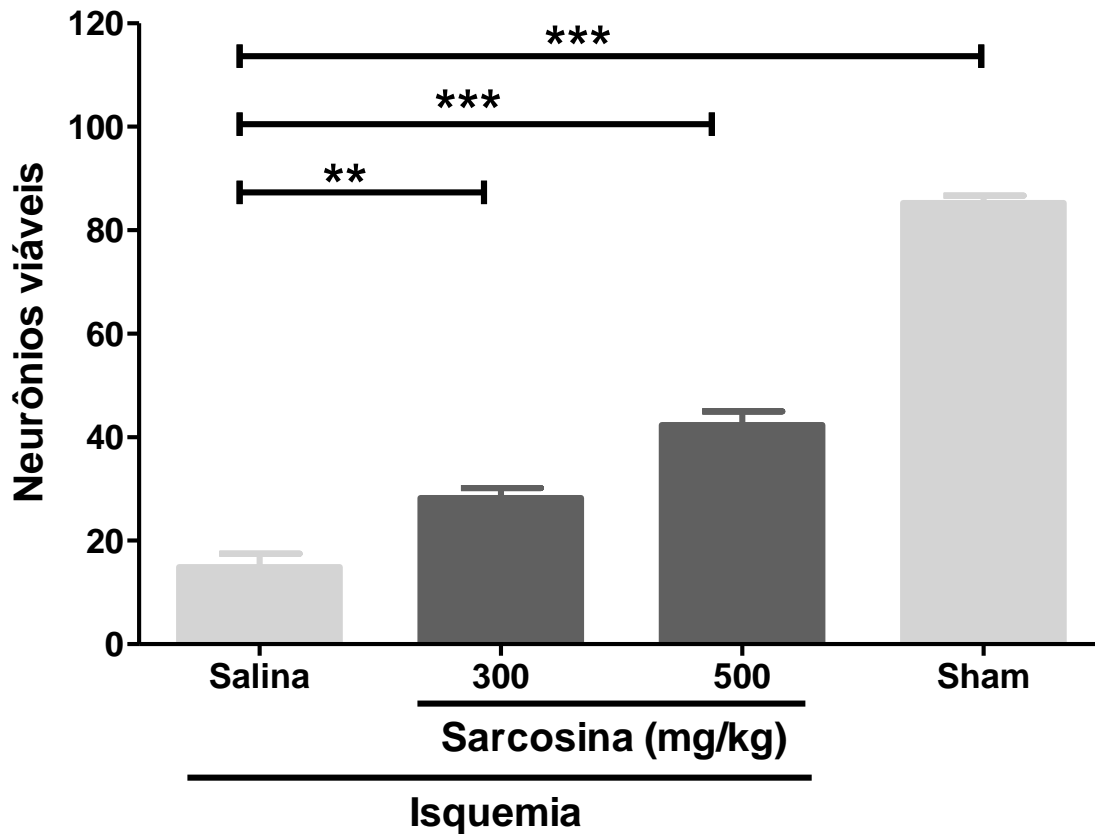


Figura 7. O pré-condicionamento com sarcosina induz neuroproteção contra a isquemia cerebral global. A sobrevivência dos neurônios de CA1 após 10 minutos de isquemia cerebral global induzida pelo modelo de oclusão de 4 vasos, seguido de 3 dias de reperfusion. Os neurônios foram contados a partir de fatias marcadas com hematoxilina e eosina. Os animais receberam sarcosina durante 7 dias nas doses de 300 e 500 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm EPM para cada grupo com 5 animais ($P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

6.1.3. O pré-condicionamento com sarcosina reduz a liberação de fatores excitotóxicos em fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG

Em sequência, para determinar os mecanismos de neuroproteção, nós investigamos os sinais excitotóxicos produzidos durante o processo de isquemia. Com este objetivo, no sobrenadante das fatias de hipocampo submetidas à POG foi avaliada a liberação de glutamato e a produção de óxido nítrico - NO (Figura 4). A liberação de glutamato aumentou ($206,1 \pm 39,51\%$) após 20 minutos de POG nas fatias de hipocampo de animais do grupo salina ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni). Em contraste, houve um menor aumento na liberação de glutamato nas fatias do grupo tratado com sarcosina ($112,5 \pm 14,27\%$), valor este equivalente ao controle (Figura 4 A). Estes resultados mostram que há uma menor liberação de glutamato durante a POG em fatias de hipocampo do grupo sarcosina. Uma análise independente mostra que há diferença na liberação de glutamato dos grupos controles ($p < 0,05$, teste de T-Student), o que indica uma alteração na neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo de animais tratados com sarcosina.

A produção de NO foi reduzida ($54,83 \pm 15,82\%$) nas fatias do grupo tratado com sarcosina quando comparado com o grupo tratado com salina ($171,8 \pm 24,48\%$) após 20 minutos de isquemia ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni), não sendo observada nenhuma alteração entre os controles (Figura 4 B). Os dados de liberação de glutamato e produção de NO indicam que o pré-condicionamento com sarcosina reduz os principais sinais de excitotoxicidade durante a POG.

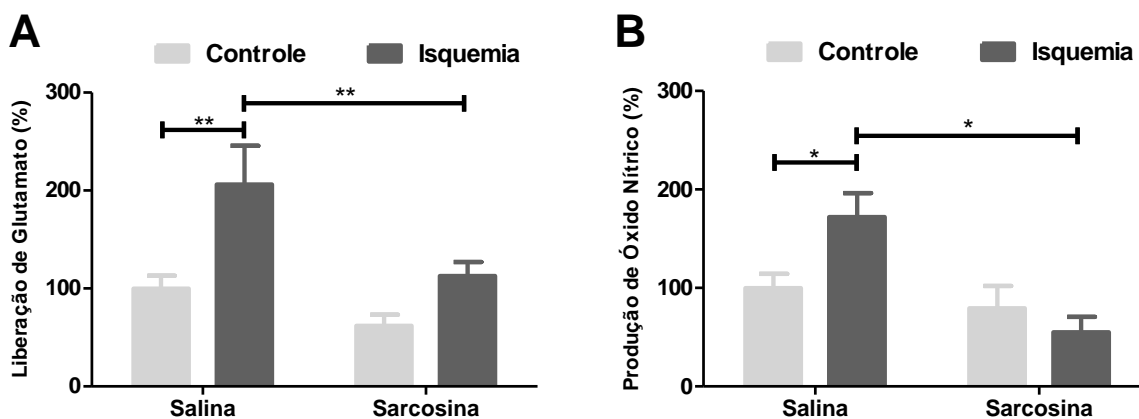


Figura 8. O pré-condicionamento com sarcosina reduz a liberação de fatores excitotóxicos durante a isquemia em fatias de hipocampo de ratos (A) Liberação de glutamato no sobrenadante de fatias de hipocampo após 20 min de POG. (B) Produção de NO no sobrenadante de fatias de hipocampo após 20 min de POG. Os resultados expressam a média \pm SEM de pelo menos cinco animais por grupo (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni).

6.1.4. O pré-condicionamento com sarcosina reduz o dano oxidativo durante a isquemia em fatias de hipocampo de ratos

O dano oxidativo é um dos principais responsáveis pela destruição das células durante o processo de I/R, estando diretamente envolvido na morte celular. Para avaliar este fenômeno, inicialmente foi avaliado o conteúdo de espécies reativas de oxigênio - EROs em fatias de hipocampo submetidas à POG (Figura 5 A). Os níveis de EROs aumentaram ($337,4 \pm 55,33\%$) em fatias de hipocampo após a lesão por I/R ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni). Em contrapartida, os níveis de EROs no hipocampo do grupo tratado com sarcosina foi menor ($61,12 \pm 15,35\%$) quando comparado ao hipocampo do grupo tratado com salina ($p < 0,05$ ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni), indicando que o tratamento com sarcosina reduziu a produção de EROs durante a lesão por I/R.

Uma análise de lipoperoxidação foi realizada para determinar o dano oxidativo no tecido submetido à lesão por I/R (Figura 5B). De acordo com os dados de produção de EROs, a lipoperoxidação do hipocampo do grupo tratado com salina submetido à POG aumentou ($144,6 \pm 16,34\%$) em relação ao controle. Após a lesão por I/R, o grupo tratado com sarcosina apresentou uma menor lipoperoxidação ($72,92 \pm 4,956\%$) quando comparado com o grupo tratado com salina ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni). Estes dados apontam que o pré-condicionamento com a sarcosina reduz o dano oxidativo gerado pela POG em fatias de hipocampo.

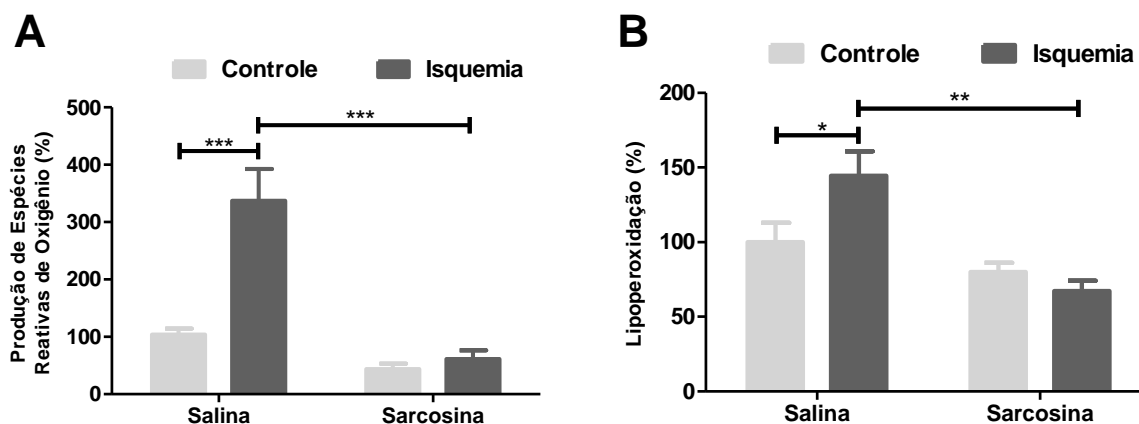


Figura 9. O pré-condicionamento com sarcosina reduz o dano oxidativo durante a isquemia em fatias de hipocampo de ratos. (A) A produção de ROS no homogenato de fatias de hipocampo após a lesão I/R (B) A Lipoperoxidação em fatias de hipocampo após lesão por I/R. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco animais por grupo (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni).

6.1.5. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a atividade das enzimas antioxidantes após a isquemia em fatias de hipocampo de ratos

A redução do dano oxidativo é um importante ponto para prevenção da lesão causada pela isquemia. Este efeito pode ser alcançado pelo aumento da capacidade antioxidante do tecido. Com o objetivo de entender o envolvimento das principais enzimas antioxidantes no efeito protetor do pré-condicionamento com sarcosina, a atividade das enzimas catalase-CAT e superóxido dismutase – SOD foram avaliadas após a lesão por I/R.

Nas fatias de hipocampo submetidas à POG, observamos uma redução na atividade da SOD ($77,97 \pm 11,29\%$) no grupo de animais tratado com salina ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni) (Figura 6 A). A atividade da SOD foi semelhante nos grupos controle e isquemia de animais tratados com sarcosina, bem como ao controle do grupo tratado com salina ($63,19 \pm 6,07\%$). Em contraste, houve aumento na atividade de CAT do grupo tratado com salina submetido à POG ($473,3 \pm 72,83\%$) quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni). Por outro lado, o grupo tratado com sarcosina apresentou menor atividade da CAT nas fatias de hipocampo submetidas à POG ($97,32 \pm 30,63\%$) quando comparado com o grupo salina ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni). Estes dados sugerem que a atividade das enzimas antioxidantes se mantém após a lesão de I/R em fatias de hipocampo de animais pré-condicionados com sarcosina

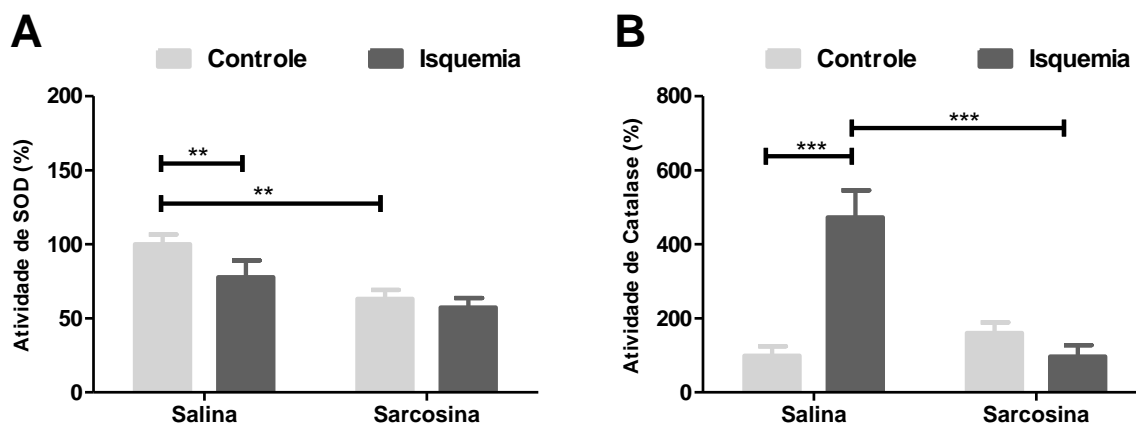


Figura 10. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a atividade das enzimas antioxidantes após a isquemia em fatias de hipocampo de ratos. (A) Atividade de SOD nas fatias de hipocampo após lesão por I/R. (B) Atividade de CAT nas fatias do hipocampo após lesão por I/R. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco animais por grupo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni).

6.1.6. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a atividade das enzimas do sistema glutaciona após a isquemia em fatias de hipocampo de ratos

O sistema glutaciona é um dos principais agentes antioxidantes, sendo responsável por eliminar o excesso de EROs do tecido, exercendo assim efeito protetor. Para determinar a participação do sistema glutaciona foi avaliado o conteúdo deste peptídeo, bem como as enzimas antioxidantes deste sistema (Figura 9).

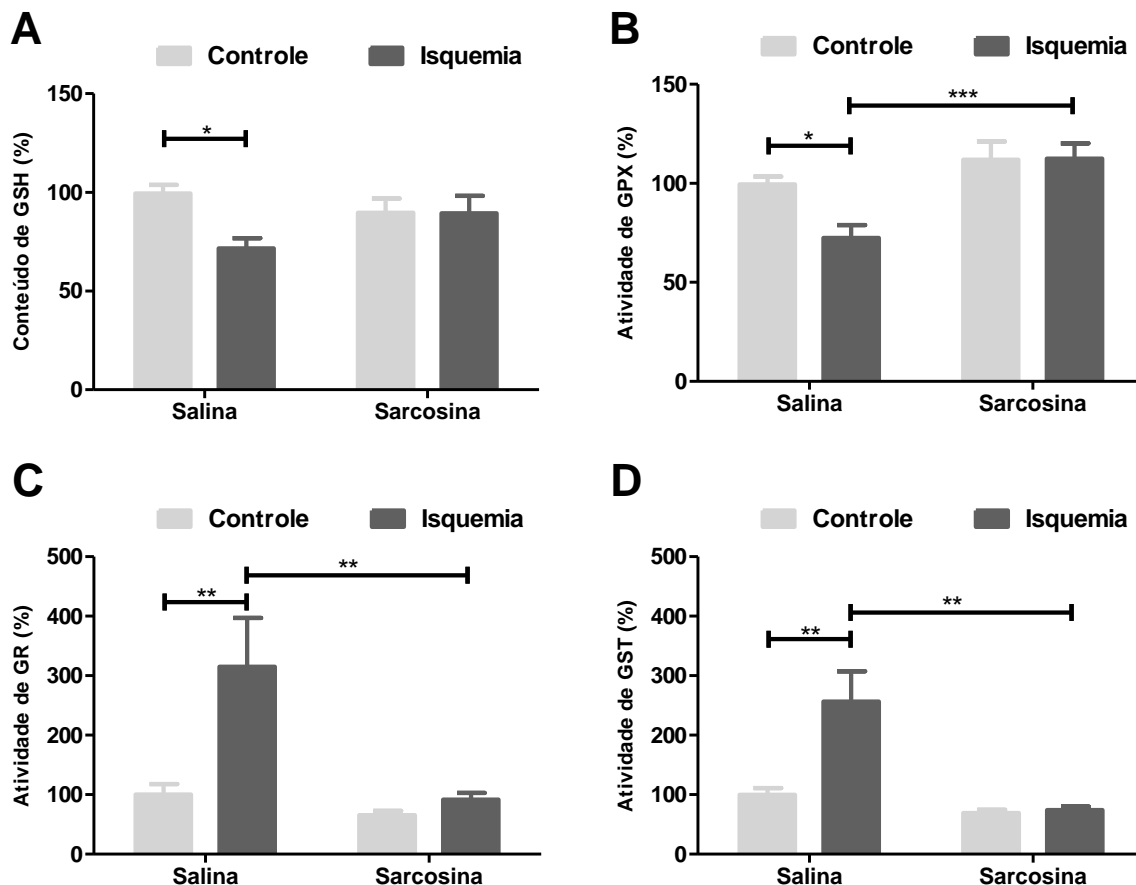


Figura 11. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a atividade das enzimas do sistema glutaciona após a isquemia em fatias de hipocampo de ratos. (A) Conteúdo de glutaciona em fatias de hipocampo. (B) Atividade da GPX de fatias do hipocampo. (C) Atividade de GR em fatias de hipocampo. (D) Atividade de GST de fatias de hipocampo. Os resultados expressam a média \pm EPM de pelo menos cinco animais por grupo (* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni).

Como esperado, houve uma diminuição no conteúdo de glutathiona total ($71,75 \pm 5,03\%$) nas fatias do grupo salina após POG ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni), o que não foi observado em fatias de hipocampo do grupo tratado com sarcosina (Figura 7 A). No grupo salina, as fatias submetidas à POG apresentaram uma redução ($72,39 \pm 6,51\%$) da atividade de glutathiona peroxidase - GPX ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni), perfil este que não foi observado no grupo tratado com sarcosina (Figura 9B).

Por outro lado, a atividade de glutathiona redutase - GR apresentou-se aumentada ($315,2 \pm 82,0\%$) no grupo salina após a POG ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni), efeito que não foi observado no grupo sarcosina submetido à POG, apesar de uma ligeira redução na atividade basal quando comparada com o grupo salina (Figura 7C). Da mesma forma, perfil semelhante foi observado para enzima glutathiona-S-transferase - GST (Figura 7D), que aumentou ($256,7 \pm 51,10\%$) sua atividade após a POG no grupo salina, porém não afetou sua atividade no grupo sarcosina ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni). Em conjunto, estes dados indicam que a atividade do sistema de glutathiona foi mantida após o processo de I/R em fatias de hipocampo de animais pré-condicionados com sarcosina.

6.1.7. O pré-condicionamento com sarcosina altera o perfil neuroquímico no hipocampo de ratos

Para compreender as alterações neuroquímicas induzidas pelo pré-condicionamento com sarcosina, escolhemos a dose de 300 mg/kg, que apresentou efeito neuroprotetor *ex vivo* e *in vivo*. Os três aminoácidos relacionados ao mecanismo de ação dos inibidores de GlyT-1 são a sarcosina, glicina e glutamato, e por isso, o conteúdo destes aminoácidos foram avaliados no hipocampo de ratos tratados com sarcosina e com salina através da técnica de CG-MS.

Como esperado, 24 horas após a aplicação da última injeção, os níveis de sarcosina no hipocampo aumentaram nos animais tratados ($7,09 \pm 2,37$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado com os animais controle ($1,96 \pm 0,13$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), ($p < 0,05$, teste T-Student, não pareado). Coerente com o efeito de inibição dos transportadores de glicina do tipo 1, foi observada uma redução nos níveis de glicina no hipocampo após o pré-condicionamento com sarcosina ($16,86 \pm 1,73$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado com o grupo controle ($26,05 \pm 3,91$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), de animais tratados com solução salina ($p < 0,05$, teste T-Student, não pareado). No entanto, o nível de glutamato no hipocampo do grupo tratado com sarcosina ($93,72 \pm 9,36$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) não apresentou diferença quando comparado ao grupo controle tratado com salina ($97,87 \pm 16,96$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) ($p > 0,05$, teste T-Student, não pareado). Os resultados podem ser observados na figura 12.

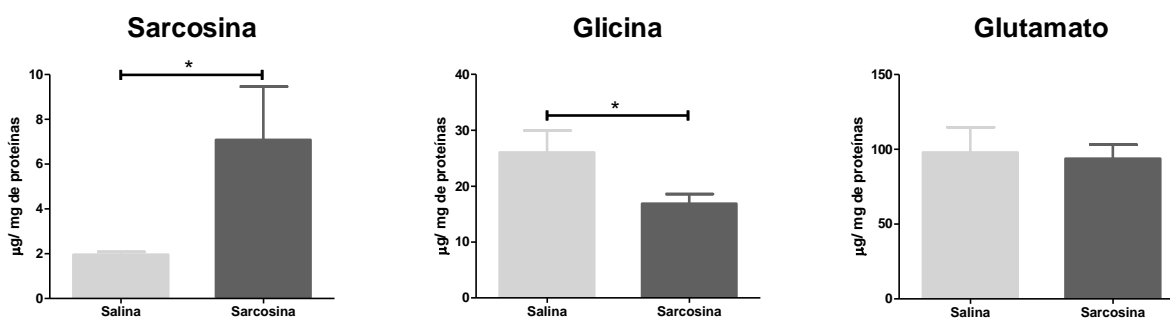


Figura 12. O pré-condicionamento com sarcosina altera o perfil neuroquímico do hipocampo.

Os animais foram tratados durante 7 dias e os hipocampos foram dissecados para análise. Os resultados são expressos em média \pm EPM para cada grupo de 5 animais (* $p < 0.05$, teste T-Student, não pareado).

6.1.8. O pré-condicionamento com sarcosina altera a expressão de transportadores de glicina

Com o objetivo de entender o impacto do pré-condicionamento com sarcosina sobre o equilíbrio entre a neurotransmissão glicinérgica e glutamatérgica, foi feita a avaliação dos transportadores de glicina e glutamato. A avaliação da expressão do transportador de GlyT-1, preferencialmente glial, apresentou-se reduzida ($76,07 \pm 5,05$ %) no grupo tratado com sarcosina quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$, teste *T-Student*, não pareado). Da mesma forma, o transportador de GlyT-2 também apresentou uma redução ($80,82 \pm 5,08$ %) quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$, teste *T-Student*, não pareado).

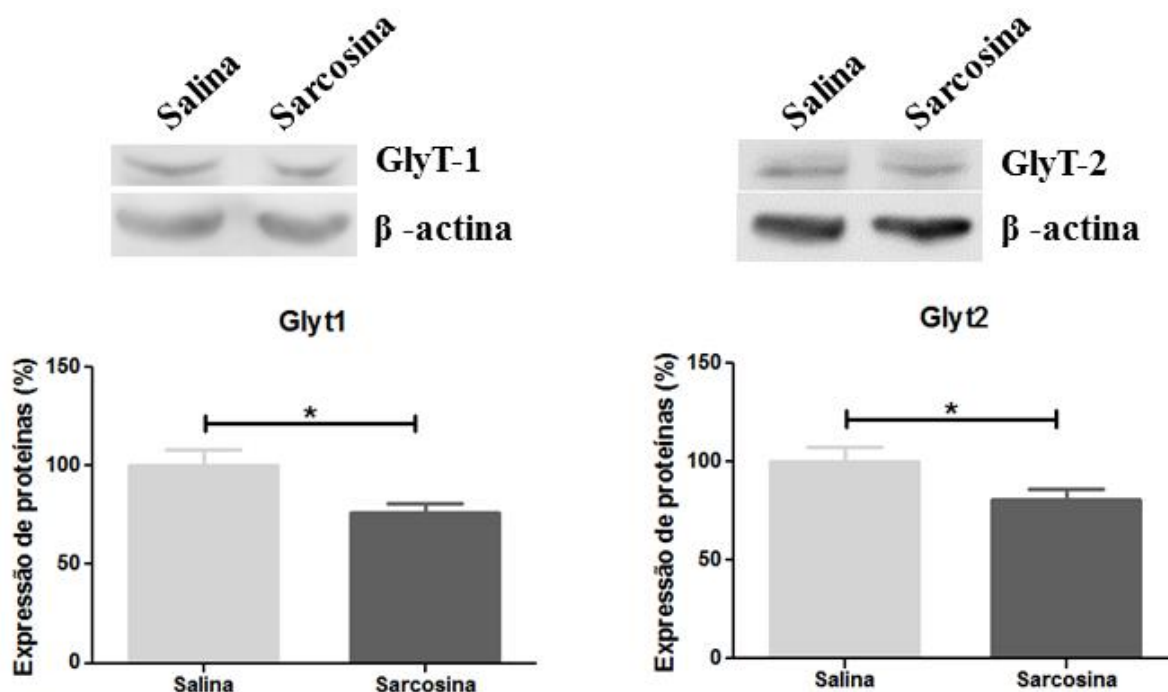


Figura 13. O pré-condicionamento com sarcosina altera a expressão de transportadores de glicina. Os animais foram tratados durante 7 dias e os hipocampus dissecados para análises. Os resultados expressam a média \pm EPM para cada grupo de 4 animais ($p < 0,05$, teste *T-Student*, não pareado).

6.1.9. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a expressão de transportadores de glutamato

Não se observou nenhuma diferença entre o grupo tratado com sarcosina e o grupo salina em relação ao transportador neuronal de glutamato (EAAT-3) (grupo salina, $100,0 \pm 10,63$ % e grupo sarcosina, $90,26 \pm 6,85$ %) e o transportador glial de glutamato (EAAT-2) (grupo salina, $100,0 \pm 2,36$ % e grupo sarcosina, $116,1 \pm 13,42$ %) ($p > 0,05$, teste *T-Student*). Os resultados podem ser visualizado na figura 14.

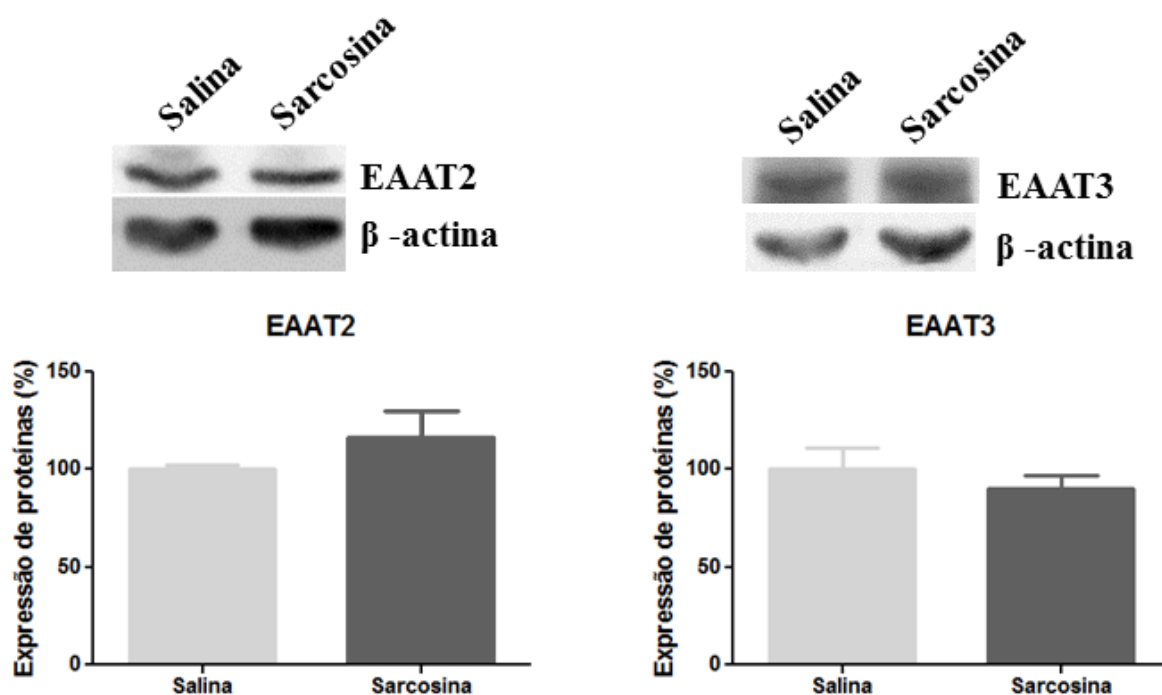


Figura 14. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a expressão de transportadores de glutamato. Os animais foram tratados durante 7 dias e os hipocampus dissecados para análises. Os resultados expressam a média \pm EPM para cada grupo de 4 animais ($p < 0,05$, teste *T-Student*, não pareado).

6.1.10. O pré-condicionamento com sarcosina altera o transportador de [³H]-Glicina no hipocampo de ratos

As diferenças encontradas na expressão dos transportadores de glicina levantou uma questão sobre o funcionamento destes transportadores após o pré-condicionamento com sarcosina no hipocampo dos ratos. Avaliamos também a captação de [³H]-glutamato, uma vez que as neurotransmissões glutamatérgicas e glicinérgicas são fortemente relacionadas no hipocampo. Em acordo com o observado na expressão de transportadores e conteúdo de neurotransmissores, a captação de [³H]-glutamato não apresentou diferenças quando comparadas com o grupo sarcosina ($93,35 \pm 10,57 \%$) e o grupo controle ($100,1 \pm 7,53\%$), ($p > 0,05$, teste T Student, não pareado).

Por outro lado, a captação de [³H]-glicina apresentou uma redução quando comparamos o grupo sarcosina ($79,19 \pm 4,38 \%$) com o grupo salina ($100,0 \pm 5,61 \%$), ($p < 0,05$, teste T Student, não pareado).

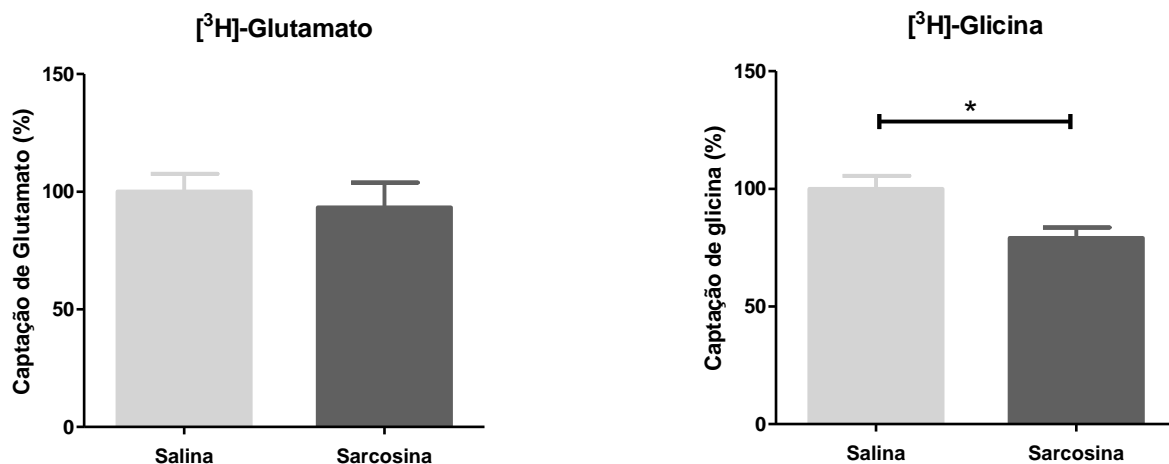


Figura 15. O pré-condicionamento com sarcosina altera a captação de glicina no hipocampo.

Os animais foram tratados durante 7 dias e os hipocampos dissecados para análises. Os resultados expressam a média \pm EPM para cada grupo de 5 animais ($p < 0,05$, teste *T-Student*, não pareado).

6.1.11. O pré-condicionamento com sarcosina altera a expressão da subunidade NR2B do receptor de NMDA no hipocampo

Para compreender o impacto do pré-condicionamento com sarcosina sobre o equilíbrio entre a neurotransmissão glicinérgica e glutamatérgica, foi avaliado a expressão dos receptores no hipocampo dos animais tratados. A expressão do receptor de glicina no grupo tratado com sarcosina ($86,86 \pm 6,268 \%$) não apresentou alteração quando comparado ao grupo tratado com salina ($99,92 \pm 4,04 \%$), ($p > 0,05$, teste *T-Student*). O mesmo perfil foi observado na subunidade NR1 do receptor de NMDA, sítio de ligação da glicina, onde o grupo sarcosina ($98,93 \pm 9,05 \%$), apresentou níveis equivalentes desta subunidade de NMDA quando comparado ao grupo salina ($100,0 \pm 12,59 \%$), ($p < 0,05$, teste *T-Student*).

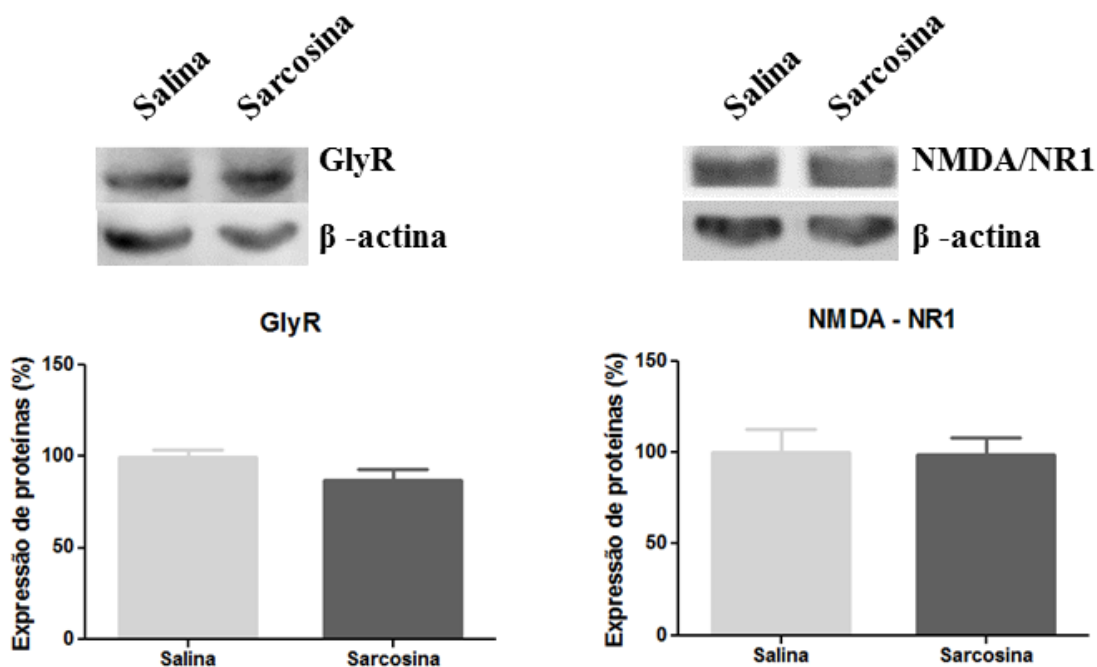


Figura 16. O pré-condicionamento com sarcosina não altera a expressão dos sítios de ligação de glicina nos receptores de glicina e NMDA. Os animais foram tratados durante 7 dias e os hipocampus dissecados para análises. Os resultados expressam a média \pm EPM para cada grupo de 4 animais ($p < 0,05$, teste *T-Student*, não pareado).

Em seguida, avaliamos se o pré-condicionamento com sarcosina influencia a expressão de diferentes subunidades de receptores de NMDA. Portanto, foi avaliada a expressão de NR2A, subunidade relacionada com os sinais pró-sobrevivência, e a expressão da subunidade NR2B, relacionada com os efeitos neurotóxicos. Não foi observado nenhuma diferença na expressão da subunidade NR2A nos animais tratados com salina ($99,93 \pm 10,06 \%$) ou com sarcosina ($101,0 \pm 10,88 \%$) ($p > 0,05$, teste *T-Student*). A subunidade NR2B dos animais do grupo sarcosina apresentou uma redução da expressão ($67,64 \pm 4,18\%$) quando comparada aos animais tratados com salina ($p < 0,05$, teste *T-Student*). Estes resultados mostram que há uma alteração na expressão de receptores de NMDA do tipo NR1/NR2A e NR1/NR2B, o que pode estar relacionado ao efeito de tolerância à isquemia em animais tratados com sarcosina.

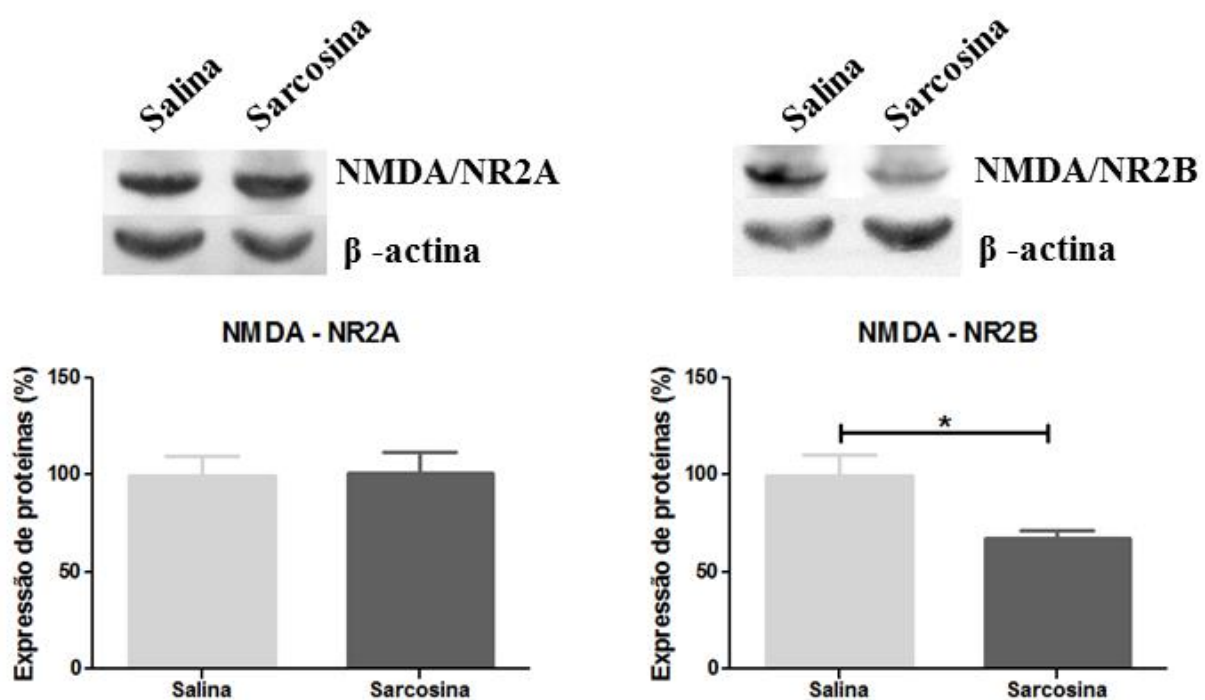


Figura 17. O pré-condicionamento com sarcosina altera a expressão da subunidade NR2B do receptor de NMDA. Os animais foram tratados durante 7 dias e os hipocampos dissecados para análises. Os resultados expressam a média \pm EPM para cada grupo de 4 animais ($p < 0,05$, teste *T-Student*, não pareado).

6.2. Indução farmacológica de tolerância à excitotoxicidade pelo pré-condicionamento com NFPS

Nesta etapa do trabalho, selecionamos um potente e seletivo inibidor de GlyT-1, o NFPS, e estabelecemos um modelo de excitotoxicidade através da aplicação de NMDA no hipocampo. Para minimizar os gastos relacionados a este fármaco nós utilizamos camundongos.

6.2.1. Efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NFPS em modelo de excitotoxicidade

O efeito pré-condicionante do tratamento com NFPS, um potente inibidor de GlyT-1, foi realizado em camundongos C57bl/6, usando o modelo de dano excitotóxico induzido pela aplicação intrahipocampal de NMDA. O implante da cânula guia no hipocampo do camundongo foi realizado cinco dias antes da aplicação dos fármacos, com o objetivo de evitar a influência do anestésico sobre o cérebro dos animais. Os animais foram tratados com três diferentes doses do fármaco NFPS (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg) e o grupo controle foi tratado apenas com a solução salina. As doses foram selecionadas baseando-se em achados comportamentais de artigos na literatura. Vinte e quatro horas após o pré-condicionamento, os animais receberam uma aplicação intrahipocampal de 1 µL de solução salina de NMDA 40 mM. Os animais foram eutanasiados 24 horas após o insulto excitotóxico e o cérebro removido para análise. A análise de morte neuronal foi feita por microscopia pela coloração de Flouoro Jade C (Figura 21).

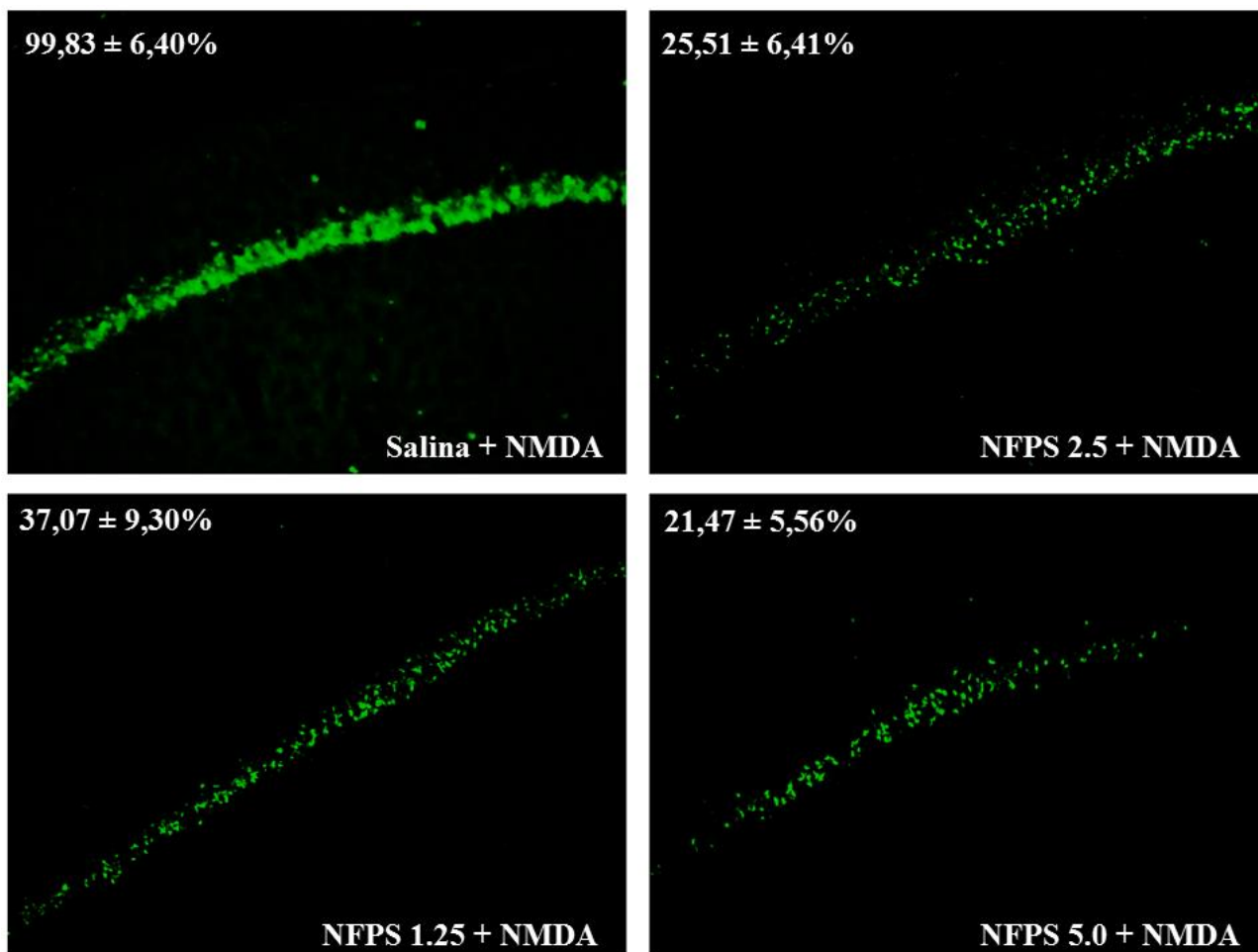


Figura 18. Imagens representativas da proteção gerada pelo pré-condicionamento com NFPS no hipocampo de camundongos submetidos ao insulto excitotóxico. Os neurônios da região CA1 do hipocampo foram analisados após insulto excitotóxico utilizando o marcador Fluoro Jade C. Os animais foram avaliados 24 horas após o insulto. O aumento original foi de 40X.

O pré-condicionamento com NFPS apresentou efeito neuroprotetor em todas as doses avaliadas. A dose de 1,25 mg/kg de NFPS apresentou $37,07 \pm 9,30\%$ de morte neuronal, a dose de 2,5 mg/kg de NFPS apresentou $25,51 \pm 6,41\%$ e a dose de 5,0 mg/kg de NFPS apresentou $21,47 \pm 5,56\%$, sendo menor do que nos animais que receberam apenas salina que apresentaram $99,83 \pm 6,40\%$ ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey).

Estes resultados apontam para um efeito neuroprotetor, dose-dependente, do pré-condicionamento com NFPS no hipocampo de camundongos submetidas ao modelo de aplicação intrahipocampal de NMDA (Figura 22).

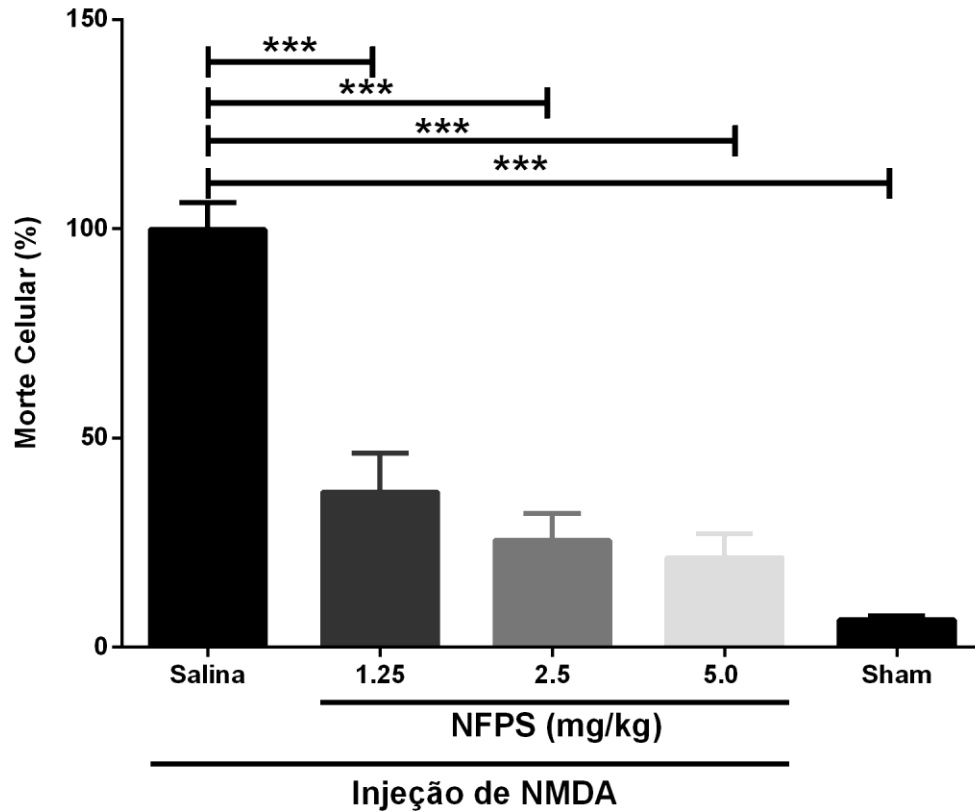


Figura 19. O pré-condicionamento com NFPS induz neuroproteção contra o insulto excitotóxico em camundongos. Os animais foram tratados com NFPS 24 horas antes da indução do insulto excitotóxico. O insulto excitotóxico foi gerado pela aplicação intrahipocampal de 1 μ L da solução de NMDA 40 mM. A morte celular foi avaliada em fatias de hipocampo 24 horas após o insulto. Os resultados estão expressos em média \pm EPM para cada grupo com 5 animais ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

6.2.2. O pré-condicionamento com NFPS altera o perfil neuroquímico no hipocampo de camundongos

Após a observação dos efeitos neuroprotetores induzidos pelo pré-condicionamento com NFPS, nós avaliamos as alterações neuroquímicas geradas por este tratamento nas doses de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg. Foram avaliados o conteúdo de glicina e glutamato no hipocampo de camundongos tratados com NFPS e com salina através da técnica de CG-MS.

Os dois principais aminoácidos relacionados ao mecanismo do NFPS são o glutamato e a glicina. Os níveis de glicina no hipocampo de animais tratados com 1,25 mg/kg de NFPS ($2,32 \pm 0,45$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) não alterou quando comparado ao controle ($3,11 \pm 0,22$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), ($p > 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey). Os níveis de glicina no hipocampo de animais tratados com 2,5 mg/kg de NFPS ($6,67 \pm 0,63$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) e com 5,0 mg/kg de NFPS ($6,97 \pm 0,30$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) foram maiores quando comparados com os animais controle ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey).

O nível de glutamato no hipocampo de animais tratados com 1,25 mg/kg de NFPS ($4,20 \pm 1,13$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) não apresentou alteração significativa quando comparado ao controle ($1,78 \pm 0,46$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), ($p > 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey). Os níveis de glutamato nas doses de 2,5 mg/kg de NFPS ($6,27 \pm 1,07$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) e de 5,0 mg/kg de NFPS ($8,77 \pm 0,713$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) aumentaram quando comparados ao controle ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

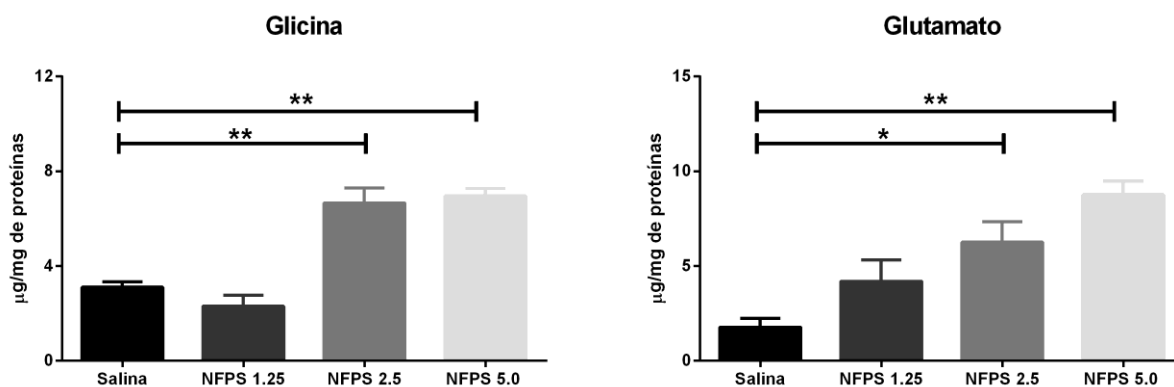


Figura 20. O pré-condicionamento com NFPS altera o perfil neuroquímico do hipocampo. A neuroquímica hipocampal foi avaliada no homogenato de hipocampo 24 horas após o tratamento com NFPS. Os resultados estão expressos em média \pm EPM para cada grupo com 5 animais ($P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey).

6.2.3. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão de transportadores de glicina

Após observar as alterações neuroquímicas no conteúdo de glicina do hipocampo de animais pré-condicionados com NFPS, nós realizamos a avaliação da expressão das proteínas GlyR, GlyT-1 e GlyT-2, principais envolvidas na neurotransmissão glicinérgica no hipocampo.

A expressão de GlyT-1 não apresentou diferenças significativas nas doses de 1,25 mg/kg ($82,71 \pm 32,34\%$) e na dose de 2,5 mg/kg ($86,41 \pm 8,46\%$) quando comparadas ao controle ($100,4 \pm 8,20$), porém houve uma redução da expressão desta proteína no hipocampo de animais tratados com 5,0 mg/kg de NFPS ($61,66 \pm 11,07\%$), ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

A expressão de GlyT-2 apresentou uma tendência oposta ao observado com GlyT-1. As doses de 2,5 mg/kg ($210,2 \pm 39,67\%$) e de 5,0 mg/kg ($244,4 \pm 21,64\%$) aumentaram significativamente a sua expressão quando comparadas ao controle ($100,0 \pm 16,10$) ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey). No grupo tratado com a dose 1,25 mg/kg ($188,0 \pm 10,07\%$) foi observado uma tendência de aumento sem diferença significativa.

A expressão dos receptores de glicina (GlyR) não apresentaram alterações significativas após o tratamento com NFPS, quando comparadas ao controle. Com bases nestes dados, observamos que nas maiores doses há uma alteração no equilíbrio de expressão dos transportadores GlyT-1 (redução) e GlyT-2 (aumento).

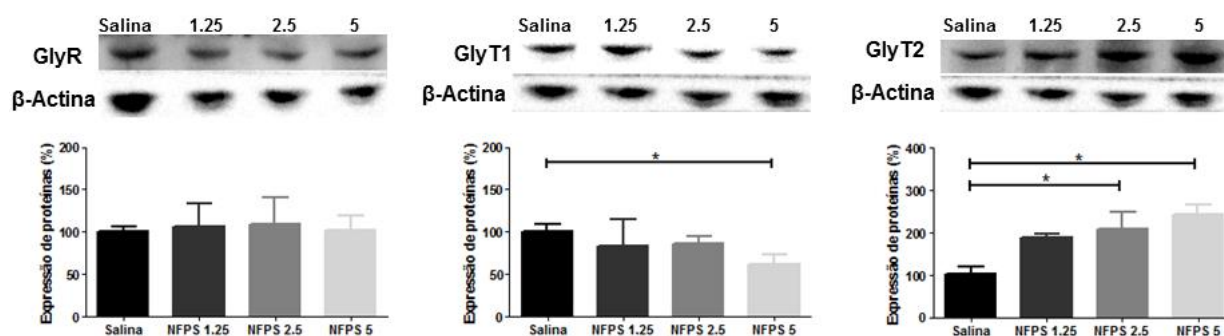


Figura 21. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão de transportadores de glicina. A expressão de proteínas associadas à neurotransmissão glicinérgica foi avaliada no homogenato de hipocampo 24 horas após o tratamento com NFPS. Os resultados estão expressos em média \pm EPM para cada grupo com 4 animais ($P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

6.2.4. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão de transportadores de glutamato

Após a observação da alteração do conteúdo de glutamato em fatias de hipocampo de animais tratados com NFPS, foi avaliada a expressão dos três principais transportadores de glutamato no hipocampo. O transportador EAAT-1 (glial) apresentou uma tendência de aumento para animais tratados com NFPS. Em animais tratados com NFPS na dose de 1,25 mg/kg ($126,6 \pm 16,53\%$) e na dose de 2,5 mg/kg ($150,0 \pm 30,45\%$) não houve diferença na expressão de EAAT-1 quando comparado ao controle ($100,0 \pm 10,07\%$). Observou-se um aumento da expressão de EAAT-1 em animais tratados com 5,0 mg/kg de NFPS ($230,2 \pm 49,25\%$) quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

A expressão de EAAT-2 aumentou em animais tratados com 5,0 mg/kg de NFPS ($183,5 \pm 20,71\%$) quando comparado ao grupo controle ($100,0 \pm 4,321\%$) ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey). Este efeito não foi observado nas doses de 1,25 mg/kg ($109,8 \pm 17,94\%$) e 2,5 mg/kg ($126,5 \pm 21,20\%$).

A expressão de EAAT-3 apresentou o mesmo perfil de aumento observado nos outros transportadores de glutamato. Os grupos tratados com 1,25 mg/kg de NFPS ($150,4 \pm 14,08\%$) e 2,5 mg/kg de NFPS ($159,2 \pm 43,13\%$) não apresentaram diferenças quando comparados ao controle ($100,0 \pm 8,58\%$), porém o grupo tratado com a dose 5.0 mg/kg ($230,1 \pm 43,00\%$) apresentou um aumento na expressão de EAAT-3 ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

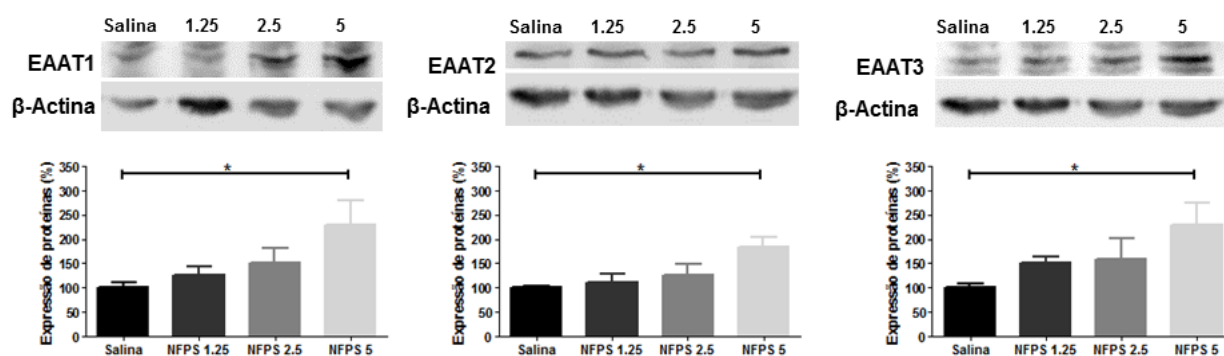


Figura 22. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão de transportadores de glutamato. A expressão de proteínas associadas à captação de glutamato foi avaliada no homogenato de hipocampo 24 horas após o tratamento com NFPS. Os resultados estão expressos em média \pm EPM para cada grupo com 4 animais ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

6.2.5. O pré-condicionamento com NFPS altera a captação de [³H]-glicina e [³H]-glutamato no hipocampo de camundongos

Devido às diferenças encontradas na expressão de transportadores de glicina e de glutamato no hipocampo de camundongos, nós avaliamos a captação de glicina e glutamato em fatias de hipocampo de animais tratados com NFPS. Os animais foram tratados com diferentes doses de NFPS (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg) e solução salina e eutanasiados 24 horas após a injeção para realização dos experimentos.

A captação de [³H]-glicina nos grupos tratados com 1,25 mg/kg de NFPS ($101,1 \pm 10,67\%$) e 2,5 mg/kg de NFPS ($107,1 \pm 8,60\%$) foi similar ao encontrado no grupo controle ($99,35 \pm 3,03\%$). A captação de [³H]-glicina no grupo de animais tratados com 5,0 mg/kg ($144,4 \pm 15,50\%$) foi maior que o encontrado no grupo controle ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey). A captação de [³H]-glutamato no grupo tratado com 1,25 mg/kg de NFPS ($101,6 \pm 6,84\%$) não apresentou diferença quando comparada ao grupo controle ($100,0 \pm 5,17\%$). O grupo tratado com 2,5 mg/kg de NFPS ($127,5 \pm 17,88\%$) não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle, porém ele apresentou uma tendência de aumento na captação de [³H]-glutamato. O tratamento com 5,0 mg/kg de NFPS ($150,2 \pm 13,06\%$) aumentou a captação de [³H]-glutamato quando comparado ao controle. Assim, na dose mais alta, o tratamento com NFPS aumentou a captação [³H]-glicina e [³H]-glutamato no hipocampo de camundongos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

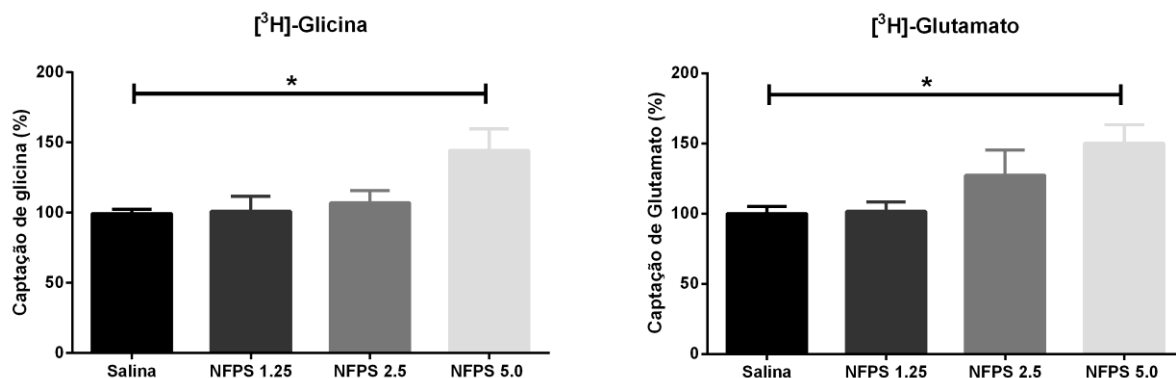


Figura 23. O pré-condicionamento com NFPS altera a captação de [³H]-glicina e [³H]-glutamato no hipocampo de camundongos. A captação de [³H]-glicina e [³H]-glutamato no hipocampo foram avaliadas no homogenato de hipocampo 24 horas após o tratamento com NFPS. Os resultados estão expressos em média \pm EPM para cada grupo com 5 animais ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

6.2.6. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão das subunidades NR2 do receptor de NMDA no hipocampo

Por último, nós avaliamos a expressão das principais subunidades do receptor de NMDA, principal alvo do condicionamento cerebral. Os animais foram tratados com NFPS e eutanasiados 24 horas após o tratamento. A subunidade NR1, sítio de ligação de glicina, não apresentou diferença significativa após o pré-condicionamento com NFPS quando comparado ao controle ($100,0 \pm 12,48\%$), apesar de ser observado uma tendência de aumento na dose 5,0 mg/kg de NFPS ($142,6 \pm 36,28\%$).

O pré-condicionamento com NFPS também não alterou a expressão da subunidade NR2A no hipocampo quando comparado ao controle ($100,0 \pm 4,21\%$), porém houve uma tendência de redução a partir da dose de 2,5 mg/kg de NFPS ($67,80 \pm 19,28\%$) e na dose de 5,0 mg/kg de NFPS ($63,28 \pm 25,66\%$).

O pré-condicionamento com NFPS reduziu a expressão da subunidade NR2B nas doses de 1,5 mg/kg ($59,62 \pm 9,70\%$), 2,5 mg/kg ($51,21 \pm 8,26\%$) e 5,0 mg/kg ($49,56 \pm 10,11\%$) quando comparado aos animais tratados com salina ($49,56 \pm 10,11\%$) ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

Estes resultados demonstram que o pré-condicionamento com NFPS reduz a expressão da subunidade NR2B do receptor de NMDA e altera o equilíbrio de expressão entre as subunidades NR2A e NR2B, mesmo na menor dosagem testada.

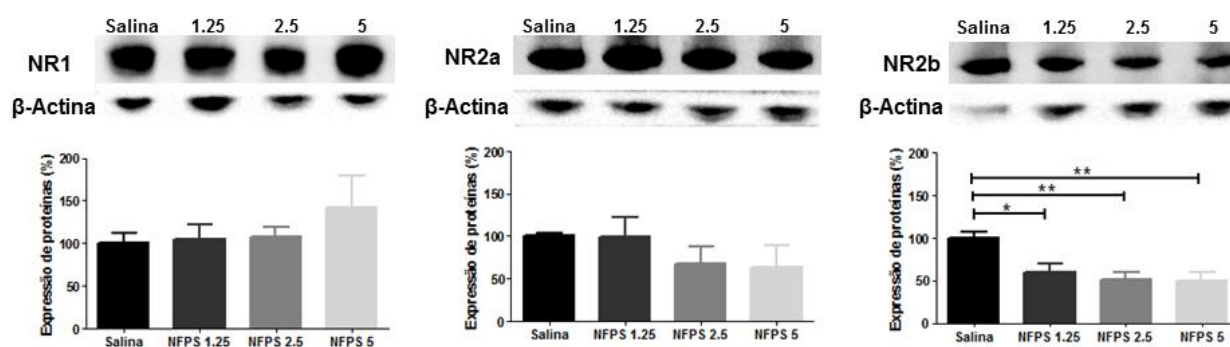


Figura 24. O pré-condicionamento com NFPS altera a expressão da subunidade NR2B do receptor de NMDA. A expressão das subunidades do receptor de NMDA foi avaliada no homogenato de hipocampo 24 horas após o tratamento com NFPS. Os resultados estão expressos em média \pm EPM para cada grupo com 4 animais ($P < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey).

7. Discussão

7.1. Tolerância isquêmica em ratos pré-condicionados com sarcosina

Na primeira etapa do trabalho, nós demonstramos que o pré-condicionamento sarcosina, um inibidor do transportador de glicina do tipo 1, promove tolerância á morte de células hipocampais causada por insulto isquêmico em modelos *ex-vivo* e *in vivo* de isquemia cerebral.

A sarcosina é um inibidor competitivo de GlyT-1 (IC₅₀: 40-150 µM) no tecido neuronal, porém também pode exercer atividade de co-agonista em receptores NMDA (IC₅₀: 26 µM), sendo também um agonista fraco de receptores de glicina (IC₅₀: 3 mM) (Zhang, Lyons-Warren e Thio, 2009). O principal efeito farmacológico dos inibidores de GlyT-1 é a potencialização da neurotransmissão glutamatérgica através dos receptores NMDA, uma vez que essa inibição aumenta a disponibilidade de glicina na fenda sináptica, co-agonista destes receptores (Chen, Muhlhauser e Yang, 2003), (Kinney *et al.*, 2003), (Lim, Hoang e Berger, 2004). No estado fisiológico, os sítios da glicina nos NMDAR não estão saturados na fenda sináptica sendo que o bloqueio de GlyT-1 é capaz de aumentar as correntes de NMDAR em neurônios piramidais na região de CA1, o LTP no hipocampo, porém não altera a frequência de disparo dos receptores (Bergeron *et al.*, 1998), (Martina *et al.*, 2004), (Zhang, Lyons-Warren e Thio, 2009).

O pré-condicionamento com sarcosina reduziu o número de células mortas na região de CA1 de fatias de hipocampo de ratos submetidas à POG, bem como reduziu a ativação de caspase-3, uma proteína que é ativada durante o fenômeno de morte por apoptose. Também observamos que o pré-condicionamento com sarcosina foi capaz de gerar proteção no hipocampo de animais submetidos ao modelo de 4VO, confirmando os achados *ex-vivo*. A abordagem farmacológica que adotamos para este trabalho está relacionada a uma vertente que vem crescendo nas publicações científicas na última década. Este nova vertente está mais focada em gerar uma neuromodulação prévia que promova resistência ao processo excitotóxico do que em uma intervenção direta sobre o sistema durante o insulto. Este debate ganhou muita força com a descoberta do efeito neuroprotetor da ceftriaxona (CFT), um antibióticos beta-lactâmicos, através de uma triagem de alta eficiência com 10 mil substâncias (Rothstein *et al.*, 2005). A neuroproteção induzida pela CFT foi confirmada em modelos *in vitro* e *in vivo* de isquemia cerebral após cinco dias de tratamento em ratos, sendo o principal mecanismo descrito o aumento da expressão de transportadores de glutamato EAAT-2 em astrócitos, e, por conseguinte, promover o aumento da captação de glutamato durante o processo excitotóxico (Lipski *et al.*, 2007), (Chu *et al.*, 2007). Apesar destes resultados, as aplicações clínicas de CFT são limitadas devido aos riscos de desenvolvimento de resistência bacteriana.

Há interessantes achados na literatura que demonstram que a ativação de receptores de NMDA, normalmente associados à excitotoxicidade, quando realizada em doses não-convulsivantes e não-excitotóxicas, induz tolerância a excitotoxicidade em diversos modelos experimentais (Ogita *et al.*, 2003), (Boeck *et al.*, 2004), (Miao *et al.*, 2005), (Gidday, 2006), (Chu *et al.*, 2007), (Turovskaya *et al.*, 2011). Este efeito está diretamente associado ao aumento da excitabilidade neuronal e com a ativação de vias de sobrevivência tais como ativação de PKA, PI3K, MEK, ERK1/2, CREB (Soriano *et al.*, 2006), (De Araújo Herculano *et al.*, 2011), (Navon *et al.*, 2012). Uma vez que os inibidores de GlyT-1 também estimulam a ativação de NMDAR (Chen, Muhlhauser e Yang, 2003), (Kinney *et al.*, 2003), (Lim, Hoang e Berger, 2004), é coerente assumir que a neuroproteção observada com o pré-condicionamento com sarcosina esteja intimamente relacionada aos receptores de NMDA e à modulação da neurotransmissão glutamatérgica.

De acordo com essa proposição, nós observamos uma redução na liberação de glutamato durante a lesão de I/R em fatias de hipocampo de animais tratados com sarcosina quando comparados aos animais do grupo salina. A liberação exacerbada de glutamato está diretamente associada ao fenômeno de excitotoxicidade (Stocca e Vicini, 1998), (Chen, Muhlhauser e Yang, 2003), (Szydłowska e Tymianski, 2010), (Papouin *et al.*, 2012). A redução da liberação de glutamato durante o evento isquêmico pode estar associada a diferentes mecanismos como, redução da exocitose, aumento da captação de glutamato ou até mesmo redução da cascata glutamatérgica de morte neuronal (Stocca e Vicini, 1998), (Chen, Muhlhauser e Yang, 2003), (Lipski *et al.*, 2007), (Chu *et al.*, 2007), (Liang *et al.*, 2008), (Szydłowska e Tymianski, 2010), (Qian *et al.*, 2011), (Papouin *et al.*, 2012). Estudos recentes têm demonstrado que algumas drogas neuroprotetoras também interferem na liberação de glutamato durante a lesão neuronal. O tratamento com resveratrol (30 mg/kg) durante 7 dias apresentou efeito neuroprotetor no modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) em ratos (Li *et al.*, 2010). Este efeito apresentou-se associado a diminuição na liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato, aspartato e D-serina) durante a lesão de I/R e também ao aumento nos níveis basais de neurotransmissores inibitórios (GABA, glicina e taurina).

Outro mediador importante para o fenômeno de excitotoxicidade é o óxido nítrico produzido pela nNOS. Neste trabalho, observamos que o tratamento com sarcosina diminuiu a produção de NO em fatias de hipocampo após POG. Este dado é coerente com aquele encontrado para liberação de glutamato, visto que os receptores de NMDA e a enzima nNOS estão fisicamente ligados em diversos pontos dos neurônios através da proteína de ancoragem PSD-95 (Jiménez *et al.*, 2011). De fato, Leite *et al.* 2012 demonstrou que o treinamento físico (natação) também foi capaz de reduzir tanto a liberação de glutamato quanto a produção de NO em fatias de hipocampo submetidas à

isquemia (Leite *et al.*, 2012). Similarmente, nossos achados indicam que a redução da morte celular está associada à redução da liberação de mediadores excitotóxicos.

A produção de EROs está intimamente ligada ao influxo de Ca^{2+} gerado pela ativação de NMDAR e é um dos principais responsáveis pelos danos observados no sistema após o processo de I/R (Stocca e Vicini, 1998), (Chen, Muhlhauser e Yang, 2003), (Papouin *et al.*, 2012). No grupo de animais tratados com sarcosina foi observado uma redução na produção de EROs nas fatias de hipocampo submetidas à POG. Em conformidade com a redução da produção de EROs durante o insulto isquêmico, também foi observada a redução da lipoperoxidação em fatias de hipocampo de animais tratados com sarcosina quando comparados ao animais tratados com salina. Um efeito similar foi observado por Simão *et al.* (2011) no pré-condicionamento com resveratrol, que diminuiu a produção de EROS e NO após uma hora de indução de isquemia por 4VO, prevenindo assim os danos da isquemia cerebral (Simão *et al.*, 2011). Assim, entendemos que o principal agente de destruição intracelular durante a lesão por I/R está reduzido nas fatias de hipocampo submetidas à POG de animais pré-condicionados com sarcosina.

Uma vez que as EROs são as responsáveis pelo dano intracelular observado durante o insulto de I/R e o pré-condicionamento com sarcosina reduziu drasticamente a produção destas moléculas durante a isquemia, nós realizamos análises para averiguar se este efeito estava relacionado à capacidade antioxidante do sistema pré-condicionado. Inicialmente, foram avaliadas duas principais enzimas antioxidantes das células: superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Curiosamente, o pré-condicionamento com sarcosina não alterou a atividade basal de SOD ou CAT, porém conservou a atividade enzimática após o insulto isquêmico. Outro importante sistema antioxidante no SNC é o sistema de glutathiona, que também está envolvido no controle de peróxidos dentro das células cerebrais, bem com na proteção contra a EROs (Ralf, 2000). Como observado com as enzimas SOD e CAT, o pré-condicionamento com sarcosina não alterou a atividade basal das enzimas do sistema glutathiona com a manutenção da capacidade antioxidante após a POG. Estudos *in vitro* utilizando PCI relataram um aumento na expressão e atividade da enzima SOD na condição basal (Arthur *et al.*, 2004), (Danielisová *et al.*, 2005), bem como um aumento da atividade GPX e GR (Arthur *et al.*, 2004). Já o pré-condicionamento por exercício físico foi capaz de aumentar a atividade SOD em fatias de hipocampo de ratos (Leite *et al.*, 2012). Em modelos de isquemia *in vivo* o PCI não alterou a atividade de SOD e nem de enzimas do sistema glutathiona (Puisieux *et al.*, 2004), porém aumentou a atividade de CAT (Puisieux *et al.*, 2004). Os nossos resultados sugerem que o pré-condicionamento com sarcosina apresenta um mecanismo de ação independente das principais enzimas antioxidantes, diferentemente do observado no pré-condicionamento isquêmico e no pré-condicionamento com o exercício físico.

Estes resultados fornecem uma boa visão em relação ao que acontece durante o evento isquêmico em fatias de hipocampo. Vimos que o pré-condicionamento com sarcosina é capaz de induzir tolerância isquêmica no hipocampo e que está associado com a liberação de glutamato e produção de NO e EROS. No entanto, a neuroproteção observada não parece estar relacionada à capacidade antioxidante do tecido, sendo observada uma manutenção dos níveis de atividade das enzimas antioxidantes e os níveis de glutathiona reduzida após a POG em fatias de hipocampo de animais tratados com sarcosina. Com base nestes achados, entendemos que o pré-condicionamento com sarcosina interfere no fenômeno de excitotoxicidade, evitando uma liberação exacerbada de glutamato, o que poderia explicar uma menor produção de NO e EROS, a manutenção do funcionamento das enzimas antioxidantes e a prevenção da morte neuronal (Figura 25). Estes achados explicam a redução da morte neuronal, porém qual seria o mecanismo envolvido na prevenção da excitotoxicidade?

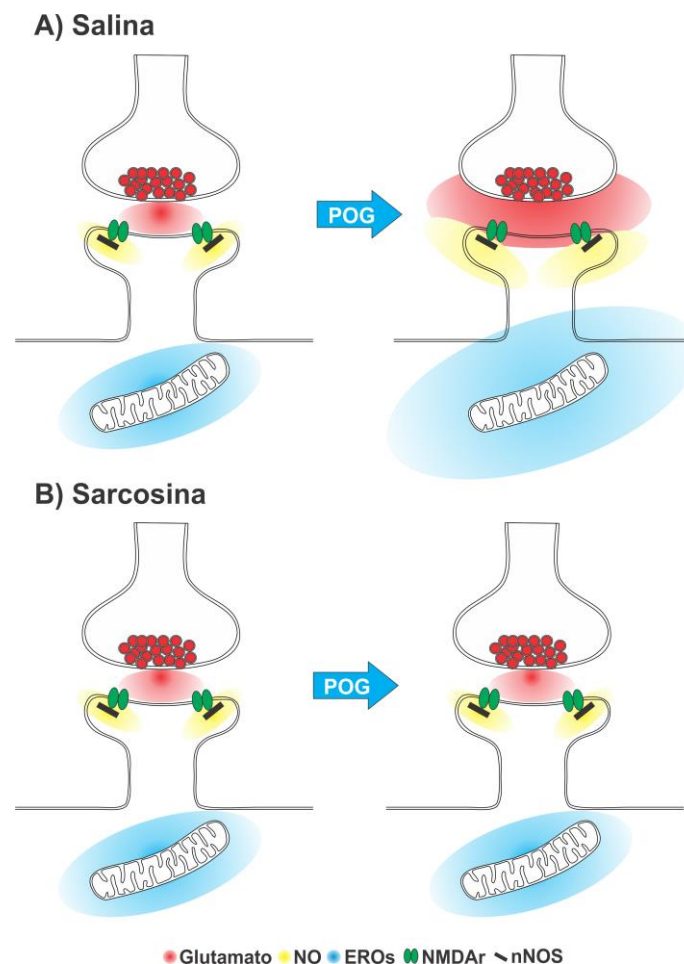


Figura 25. Mecanismo de neuroproteção durante o evento excitotóxico. A) Neurônios glutamatérgicos submetidos à privação de oxigênio-glicose (POG). B) Neurônios glutamatérgicos pré-condicionados com sarcosina e submetidos à POG. O pré-condicionamento com sarcosina reduz a liberação de glutamato durante a POG, prevenindo a produção de EROS e NO.

Uma vez que o mecanismo de ação da sarcosina está intimamente relacionado à neurotransmissão glicinérgica e glutamatérgica, realizamos testes para entender a neuroquímica dos animais pré-condicionados, porém não submetidos ao insulto isquêmico. Nós observamos que 24 horas após a última administração de sarcosina, os níveis deste aminoácido ainda estavam elevados no hipocampo dos animais tratados. Coerente com um efeito de bloqueio prolongado do transportador de glicina do tipo-1, o tratamento com sarcosina reduziu a quantidade de glicina no hipocampo (intracelular), embora não tenha causado alterações nos níveis de glutamato. Um contraponto interessante aos efeitos neuroquímicos observados pelo pré-condicionamento com sarcosina pode ser observado no tratamento crônico com fenciclidina, um antagonista de NMDAR. No trabalho publicado por Hashimoto et al. (2008), após 10 dias de tratamento com fenciclidina houve uma redução na concentração de glutamato no hipocampo, porém não foram observadas alterações em outros aminoácidos tais como glutamina, glicina, L-serina e D-serina (Hashimoto *et al.*, 2008). O tratamento com fenciclidina foi capaz de aumentar a expressão de GlyT-1 no hipocampo e também aumentar a susceptibilidade à neurotoxicidade devido ao aumento na expressão de NMDAR (Mezler *et al.*, 2008).

As alterações observadas nos níveis hipocámpais de aminoácidos de animais pré-condicionados com sarcosina indicam que o mecanismo neuroprotetor esteja relacionado com o equilíbrio glutamato-glicina no hipocampo. Curiosamente, através de Western Blot, nós observamos que o pré-condicionamento com sarcosina gerou a redução dos dois tipos de transportadores de glicina no hipocampo, o que é corroborado pela redução da captação de glicina tritiada por fatias de hipocampo, observada nos ensaios de captação de glicina. Nossos achados indicam que os níveis farmacológicos de sarcosina sobrecarreguem os transportadores de glicina, o que estaria levando a infra-regulação destes transportadores.

No hipocampo, a principal função de GlyT-1 é regular a neurotransmissão glutamatérgica através do controle da captação de glicina nas sinapses, enquanto GlyT-2 é importante para captação neuronal rápida e eficiente de glicina para a neurotransmissão glicinérgica (Fernández - Sánchez et al 2009), (de Juan- Sanz et al. 2013). O tráfico e endocitose de transportadores de glicina ocorrem através de uma via dependente de clatrina, sendo estimulada pela ativação da proteína quinase C (PKC) e controlada por ubiquitinação (Fernández-Sánchez *et al.*, 2009), (De Juan-Sanz *et al.*, 2013). Como a PKC é influenciada pela sinalização de Ca^{2+} (Bazzi e Nelsestuen, 1990), (Zheng *et al.*, 1997), a redução da expressão de transportadores de glicina pode estar relacionada ao aumento da atividade NMDAR e amplitude de LTP causados pela administração de sarcosina.

Além dos transportadores de glicina e glutamato, também foram avaliados os principais receptores relacionados ao mecanismo de ação da sarcosina (GlyR e de NMDAR). Não observamos

nenhuma alteração na expressão dos receptores de glicina. Similarmente, não foi observada nenhuma alteração na expressão da subunidade NR1 dos receptores de glutamato, área responsável pela ligação de co-agonistas como a glicina. Apesar da expressão destes receptores ter apresentado níveis equivalentes entre animais tratados com salina ou com sarcosina, ainda não é possível excluir a hipótese da alteração da distribuição destes receptores dentro da célula ou do tecido.

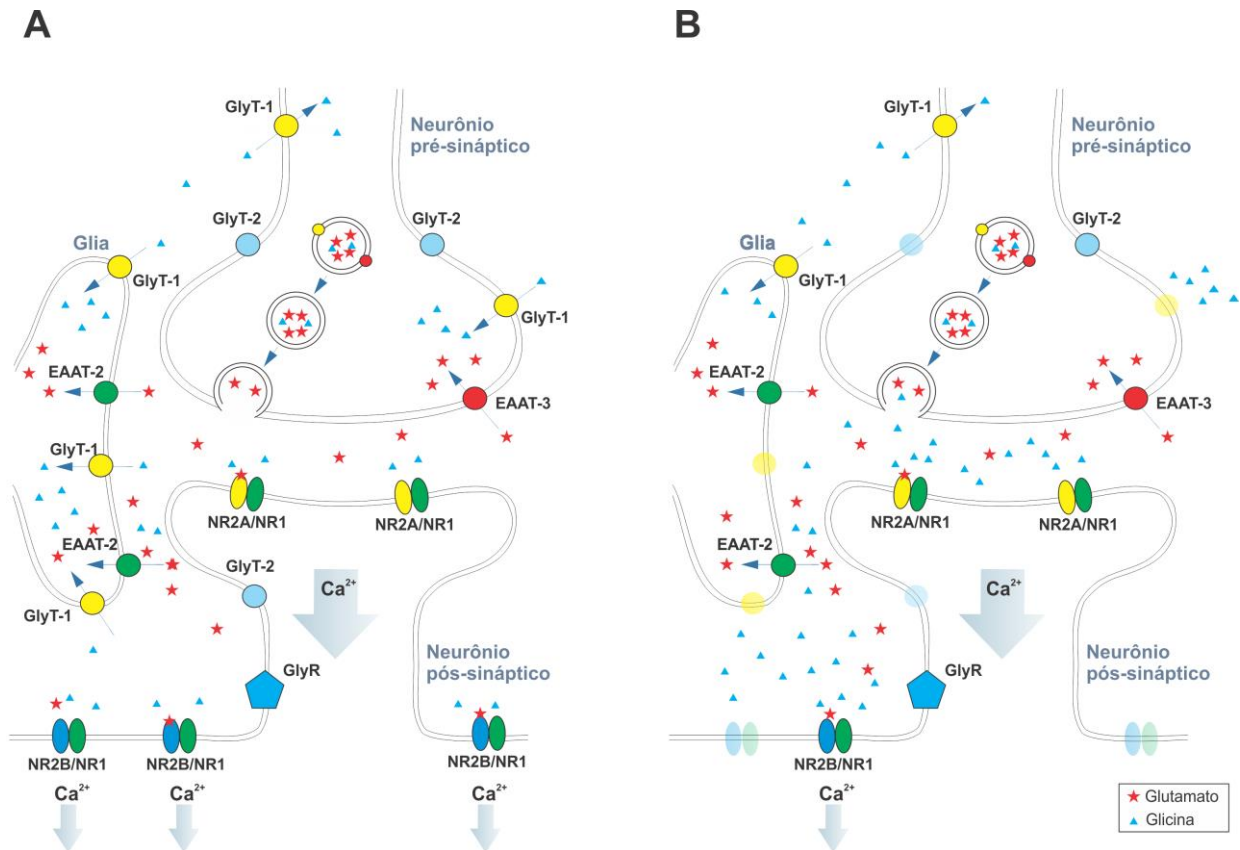


Figura 26. Mecanismo de neuroproteção proposto do pré-condicionamento com inibidores do transportador de glicina do tipo 1. A) Neurotransmissão glutamatérgica hipocampal antes do pré-condicionamento com sarcosina. B) Neurotransmissão glutamatérgica hipocampal após o pré-condicionamento com sarcosina. O pré-condicionamento com sarcosina reduz a expressão de GlyT-1, GlyT-2 e da subunidade NR2B do receptor de NMDA.

Um importante resultado deste trabalho provém da análise da expressão das subunidades NR2 (NR2A e NR2B) dos receptores de glutamato no hipocampo. A subunidade NR2A não apresentou alteração na expressão após o tratamento com sarcosina, porém observamos uma redução na expressão da subunidade NR2B. No campo da excitotoxicidade, já foi demonstrado que a ativação de receptores de NMDA contendo NR2B, em sítios sinápticos ou extra-sinápticos, apresenta efeito excitotóxico, enquanto a ativação de receptores de NMDA contendo NR2A, em sítios sinápticos ou extra-sinápticos, promove a sobrevivência neuronal, mediando portanto, um efeito neuroprotetor

(Liu, Sheng e Qin, 2009), (Martel *et al.*, 2012), (Choo *et al.*, 2012). A subunidade NR2B tem grande afinidade pelo conjunto de proteínas de ancoragem formados por PSD-95 e nNOS, estando assim mais intimamente ligada com a sinalização de NO (Martel *et al.*, 2012). Quando é gerado um estímulo excitotóxico, a subunidade NR2B promove um grande influxo de Ca^{2+} , levando ao aumento exagerado de produção de NO por nNOS. Além disso, a estimulação do receptor de NMDA com a subunidade NR2B desencadeia o acúmulo de Ca^{2+} na mitocôndria, o que está fortemente associado com edema mitocondrial e morte neuronal durante a excitotoxicidade (Choo *et al.*, 2012). Com base nestes trabalhos, podemos inferir que a redução da expressão da subunidade NR2B explica parte do mecanismo de tolerância gerado pelo pré-condicionamento com sarcosina.

Outro fato interessante é que a ativação dos sítios de glicina e glutamato nos NMDAR são fatores fundamentais para a endocitose destes receptores (Nong *et al.*, 2003). O pré-condicionamento com sarcosina causa uma saturação de glicina na fenda sináptica e aumenta a ativação de NMDAR (Bergeron *et al.*, 1998), (Martina *et al.*, 2004), (Zhang, Lyons-Warren e Thio, 2009). Uma vez que os receptores NR1/NR2B apresentam uma afinidade de aproximadamente dez vezes mais elevada para a glicina do que os receptores NR1/NR2A (Laurie e Seeburg, 1994), (Priestley *et al.*, 1995), é razoável esperar que receptores que contenham a subunidade NR2B sejam mais fortemente afetados pelo bloqueio de GlyT-1. Além disso, outras evidências sugerem que receptores NR1/NR2B sofrem endocitose mais rapidamente do que receptores NR1/NR2A (Lavezzari *et al.*, 2004). A co-expressão de NR2 com a proteína PSD-95 inibe a endocitose de NMDAR, sendo os receptores NR1/NR2A mais fortemente associados a PSD-95 (Lavezzari *et al.*, 2004), (Martel *et al.*, 2012). Com base nestes trabalhos da literatura, deduzimos que parte do mecanismo de ação do pré-condicionamento com sarcosina esteja relacionado à endocitose dos receptores de NR1/NR2B, porém mais experimentos são necessários para esclarecer este ponto.

A relação entre o pré-condicionamento com sarcosina e a subunidade NR2B de NMDAR também é sustentada por experimentos com animais knockout para GlyT-1 (camundongos GLYT-1^{+/-}). Camundongos GLYT-1^{+/-} apresentam níveis de glicina saturados nas fendas sinápticas (Tsai, Ralph-Williams *et al.*, 2004), o que gera uma cinética de desativação mais rápida das correntes de Ca^{2+} de NMDAR em células piramidais da região CA1 do hipocampo (Martina *et al.*, 2005); (Imamura *et al.*, 2008). Estas alterações em NMDAR de células da região CA1 de camundongos GLYT1^{+/-} também foram associadas com o aumento de correntes NMDAR/NR2B e redução em sua sensibilidade, que foi causada por um "deslocamento" destes receptores dos terminais sinápticos para os extra-sinápticos (Martina *et al.*, 2005), (Imamura *et al.*, 2008). No entanto, o nível saturado de glicina na fenda sináptica de camundongos GlyT-1^{+/-} não reduz a expressão da proteína NR2B (Imamura *et al.*, 2008), diferente do efeito observado em nossa abordagem farmacológica.

7.2. Tolerância à excitotoxicidade no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NFPS

A observação dos efeitos neuroprotetores induzidos pelo pré-condicionamento com sarcosina levantou duas questões importantes: Primeiro, o efeito observado seria intrínseco à molécula sarcosina, uma vez que este fármaco apresenta outros alvos farmacológicos ou uma característica do bloqueio dos transportadores de glicina do tipo 1? Segundo, a tolerância induzida pelo pré-condicionamento com inibidores de GlyT-1 funcionaria contra outro tipo de dano neuronal?

Para responder estas perguntas, nós elegemos o fármaco NFPS para pré-condicionar o hipocampo de camundongos e avaliar o efeito neuroprotetor nestes tecidos. O fármaco NFPS é um potente bloqueador de GlyT-1, que apresenta 100 vezes mais afinidade aos transportador do que a sarcosina, se ligando em uma região diferente da proteína (Mallorga *et al.*, 2003), (Harsing Jr *et al.*, 2003). O NFPS bloqueia o transporte de glicina de maneira tempo e concentração-dependente e promove uma inibição persistente destas proteínas (Aubrey e Vandenberg, 2001), (Harsing Jr *et al.*, 2003). Foi demonstrado que o NFPS apresenta efeitos benéficos em modelos de esquizofrenia, epilepsia e dor crônica por aumentar a biodisponibilidade de glicina na fenda sináptica e gerando uma potencialização da atividade de NMDAR (Harsing Jr *et al.*, 2003), (Hashimoto *et al.*, 2008), (Kalinichev *et al.*, 2010).

Neste trabalho, o pré-condicionamento com NFPS apresentou um intenso efeito contra a morte neuronal causada pela administração intrahipocampal de NMDA em camundongos. Observamos que a dose mais baixa de NFPS (1,25 mg/Kg) causou uma redução em 60% no número de neurônios mortos em decorrência da administração intrahipocampal de NMDA na região de CA1 do hipocampo. Um contraponto importante para o achado de neuroproteção vem da administração crônica de antagonistas de NMDA. Em roedores, a administração de fenciclidina e MK-801, tem sido associada com o aumento da susceptibilidade a excitotoxicidade, morte celular, apoptose e um aumento na expressão do receptor de NMDA (subunidade NR1) (Wang *et al.*, 1999), (Wang *et al.*, 2000), (Rujescu *et al.*, 2006). Estes dados são coerentes com aqueles encontrados em ratos pré-condicionados com sarcosina na isquemia cerebral (Pinto *et al.*, 2012), cujo efeito neuroprotetor foi observado em modelos *ex vivo* e *in vivo*. Nossos resultados demonstraram que o bloqueio dos inibidores de glicina é suficiente para pré-condicionar o tecido contra um insulto puramente excitotóxico. Estes resultados confirmam a hipótese do efeito neuroprotetor dos inibidores de GlyT-1, mas levantam uma nova questão: o mecanismo de neuroproteção do NFPS é o mesmo da sarcosina?

Para responder esta questão, inicialmente, realizamos a análise do conteúdo dos principais neurotransmissores envolvidos com o mecanismo de ação do NFPS: glicina e glutamato. Vinte e quatro horas após o tratamento com NFPS, a menor dose (1,25 mg/kg) não alterou os níveis de glicina e glutamato. Porém, os animais tratados com as maiores doses (2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg) apresentaram níveis de glutamato e glicina aumentados no hipocampo quando comparados aos controles. Este resultado é bem diferente do encontrado em animais pré-condicionados com sarcosina, uma vez que nestes animais há uma redução dos níveis de glicina e a manutenção dos níveis de glutamato no hipocampo após 24 horas do pré-condicionamento, esta diferença pode estar relacionada com características da molécula de sarcosina (Hashimoto *et al.*, 2008), (Yang *et al.*, 2012). Novamente, o trabalho de Hashimoto *et al.*, 2008 pode nos ajudar a discutir os resultados aqui obtidos. O autor demonstrou que a administração crônica com fenciclidina, um antagonista de NMDAR, causou redução dos níveis de glicina no hipocampo de camundongos (Hashimoto *et al.*, 2008), efeito oposto ao encontrado com o NFPS que gera estímulo de NMDAR. Nossos resultados com o tratamento com NFPS sugerem que a alteração dos níveis de neurotransmissores no hipocampo pode estar relacionada com alterações na expressão ou função dos transportadores.

Nós avaliamos a expressão dos transportadores de glicina e glutamato no hipocampo de animais tratados com NFPS. Na dose mais alta de NFPS (5,0 mg/kg) foi observada uma redução na expressão dos transportadores de glicina GlyT-1. Esta redução também foi observada em animais tratados com sarcosina. A redução da expressão de GlyT-1 vista no pré-condicionamento com NFPS e com sarcosina, bem como o aumento na expressão destes transportadores em animais tratados com fenciclidina, um antagonista de NMDAR (Hashimoto *et al.*, 2008), sugere que a regulação de GlyT-1 esteja intimamente ligada à ativação dos receptores de NMDA, porém mais estudos são necessários para desvendar este mecanismo.

Observamos também um aumento na expressão dos transportadores de glicina GlyT-2 em animais tratados com NFPS. Os mecanismos de expressão, regulação e internalização dos transportadores de glicina ainda não foram totalmente elucidados, porém o bloqueio de GlyT-1 pelo NFPS pode estar causando a troca de GlyT-1 por GlyT-2, por algum mecanismo de compensação. Jiménez *et al.* (2011) demonstraram um efeito antagônico na modulação dos transportadores de glicina em culturas primárias de medula (Jiménez *et al.*, 2011). O estímulo de receptores purinérgicos (PY2R) levou à inibição de GlyT-2 e estimulação de GlyT-1 através das mesmas vias de transdução de sinal, que incluem a ativação de PLC, a produção de 1,4,5-trifosfato de inositol, aumento de Ca^{2+} intracelular, mobilização da PKC, formação de NO, a produção de GMPc e ativação de PKG (Jiménez *et al.*, 2011). GlyT-2 apresenta uma maior capacidade de transporte quando comparado ao GlyT-1, provavelmente devido à característica de não operar no modo

reverso como GlyT-1, o que lhe dá uma vantagem na manutenção de altas concentrações citosólicas de glicina (Aubrey *et al.*, 2007), (Raiteri *et al.*, 2008). Estas diferenças na função dos dois transportadores de glicina podem explicar o aumento da captação de glicina radioativa bem como o aumento dos níveis de glicina hipocámpais observados em animais tratados com NFPS.

Também observamos um aumento na expressão dos transportadores de glutamato EAAT-1, EAAT-2 e EAAT-3 na dose mais alta de NFPS (5,0 mg/kg). Este dado é coerente com o aumento de captação de glutamato radioativo em fatias de hipocampo de animais pré-condicionados com NFPS e também com o conteúdo de aminoácido do hipocampo destes animais. Na última década, substâncias que geram o aumento da expressão de transportadores de glutamato têm sido fortemente associadas à neuroproteção (Lipski *et al.*, 2007), (Chu *et al.*, 2007), (Liang *et al.*, 2008), (Qian *et al.*, 2011). A neuroproteção induzida pela ceftriaxona foi confirmada *in vitro* e *in vivo* em modelos de isquemia cerebral após cinco dias de tratamento em ratos, sendo o principal mecanismo descrito o aumento da expressão de transportadores de glutamato EAAT-2 em astrócitos, e, por conseguinte, o aumento da captação de glutamato durante o processo isquêmico (Lipski *et al.*, 2007), (Chu *et al.*, 2007). O pré-condicionamento com ceftriaxona está fortemente associado aos astrócitos e à ativação da via de NF- κ B. O ácido maslínico também causa aumento da expressão de transportadores de glutamato nos astrócitos (EAAT-1 e EAAT-2) e gera neuroproteção em co-cultura de neurônios e astrócitos (Qian *et al.*, 2011). Estudos que utilizaram o pré-condicionamento isquêmico também observaram um aumento de EAAT-1, EAAT-2 e EAAT-3, sendo a expressão de EAAT-3 regulada pela via de TNF- α . Apesar de contribuir para neuroproteção, o aumento dos transportadores de glutamato não parece ser o mecanismo mais importante para o pré-condicionamento com NFPS, uma vez que na dose mais baixa (1,25 mg/kg de NFPS) é observada neuroproteção sem alteração na expressão de EAATs.

Por fim, avaliamos a expressão das diferentes subunidades de NMDAR no hipocampo de animais tratados com NFPS. Como observado em animais tratados com sarcosina, os animais pré-condicionados com NFPS não apresentaram alteração significativa da expressão das subunidades NR1 e NR2A, porém apresentou uma forte redução da subunidade NR2B. Quando analisados em conjunto, podemos notar que na dose de 1,25 mg/kg, o NFPS apresenta um efeito neuroprotetor contra um estímulo excitotóxico com redução da expressão da subunidade NR2B. Animais tratados com as doses 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg de NFPS também apresentaram um efeito neuroprotetor com redução da expressão da subunidade NR2B, porém foram observadas mudanças neuroquímicas mais marcantes nestes grupos. Com base nestes resultados, entendemos que o bloqueio de GlyT-1 pode apresentar efeitos neuroprotetores através da redução de receptores de NMDA contendo a subunidade NR2B, sem ter que gerar alterações neuroquímicas significativas.

8. Conclusão

O pré-condicionamento com inibidores de transportadores de glicina do tipo 1 é capaz de induzir tolerância à isquemia e proteção contra excitotoxicidade no hipocampo de roedores. O principal mecanismo de proteção está associado à redução da expressão da subunidade NR2B do receptor de NMDA. Assim, a redução da expressão desta subunidade causa um decréscimo da cascata excitotóxica no hipocampo de animais pré-condicionados, gerando uma redução na liberação de glutamato e na produção de NO e EROs durante o dano excitotóxico, e conseqüentemente, uma menor lesão celular e morte dos neurônios hipocampais.

9. Perspectivas

A descoberta do efeito neuroprotetor dos inibidores dos transportadores de glicina do tipo 1 inaugura uma nova linha de pesquisa cujo foco é o entendimento dos mecanismos e dos limites farmacológicos desta classe de substâncias. Inicialmente, prevemos o desenvolvimento de duas abordagens paralelas.

Na primeira abordagem será utilizada a sarcosina como estímulo pré-condicionante e terá como foco o estudo dos efeitos protetores após o insulto isquêmico. Para tal, serão realizados experimentos utilizando o modelo de MCAO e serão estudadas as respostas motoras após o processo de isquemia, bem como a resposta inflamatória envolvida neste processo.

Na segunda abordagem será utilizado o NFPS como estímulo pré-condicionante e terá como foco o estudo das vias intracelulares envolvidos no mecanismo de neuroproteção. Para tal, serão realizados experimentos com modelo de cultura organotípica de hipocampo e cultivo primário de neurônios e astrócitos.

10. Referências bibliográficas

1. ARAGÓN, C.; LÓPEZ-CORCUERA, B. Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *European Journal of Pharmacology*, v. 479, n. 1-3, p. 249-262, 2003.
2. ARTHUR, P.G.; LIM S.C.; MELONI B.P.; MUNNS S.E.; CHAN A.; KNUCKEY N.W. The protective effect of hypoxic preconditioning on cortical neuronal cultures is associated with increases in the activity of several antioxidant enzymes. *Brain Research*, v. 1017, n. 1-2, p. 146-154, 2004.
3. AUBREY, K.R.; ROSSI F.M.; RUIVO R.; ALBONI S.; BELLENCHI G.C.; LE GOFF A.; GASNIER B.; SUPPLISSON S. The transporters GlyT2 and VIAAT cooperate to determine the vesicular glycinergic phenotype. *Journal Neuroscience*, v. 27, n. 23, p. 6273-81, 2007.
4. AUBREY, K.R.; VANDENBERG, R.J. N[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl] sarcosine (NFPS) is a selective persistent inhibitor of glycine transport. *British Journal of Pharmacology*, v. 134, n. 7, p. 1429-1436, 2001.
5. BAZZI, M.D.; NELSESTUEN, G.L. Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process. *Biochemistry*, v. 29, n. 33, p. 7624-7630, 1990.
6. BERGERON R.; MEYER T.M.; COYLE J.T.; GREENE R.W. Modulation of N-methyl-d-aspartate receptor function by glycine transport. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 15730-15734, 1998.
7. BLOSS, E.B.; HUNTER, R.G.; GERALD, L. Hippocampal Kainate Receptors. *Vitamins & Hormones*, v. 82, p.167-184, 2010.
8. BOECK, C.R.; BOECK C.R.; GANZELLA M.; LOTTERMANN A.; VENDITE D. NMDA Preconditioning Protects against Seizures and Hippocampal Neurotoxicity Induced by Quinolinic Acid in Mice. *Epilepsia*, v. 45, n. 7, p. 745-750, 2004.
9. BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE MORTALIDADE - SIM. Óbitos p/Ocorrência por Sexo segundo Causa - CID-BR-10. 2011.
10. 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.
11. BROWN, T.M.; BROTCHE, J.M.; FITZJOHN, S.M. Cannabinoids decrease corticostriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake. *Journal Neuroscience*, v. 23, n. 35, p. 11073-11077, 2003.
12. CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n. 14, p. 5475-80, 1975.
13. CHEN, L.; MUHLHAUSER, M.; YANG, C.R. Glycine Transporter-1 Blockade Potentiates NMDA-Mediated Responses in Rat Prefrontal Cortical Neurons In Vitro and In Vivo. *Journal of Neurophysiology*, v. 89, p. 691-703, 2003.

14. CHO S.; PARK E.M.; ZHOU P.; FRYS K.; ROSS M.E.; IADECOLA C. Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 25, n. 4, p. 493-501, 2005.
15. CHOO A.M.; GEDDES-KLEIN D.M.; HOCKENBERRY A.; SCARSELLA D.; MESFIN M.N.; SINGH P.; PATEL T.P.; MEANEY D.F. NR2A and NR2B subunits differentially mediate MAP kinase signaling and mitochondrial morphology following excitotoxic insult. *Neurochemistry International*, v. 60, n. 5, p. 506-516, 2012.
16. CHU K.; LEE S.T.; SINN D.I.; KO S.Y.; KIM E.H.; KIM J.M.; KIM S.J.; PARK D.K.; JUNG K.H.; SONG E.C.; LEE S.K.; KIM M.; ROH J.K. Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation. *Stroke*, v. 38, p. 177-182, 2007.
17. CODACCIONI J.L.; VELLY L.J.; MOUBARIK C.; BRUDER N.J.; PISANO P.S.; GUILLET B.A. Sevoflurane Preconditioning against Focal Cerebral Ischemia: Inhibition of Apoptosis in the Face of Transient Improvement of Neurological Outcome. *Anesthesiology*, v. 110, n. 6, p. 1271-1278, 2009.
18. CONN, P.J.; PIN, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 37, p. 205-37, 1997.
19. CUBELOS, B.; GIMENEZ, C.; ZAFRA, F. Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cerebral Cortex*, v. 15, n. 4, p. 448-59, 2005.
20. DAHL, N. A.; BALFOUR, W. M. Prolonged anoxic survival due to anoxia pre-exposure: brain ATP, lactate, and pyruvate. *American Journal of Physiology*, v. 207, p. 452-456, 1964.
21. DANIELISOVÁ V.; NÉMETHOVÁ M.; GOTTLIEB M.; BURDA J. Changes of Endogenous Antioxidant Enzymes during Ischemic Tolerance Acquisition. *Neurochemical Research*, v. 30, n. 4, p. 559-565, 2005.
22. DANYSZ, W.; PARSONS, C.G. Glycine and N-Methyl-d-Aspartate Receptors: Physiological Significance and Possible Therapeutic Applications. *Pharmacological Reviews*, v. 50, p. 597-664, 1998.
23. DE ARAÚJO HERCULANO B.; VANDRESEN-FILHO S.; MARTINS W.C.; BOECK C.R.; TASCIA C.I. NMDA preconditioning protects against quinolinic acid-induced seizures via PKA, PI3K and MAPK/ERK signaling pathways. *Behavioural Brain Research*, v. 219, n. 1, p. 92-97, 2011.
24. DE JUAN-SANZ, J., DE JUAN-SANZ J, NÚÑEZ E, LÓPEZ-CORCUERA B, ARAGÓN C. Constitutive endocytosis and turnover of the neuronal glycine transporter GlyT2 is dependent on ubiquitination of a C-terminal lysine cluster. *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e58863, 2013.
25. DORNBOS, D., 3RD; DING, Y. Mechanisms of neuronal damage and neuroprotection underlying ischemia/reperfusion injury after physical exercise. *Current Drug Targets*, v. 13, n. 2, p. 247-62, 2012.
26. FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ E.; MARTÍNEZ-VILLARREAL J.; GIMÉNEZ C.; ZAFRA F. Constitutive and Regulated Endocytosis of the Glycine Transporter GLYT1b Is Controlled by

Ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 29, p. 19482-19492, 2009.

27. FULLER S.; MÜNCH G.; STEELE M. Activated astrocytes: a therapeutic target in Alzheimer's disease? *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 9, p. 1585-1594, 2009.
28. FURUICHI T.; LIU W.; SHI H.; MIYAKE M.; LIU K.J. Generation of hydrogen peroxide during brief oxygen-glucose deprivation induces preconditioning neuronal protection in primary cultured neurons. *Journal of Neuroscience Research*, v. 79, n. 6, p. 816-824, 2005.
29. GEERLINGS A.; NÚÑEZ E.; RODENSTEIN L.; LÓPEZ-CORCUERA B.; ARAGÓN C.. Glycine transporter isoforms show differential subcellular localization in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 82, n. 1, p. 58-65, 2002.
30. GIDDAY, J. M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 7, n. 6, p. 437-448, 2006.
31. HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. 249: 7130-7139 p. 1974.
32. HARADA K.; NAKATO K.; YARIMIZU J.; YAMAZAKI M.; MORITA M.; TAKAHASHI S.; AOTA M.; SAITA K.; DOIHARA H.; SATO Y.; YAMAJI T.; NI K.; MATSUOKA N. A novel glycine transporter-1 (GlyT1) inhibitor, ASP2535 (4-[3-isopropyl-5-(6-phenyl-3-pyridyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]-2,1,3-benzoxadiazole), improves cognition in animal models of cognitive impairment in schizophrenia and Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, v. 685, n. 1-3, p. 59-69, 2012.
33. HARSING L.G. JR; GACSALYI I.; SZABO G.; SCHMIDT E.; SZIRAY N.; SEBBAN C.; TESOLIN-DECROS B.; MATYUS P.; EGYED A.; SPEDDING M.; LEVAY G. The glycine transporter-1 inhibitors NFPS and Org 24461: a pharmacological study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 74, n. 4, p. 811-825, 2003.
34. HARVEY, R.J.; YEE, B.K. Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 12, n. 11, p. 866-885, 2013.
35. HASHIMOTO K.; FUJITA Y.; ISHIMA T.; CHAKI S.; IYO M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of the glycine transporter-1 inhibitor NFPS and d-serine. *European Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 6, p. 414-421, 2008.
36. HEWETT, S. J.; SILAKOVA, J. M.; HEWETT, J. A. Oral Treatment with Rofecoxib Reduces Hippocampal Excitotoxic Neurodegeneration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 319, n. 3, p. 1219-1224, 2006.
37. HOFFMANN M.; CASES L.B.; HOFFMANN B.; CHEN R. The impact of stroke on emotional intelligence. *BMC Neurology*, v. 10 p. 103, 2010.
38. Lane H.Y.; Liu Y.C.; Huang C.L.; Chang Y.C.; Liau C.H.; Perng C.H.; Tsai G.E. Sarcosine (N-Methylglycine) Treatment for Acute Schizophrenia: A Randomized, Double-Blind Study. *Biological psychiatry*, v. 63, n. 1, p. 9-12, 2008.
39. Imamura Y.; Ma C.L.; Pabba M.; Bergeron R. Sustained saturating level of glycine induces

changes in NR2B-containing-NMDA receptor localization in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, v. 105, n. 6, p. 2454-2465, 2008.

40. JIANG, J.; AMARA, S.G. New views of glutamate transporter structure and function: Advances and challenges. *Neuropharmacology*, v.60, n.1, p. 172-181, 2011.
41. JIMÉNEZ E.; ZAFRA F.; PÉREZ-SEN R.; DELICADO E.G.; MIRAS-PORTUGAL M.T.; ARAGÓN C.; LÓPEZ-CORCUERA B. P2Y Purinergic Regulation of the Glycine Neurotransmitter Transporters. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 10712-10724, 2011.
42. KALINICHEV M.; STARR K.R.; TEAGUE S.; BRADFORD A.M.; PORTER R.A.; HERDON H.J. Glycine transporter 1 (GlyT1) inhibitors exhibit anticonvulsant properties in the rat maximal electroshock threshold (MEST) test. *Brain Research*, v. 1331, n. 0, p. 105-113, 2010.
43. KASISCHKE, K.; LUDOLPH, A. C.; RIEPE, M. W. NMDA-antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. *Neuroscience Letters*, v. 214, n. 2-3, p. 175-8, 1996.
44. KATO, H. et al. MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neuroscience Letters*, v. 139, n. 1, p. 118-121, 1992. ISSN 0304-3940.
45. KENNY, P. J.; MARKOU, A. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 25, n. 5, p. 265-272, 2004.
46. KHOSRAVANI H.; ZHANG Y.; TSUTSUI S.; HAMEED S.; ALTIER C.; HAMID J.; CHEN L.; VILLEMAIRE M.; ALI Z.; JIRIK F.R.; ZAMPONI G.W. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *The Journal of Cell Biology*, v. 181, n. 3, p. 551-565, 2008.
47. Kinney G.G.; Sur C.; Burno M.; Mallorga P.J.; Williams J.B.; Figueroa D.J.; Wittmann M.; Lemaire W.; Conn P.J. The Glycine Transporter Type 1 Inhibitor N-[3-(4'-Fluorophenyl)-3-(4'-Phenylphenoxy)Propyl]Sarcosine Potentiates NMDA Receptor-Mediated Responses In Vivo and Produces an Antipsychotic Profile in Rodent Behavior. *The Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 20, p. 7586-7591, 2003.
48. KODAMA, D.; ONO, H.; TANABE, M. Increased hippocampal glycine uptake and cognitive dysfunction after peripheral nerve injury. *Pain*, v. 152, n. 4, p. 809-817, 2011.
49. LAURIE, D.J.; SEEBURG, P.H. Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, v. 268, n. 3, p. 335-345, 1994.
50. Lavezzari G.; McCallum J.; Dewey C.M.; Roche K.W. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 28, p. 6383-91, 2004.
51. Leite H.R.; Mourão F.A.; Drumond L.E.; Ferreira-Vieira T.H.; Bernardes D.; Silva J.F.; Lemos V.S.; Moraes M.F.; Pereira G.S.; Carvalho-Tavares J.; Massensini A.R. Swim training attenuates oxidative damage and promotes neuroprotection in cerebral cortical slices submitted to oxygen glucose deprivation. *Journal of Neurochemistry*, v. 123, n. 2, p. 317-324, 2012.
52. LEVY, L. M.; WARR, O.; ATTWELL, D. Stoichiometry of the Glial Glutamate Transporter

- GLT-1 Expressed Inducibly in a Chinese Hamster Ovary Cell Line Selected for Low Endogenous Na⁺-Dependent Glutamate Uptake. *Journal of Neuroscience*, v. 18, p. 9620-9628, 1998.
53. LI C.; YAN Z.; YANG J.; CHEN H.; LI H.; JIANG Y.; ZHANG Z. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. *Neurochemistry International*, v. 56, n. 3, p. 495-500, 2010.
54. LIANG J.; TAKEUCHI H.; DOI Y.; KAWANOKUCHI J.; SONOBE Y.; JIN S.; YAWATA I.; LI H.; YASUOKA S.; MIZUNO T.; SUZUMURA A. Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. *Brain Research*, v. 1210, n. 0, p. 11-19, 2008.
55. LIGUZ-LECZYNAR, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta neurobiologiae experimentalis*, v. 67, n. 3, p. 207-18, 2007.
56. LIM, R.; HOANG, P.; BERGER, A.J. Blockade of Glycine Transporter-1 (GLYT-1) Potentiates NMDA Receptor-Mediated Synaptic Transmission in Hypoglossal Motorneurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 92, p. 2530-2537, 2004.
57. LIPSKI J.; WAN C.K.; BAI J.Z.; PI R.; LI D.; DONNELLY D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience*, v. 146, n. 2, p. 617-629, 2007.
58. LIU, X.-Q.; SHENG, R.; QIN, Z.-H. The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 30, n. 8, p. 1071-1080, 2009.
59. LYNCH, J.W. Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiological Reviews*, v. 84, p. 1051-1095, 2004.
60. MADDEN, D.R. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, n. 2, p. 91-101, 2002.
61. MALLORGA P.J.; WILLIAMS J.B.; JACOBSON M.; MARQUES R.; CHAUDHARY A.; CONN P.J.; PETTIBONE D.J.; SUR C. Pharmacology and expression analysis of glycine transporter GlyT1 with [3H]-(N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'phenylphenoxy)propyl])sarcosine. *Neuropharmacology*, v. 45, n. 5, p. 585-593, 2003.
62. MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.
63. Martel M.A.; Ryan T.J.; Bell K.F.; Fowler J.H.; McMahan A.; Al-Mubarak B.; Komiyama N.H.; Horsburgh K.; Kind P.C.; Grant S.G.; Wyllie D.J.; Hardingham G.E. The Subtype of GluN2 C-terminal Domain Determines the Response to Excitotoxic Insults. *Neuron*, v. 74, n. 3, p. 543-556, 2012.
64. MARTINA M.; B-TURCOTTE M.E.; HALMAN S.; TSAI G.; TIBERI M.; COYLE J.T.; BERGERON R. Reduced glycine transporter type 1 expression leads to major changes in glutamatergic neurotransmission of CA1 hippocampal neurons in mice. *The Journal of Physiology*, v. 563, n. 3, p. 777-793, 2005.

65. MARTINA M.; GORFINKEL Y.; HALMAN S.; LOWE J.A.; PERIYALWAR P.; SCHMIDT C.J.; BERGERON R. Glycine transporter type 1 blockade changes NMDA receptor-mediated responses and LTP in hippocampal CA1 pyramidal cells by altering extracellular glycine levels. *The Journal of Physiology*, v. 557, n. 2, p. 489-500, 2004.
66. Mezler M.; Hornberger W.; Mueller R.; Schmidt M.; Amberg W.; Braje W.; Ochse M.; Schoemaker H.; Behl B. Inhibitors of GlyT1 Affect Glycine Transport via Discrete Binding Sites. *Molecular Pharmacology*, v. 74, n. 6, p. 1705-1715, 2008.
67. Miao B.; Yin X.H.; Pei D.S.; Zhang Q.G.; Zhang G.Y. Neuroprotective Effects of Preconditioning Ischemia on Ischemic Brain Injury through Down-regulating Activation of JNK1/2 via N-Methyl-D-aspartate Receptor-mediated Akt1 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 21693-21699, 2005.
68. MISKO T.P.; SCHILLING R.J.; SALVEMINI D.; MOORE W.M.; CURRIE M.G. A Fluorometric Assay for the Measurement of Nitrite in Biological Samples. *Analytical Biochemistry*, v. 214, n. 1, p. 11-16, 1993.
69. MÖHLER H.; BOISON D.; SINGER P.; FELDON J.; PAULY-EVERS M.; YEE B.K. Glycine transporter 1 as a potential therapeutic target for schizophrenia-related symptoms: Evidence from genetically modified mouse models and pharmacological inhibition. *Biochemical Pharmacology*, v. 81, n. 9, p. 1065-1077, 2011.
70. MORI T.; MURAMATSU H.; MATSUI T.; MCKEE A.; ASANO T. Possible role of the superoxide anion in the development of neuronal tolerance following ischaemic preconditioning in rats. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 26, n. 1, p. 31-40, 2000.
71. NAVON H.; BROMBERG Y.; SPERLING O.; SHANI E. Neuroprotection by NMDA Preconditioning Against Glutamate Cytotoxicity is Mediated Through Activation of ERK 1/2, Inactivation of JNK, and by Prevention of Glutamate-Induced CREB Inactivation. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 46, n. 1, p. 100-108, 2012.
72. NEWELL, D. W.; BARTH, A.; MALOUF, A. T. Glycine site NMDA receptor antagonists provide protection against ischemia-induced neuronal damage in hippocampal slice cultures. *Brain Research*, v. 675, n. 1-2, p. 38-44, 1995.
73. NONG Y.; HUANG Y.Q.; JU W.; KALIA L.V.; AHMADIAN G.; WANG Y.T.; SALTER M.W. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature*, v. 422, n. 6929, p. 302-7, 2003.
74. OGITA K.; OKUDA H.; YAMAMOTO Y.; NISHIYAMA N.; YONEDA Y. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neurochemistry*, v. 85, n. 5, p. 1336-1346, 2003.
75. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
76. PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

77. DE PAIVA M.J.; MENEZES H.C.; CHRISTO P.P.; RESENDE R.R.; CARDEAL Z.L. An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 931 p. 97-102, 2013.
78. PAPOUIN T.; LADÉPÊCHE L.; RUEL J.; SACCHI S.; LABASQUE M.; HANINI M.; GROG L.; POLLEGIONI L.; MOTHET J.P.; OLIET S.H. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell*, v. 150, n. 3, p. 633-646, 2012.
79. PEREZ-PINZON, M. A.; DAVE, K. R.; RAVAL, A. P. Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. *Antioxid Redox Signal*, v. 7, n. 9-10, p. 1150-7, 2005.
80. PERRY K.W.; FALCONE J.F.; FELL M.J.; RYDER J.W.; YU H.; LOVE P.L.; KATNER J.; GORDON K.D.; WADE M.R.; MAN T.; NOMIKOS G.G.; PHEBUS L.A.; CAUVIN A.J.; JOHNSON K.W.; JONES C.K.; HOFFMANN B.J.; SANDUSKY G.E.; WALTER M.W.; PORTER W.J.; YANG L.; MERCHANT K.M.; SHANNON H.E.; SVENSSON K.A. Neurochemical and behavioral profiling of the selective GlyT1 inhibitors ALX5407 and LY2365109 indicate a preferential action in caudal vs. cortical brain areas. *Neuropharmacology*, v. 55, n. 5, p. 743-754, 2008.
81. PINHEIRO A.C.; DA SILVA A.J.; PRADO M.A.; CORDEIRO MDO N.; RICHARDSON M.; BATISTA M.C.; DE CASTRO JUNIOR C.J.; MASSENSINI A.R.; GUATIMOSIM C.; ROMANO-SILVA M.A.; KUSHMERICK C.; GOMEZ M.V. Phneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus*, v. 19, n. 11, p. 1123-1129, 2009.
82. PINTO, M. C. X.; PAIVA, M.J.N.; OLIVEIRA-LIMA O.C.; MENEZES, H.C.; CARDEAL Z.L.; GOMEZ, M.V.; RESENDE, R.R.; GOMEZ, R.S. Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography–mass spectrometry method. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2013. No prelo.
83. PINTO M.C.X.; MOURÃO F.A.; BINDA N.S.; LEITE H.R.; GOMEZ M.V.; MASSENSINI A.R.; GOMEZ R.S. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning. *Neurochemistry International*, v. 61, n. 5, p. 713-720, 2012.
84. POPESCU, G. Mechanism-based targeting of NMDA receptor functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, n. 18, p. 2100-2111, 2005.
85. PRIESTLEY T.; LAUGHTON P.; MYERS J.; LE BOURDELLÉS B.; KERBY J.; WHITING P.J. Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Molecular Pharmacology*, v. 48, n. 5, p. 841-848, 1995.
86. PUISIEUX F.; DEPLANQUE D.; BULCKAEN H.; MABOUDOU P.; GELÉ P.; LHERMITTE M.; LEBUFFE G.; BORDET R. 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.
87. PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of Neurology*, v. 11, n. 5, p. 491-8, 1982.

88. QIAN Y.; GUAN T.; TANG X.; HUANG L.; HUANG M.; LI Y.; SUN H.; YU R.; ZHANG F. Astrocytic glutamate transporter-dependent neuroprotection against glutamate toxicity: An in vitro study of maslinic acid. *European Journal of Pharmacology*, v. 651, n. 1–3, p. 59-65, 2011.
89. RAITERI L.; STIGLIANI S.; USAI C.; DIASPRO A.; PALUZZI S.; MILANESE M.; RAITERI M.; BONANNO G. Functional expression of release-regulating glycine transporters GLYT1 on GABAergic neurons and GLYT2 on astrocytes in mouse spinal cord. *Neurochemistry International*, v. 52, n. 1–2, p. 103-112, 2008.
90. RALF, D. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, v. 62, n. 6, p. 649-671, 2000.
91. RAVAL, A.P.; DAVE, K.R.; PEREZ-PINZON, M.A. Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 26, n. 9, p. 1141-7, 2006.
92. RAVAL A.P.; LIN H.W.; DAVE K.R.; DEFAZIO R.A.; DELLA MORTE D.; KIM E.J.; PEREZ-PINZON M.A. Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 15, p. 1545-51, 2008.
93. ROTHSTEIN J.D.; PATEL S.; REGAN M.R.; HAENGGELI C.; HUANG Y.H.; BERGLES D.E.; JIN L.; DYKES HOBERG M.; VIDENSKY S.; CHUNG D.S.; TOAN S.V.; BRUIJN L.I.; SU Z.Z.; GUPTA P.; FISHER P.B. [beta]-Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, v. 433, n. 7021, p. 73-77, 2005.
94. RUJESCU D.; BENDER A.; KECK M.; HARTMANN A.M.; OHL F.; RAEDER H.; GIEGLING I.; GENIUS J.; MCCARLEY R.W.; MÖLLER H.J.; GRUNZE H. A Pharmacological Model for Psychosis Based on N-methyl-D-aspartate Receptor Hypofunction: Molecular, Cellular, Functional and Behavioral Abnormalities. *Biological psychiatry*, v. 59, n. 8, p. 721-729, 2006.
95. SANACORA G.; ZARATE C.A.; KRYSTAL J.H.; MANJI H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 5, p. 426-437, 2008.
96. Schurr A.; Reid K.H.; Tseng M.T.; West C.; Rigor B.M. Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Research*, v. 374, n. 2, p. 244-248, 1986.
97. SHANGARI, N.; O'BRIEN, P. J. Catalase activity assays. *Current Protocols in Toxicology*, v. Chapter 7, p. Unit 7 7 1-15, 2006.
98. SHIMAZAKI, T.; KAKU, A.; CHAKI, S. D-Serine and a glycine transporter-1 inhibitor enhance social memory in rats. *Psychopharmacology*, v. 209, n. 3, p. 263-270, 2010.
99. SILAKOVA, J.M.; HEWETT, J.A.; HWETT, S.J. Naproxen Reduces Excitotoxic Neurodegeneration in Vivo with an Extended Therapeutic Window. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 309, n. 3, p. 1060-1066, 2004.
100. SIMÃO F.; MATTÉ A.; MATTÉ C.; SOARES F.M.; WYSE A.T.; NETTO C.A.; SALBEGO C.G. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na⁺K⁺-ATPase activity

- induced by transient global cerebral ischemia in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 22, n. 10, p. 921-928, 2011.
101. SIMON R.P.; SWAN J.H.; GRIFFITHS T.; MELDRUM B.S. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*, v. 226, n. 4676, p. 850-852, 1984.
 102. SIQUEIRA IR.; CIMAROSTI H.; FOCHESSATTO C.; SALBEGO C.; NETTO C.A. Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. *Brain Research*, v. 1025, n. 1-2, p. 226-230, 2004.
 103. SOCAŁA K.; NIEOCZYM D.; RUNDGELDT C.; WLAŻ P. Effects of sarcosine, a glycine transporter type 1 inhibitor, in two mouse seizure models. *Pharmacological Reports*, v. 62, n. 2, p. 392-7, Mar-Apr 2010.
 104. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DOENÇAS CEREBROVASCULARES. Primeiro consenso brasileiro do tratamento da fase aguda do acidente vascular cerebral. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 59, p. 972-980, 2001.
 105. SORIANO F.X.; PAPADIA S.; HOFMANN F.; HARDINGHAM N.R.; BADING H.; HARDINGHAM G.E. Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 17, p. 4509-4518, 2006.
 106. STOCCA, G.; VICINI, S. Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *Journal Physiology*, v. 507, p. 13-24, 1998.
 107. SUPPLISSON, S.; BERGMAN, C. Control of NMDA Receptor Activation by a Glycine Transporter Co-Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Neuroscience*, v.17 p. 4580-4590, 1997.
 108. SZYDŁOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, v. 47, n. 2, p. 122-129, 2010.
 109. TANABE, M.; NITTA, A.; ONO, H. Neuroprotection via Strychnine-Sensitive Glycine Receptors During Post-ischemic Recovery of Excitatory Synaptic Transmission in the Hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 113, n. 4, p. 378-386, 2010.
 110. TANABE M.; TAKASU K.; YAMAGUCHI S.; KODAMA D.; ONO H. Glycine Transporter Inhibitors as a Potential Therapeutic Strategy for Chronic Pain with Memory Impairment. *Anesthesiology*, v. 108, n. 5, p. 929-937, 2008.
 111. THOMPSON J.W.; DAVE K.R.; SAUL I.; NARAYANAN S.V.; PEREZ-PINZON M.A. Epsilon PKC Increases Brain Mitochondrial SIRT1 Protein Levels via Heat Shock Protein 90 following Ischemic Preconditioning in Rats. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e75753, 2013.
 112. TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, v. 27, n. 3, p. 502-22, Mar 1969. ISSN 0003-2697.
 113. LANE H.Y.; HUANG C.L.; WU P.L.; LIU Y.C.; CHANG Y.C.; LIN P.Y.; CHEN P.W.;

- TSAI G. Glycine transporter I inhibitor, N-Methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological psychiatry*, v. 55, n. 5, p. 452-456, 2004.
114. TSAI G.; RALPH-WILLIAMS R.J.; MARTINA M.; BERGERON R.; BERGER-SWEENEY J.; DUNHAM K.S.; JIANG Z.; CAINE S.B.; COYLE J.T. Gene knockout of glycine transporter 1: Characterization of the behavioral phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 22, p. 8485-8490, 2004.
115. TUROVSKAYA M.V.; TUROVSKY E.A.; ZINCHENKO V.P.; LEVIN S.G.; SHAMSUTDINOVA A.A.; GODUKHIN O.V. Repeated brief episodes of hypoxia modulate the calcium responses of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, v. 496, n. 1, p. 11-14, 2011.
116. WANG C.; KAUFMANN J.A.; SANCHEZ-ROSS M.G.; JOHNSON K.M. Mechanisms of N-Methyl-d-aspartate-Induced Apoptosis in Phencyclidine-Treated Cultured Forebrain Neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 294, n. 1, p. 287-295, 2000.
117. WANG C.; SHOWALTER V.M.; HILLMAN G.R.; JOHNSON K.M. Chronic phencyclidine increases NMDA receptor NR1 subunit mRNA in rat forebrain. *Journal of Neuroscience Research*, v. 55, n. 6, p. 762-769, 1999.
118. WASEEM, T.; FEDOROVICH, S. Presynaptic Glycine Receptors Influence Plasma Membrane Potential and Glutamate Release. *Neurochemical Research*, v. 35, n. 8, p. 1188-1195, 2010.
119. WEI H.; FISKUM G.; ROSENTHAL R.E.; PERRY D.C. Global cerebral ischemia and reperfusion alters NMDA receptor binding in canine brain. *Molecular and Chemical Neuropathology*, v. 30, n. 1-2, p. 25-39, 1997.
120. World Health Organization: WHO. *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. 2004.
121. YANG C.P.; WANG H.A.; TSAI T.H.; FAN A.; HSU C.L.; CHEN C.J.; HONG C.J.; CHEN Y.M. Characterization of the neuropsychological phenotype of glycine N-methyltransferase^{-/-} mice and evaluation of its responses to clozapine and sarcosine treatments. *European Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 8, p. 596-606, 2012.
122. YANG Q.; DONG H.; DENG J.; WANG Q.; YE R.; LI X.; HU S.; DONG H.; XIONG L. Sevoflurane Preconditioning Induces Neuroprotection Through Reactive Oxygen Species-Mediated Up-Regulation of Antioxidant Enzymes in Rats. *Anesthesia & Analgesia*, v. 112, n. 4, p. 931-937, 2011.
123. ZAFRA F.; ARAGÓN C.; OLIVARES L.; DANBOLT N.C.; GIMÉNEZ C.; STORM-MATHISEN J. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *Journal of Neuroscience*, v. 15, p. 3952-3969, 1995.
124. ZAFRA F.; GOMEZA J.; OLIVARES L.; ARAGÓN C.; GIMÉNEZ C. Regional Distribution and Developmental Variation of the Glycine Transporters GLYT1 and GLYT2 in the Rat CNS. *European Journal of Neuroscience*, v. 7, n. 6, p. 1342-1352, 1995.
125. ZAMIN, L.L.; Dillenburg-Pilla P.; Argenta-Comiran R.; Horn A.P.; Simão F.; Nassif M.; Gerhardt D.; Frozza R.L.; Salbego C. Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose

deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiology of Disease*, v. 24, n. 1, p. 170-182, 2006.


126. ZERANGUE, N.; KAVANAUGH, M. P. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*, v. 383, n. 6601, p. 634-637, 1996.

127. ZHANG, H.X.; LYONS-WARREN, A.; THIO, L.L. The glycine transport inhibitor sarcosine is an inhibitory glycine receptor agonist. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 5-6, p. 551-555, 2009.

Zheng X.; Zhang L.; Wang A.P.; Bennett M.V.; Zukin R.S. Ca²⁺ Influx Amplifies Protein Kinase C Potentiation of Recombinant NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 22, p. 8676-8686, November 15, 1997 1997.

11. Apêndices

11.1. Protocolo do CETEA 42/2011

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 42/2011**, relativo ao projeto Intitulado "**Avaliação do efeito neuroprotetor de inibidores de transportadores de Glicina do tipo I**", que tem como responsável(is) **Renato Santiago Gomez**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/ 05/2011**.

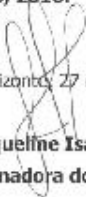
Este certificado expira-se em **25/ 05/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 42/2011**, related to the project entitled "**Evaluation of the neuroprotective effect of glycine transporter type 1 inhibitors**", under the supervisors of **Renato Santiago Gomez**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee In Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 25, 2011**.

This certificate expires in **May 25, 2016**.

Belo Horizonte, 27 de Maio de 2011.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4518
www.ufmg.br/biblioteca/cetea - cetea@portal.ufmg.br

(Mod. Cert. v1.0)

11.2. Protocolo do CETEA 182/2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 182 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação do efeito Neuroprotetor da Inibição do Transportador de Glicina do Tipo I em Camundongos", que tem como responsável Renato Santiago Gomez, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 06/08/2013. Este certificado espira-se em 06/08/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 182 / 2013, related to the Project entitled "Evaluation of neuroprotective effect of glycine transporter type I inhibitors in Mice", under the supervision of Renato Santiago Gomez, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 06/08/2013. This certificate expires in 06/08/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 06/08/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

11.3. Publicações

11.3.1. Artigos publicados ou aceitos para publicação

PINTO, M.C.X.; MOURÃO, F.A.G.; BINDA, N.S.; LEITE, H.R.; GOMEZ, M.V.; MASSENSINI, A.R.; GOMEZ, R.S. PHARMACOLOGICAL induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning. *Neurochemistry International*, v. 61, p. 713-720, 2012.

PINTO, M.C.X.; PAIVA, M.J.N.; OLIVEIRA-LIMA, O.C.; MENEZES, H.C.; CARDEAL, Z.L.; GOMEZ, M.V.; RESENDE, R.R.; GOMEZ, R.S. Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography-mass spectrometry method. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2013.

11.3.2. Artigos submetidos ou em preparação

PINTO M.C.X.; SIMÃO F.; COSTA F.L.P.; ROSA D.V.; PAIVA M.J.N.; RESENDE R.R.; ROMANO-SILVA M.A.; GOMEZ M.V.; GOMEZ R.S. Pharmacological induction of ischemic tolerance against global cerebral ischemia by sarcosine preconditioning. Submetido (*Neuropharmacology*).

PINTO M.C.X.; LIMA I.V.A.; COSTA F.L.P.; ROSA D.V.; PAIVA M.J.N.; RESENDE R.R.; ROMANO-SILVA M.A.; GOMEZ M.V.; OLIVEIRA A.C.P.; GOMEZ R.S. Glycine transporters type 1 inhibitor promotes brain preconditioning against excitotoxic injury. Em preparação.

11.3.3. Resumos publicados em anais de congressos

PINTO, M. C. X. ; Rosa, D. V. F. ; Paiva, M. J. N. ; Resende, R. R. ; Romano-Silva, M. A. ; Gomez, M.V. ; Gomez, R.S. . Sarcosine preconditioning induces ischemic tolerance in rat hippocampus by glycinergic and glutamatergic neuromodulation. In: The 24th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and the American Society for Neurochemistry., 2013, Cancun, Mexico. *Journal of Neurochemistry*, 2013. v. 125. p. 274-274.

PINTO, M. C. X.; Rosa, D. V. F. ; Paiva, M. J. N.; Resende, R. R.; Romano-Silva, M. A.; Gomez, M.V.; Gomez, R.S. Neuroprotective effect of Sarcosine Preconditioning. In: XXXVII Reunião Anual da SBNEC - VII Simpósio Internacional de Neurociências da UFMG, 2013, Belo Horizonte.

XXXVII Reunião Anual da SBNEC - VII Simpósio Internacional de Neurociências da UFMG, 2013.

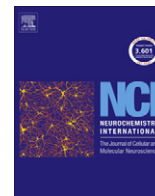
Mendes Junior, C.A.; **PINTO, M. C. X.**; Gomez, R.S. Avaliação do efeito mnemônico de inibidores do transportador de glicina do tipo 1 (GlyT-1) em camundongos. XXII Semana de Iniciação científica da UFMG. 2013.

Mendes Junior, C. A.; **PINTO, M. C. X.**; Moreira, F. A.; Massensini, A.R.; Gomez, R.S. Efeito Ansiogênico do Tratamento Crônico com Inibidores dos Transportadores de Glicina do Tipo 1. XXI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2012, Belo Horizonte. XXI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2012.

PINTO, M.C.X.; Mourão, F.A.G.; Binda, N.S.; Leite, H.R.; Gomez, M.V.; Massensini, A.R.; Gomez, R.S. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning. In: Neuroscience 2012 - Society for Neuroscience, 2012, New Orleans. Neuroscience 2012 - Society for Neuroscience, 2012.

12. Anexos

12.1. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning



Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning

Mauro Cunha Xavier Pinto^{a,*}, Flávio Afonso Gonçalves Mourão^b, Nancy Scardua Binda^a, Hércules Ribeiro Leite^b, Marcus Vinícius Gomez^{a,c}, Andre Ricardo Massensini^b, Renato Santiago Gomez^{d,*}

^a Laboratório de Neurociências, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena 190, 30130-100 Belo Horizonte-MG, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil

^c Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, R. Domingos Vieira, 590, Belo Horizonte-MG, Brazil

^d Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte-MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2012

Received in revised form 4 June 2012

Accepted 21 June 2012

Available online 28 June 2012

Keywords:

Brain preconditioning

Neuroprotection

Glycine transporter type 1

Ischemia

Glutamate neurotransmission

ABSTRACT

Brain ischemic tolerance is a protective mechanism induced by a preconditioning stimulus, which prepare the tissue against harmful insults. Preconditioning with *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) agonists induces brain tolerance and protects it against glutamate excitotoxicity. Recently, the glycine transporters type 1 (GlyT-1) have been shown to potentiate glutamate neurotransmission through NMDA receptors suggesting an alternative strategy to protect against glutamate excitotoxicity. Here, we evaluated the preconditioning effect of sarcosine pre-treatment, a GlyT-1 inhibitor, in rat hippocampal slices exposed to ischemic insult. Sarcosine (300 mg/kg per day, i.p.) was administered during seven consecutive days before induction of ischemia in hippocampus by oxygen/glucose deprivation (OGD). To access the damage caused by an ischemic insult, we evaluated cells viability, glutamate release, nitric oxide (NO) production, lactate dehydrogenase (LDH) levels, production of reactive oxygen species (ROS), and antioxidant enzymes as well as the impact of oxidative stress in the tissue. We observed that sarcosine reduced cell death in hippocampus submitted to OGD, which was confirmed by reduction on LDH levels in the supernatant. Cell death, glutamate release, LDH levels and NO production were reduced in sarcosine hippocampal slices submitted to OGD when compared to OGD controls (without sarcosine). ROS production was reduced in sarcosine hippocampal slices exposed to OGD, although no changes were found in antioxidant enzymes activities. This study demonstrates that preconditioning with sarcosine induces ischemic tolerance in rat hippocampal slices submitted to OGD.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ischemic tolerance is referred to brain protection induced by its pre-exposing to several stimuli that reduces neuronal vulnerability to a subsequent ischemic insult (Gidday, 2006). Initial evidences of

cerebral preconditioning were based on the observation that brief periods of anoxia were capable to increase the survival time of animals exposed to a prolonged period of anoxia (Dahl and Balfour, 1964; Schurr et al., 1986), indicating that ischemic tolerance is a phenomenon that occurs in order to protect the neural system (Gidday, 2006).

Neurons produce reactive oxygen species (ROS) by oxidative metabolism during excitotoxic damage and hypoxia (Liu et al., 2009; Perez-Pinzon et al., 2005). However, there are strong evidences that brain preconditioning involves the generation of ROS (Puisieux et al., 2004; Mori et al., 2000). Superoxide anion (O_2^-) is a product of a large number of reactions involving some enzymes like NADPH oxidase, monoxygenases and NADH dehydrogenase. O_2^- is dangerous to cell and is rapidly scavenged by superoxide dismutase, which converts two molecules of O_2^- into a molecule of hydrogen peroxide (H_2O_2) and one of oxygen (O_2) (Puisieux et al., 2004). In turn, cellular levels of H_2O_2 are controlled by catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), which convert two molecules of H_2O_2 into a molecule of H_2O and one of O_2 . During the excitotoxic process induced by glutamate, there is an increase on O_2^- and H_2O_2 production, which contributes to ischemic brain

Abbreviations: ACSF, artificial cerebrospinal fluid; CAT, catalase; DAN, 2,3-diaminonaphthalene; DCF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DNPH, 2,4-Dinitrophenylhydrazine; I/R, ischemia/reperfusion; LDH, lactate dehydrogenase; GlyT-1, glycine transporters type 1; GPX, glutathione peroxidase; GST, glutathione S-transferase; GR, glutathione reductase; MCAO, middle cerebral artery occlusion; MDA, malonaldehyde; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NO, nitric Oxide; NOS, oxide nitric synthase; OGD, oxygen/glucose deprivation; ROS, reactive oxygen species; SRG, sarcosine group; SLG, saline group; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

* Corresponding authors. Address: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena 190, Sala 114, Santa Efigênia, 30130-100 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (M.C.X. Pinto).

E-mail addresses: mauroxavier@ufmg.br (M.C.X. Pinto), fagm@ufmg.br (F.A.G. Mourão), herculesfisio@hotmail.com (H.R. Leite), marcusvgomez@gmail.com (M.V. Gomez), massen@icb.ufmg.br (A.R. Massensini), renatogomez2000@yahoo.com.br, mauroxavier@ufmg.br (R.S. Gomez).

injury. In addition, activation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors induces the production of nitric oxide (NO) by neuronal nitric oxide synthase (NOS), which reacts with O₂ to produce reactive nitrogen species such as peroxynitrite that can damage a wide array of molecules in cells. Nevertheless, H₂O₂, O₂ and NO play a role in the development of hypoxic and ischemic tolerance, since the inhibition of NOS or the scavenging of NO and O₂ during the preconditioning period significantly attenuates the process of tolerance (Cho et al., 2005; Furuichi et al., 2005).

Programmed cell survival is a complex mechanism of cerebral plasticity involving protein phosphorylation and post-translational modifications closely related to the excitatory effect of glutamate by the activation of NMDA receptors (Chu et al., 2007; Turovskaya et al., 2011). These receptors are activated by glutamate and its co-agonists (*D*-serine or glycine) promoting influx of Ca²⁺ into the cells. A single dose of NMDA produces brain preconditioning and neuroprotective effects against O₂ and glucose deprivation, neuronal death induced by quinolinic acid and kainate-induced toxicity (Ogita et al., 2003; Boeck et al., 2004; Miao et al., 2005). This neuroprotective effect is characterized by a decrease on necrotic and apoptotic cell death and is achieved by the attenuation of injury-inducing excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, metabolic dysfunction and inflammation (Gidday, 2006).

Over the past years, new compounds that potentiate glutamatergic neurotransmission by increasing the concentration of glycine in the synaptic cleft have been developed (Lim et al., 2004). These compounds are selective inhibitors of glycine transporter type 1 (GlyT-1) that mediate uptake of glycine through the binding and co-transport of Na⁺ and Cl⁻ ions, being the Na⁺ gradient generated and maintained by the plasma membrane Na⁺/K⁺-ATPase (Aragón and López-Corcuera, 2003). GlyT-1 can be found in areas such as diencephalon, retina, olfactory bulb and brain hemispheres, being closely associated with NMDA receptors, where it plays a role on glycine uptake (Cubelos et al., 2005; Zafra et al., 1995a,b). GlyT-1 is expressed in neurons and glial cells and it was demonstrated its distribution on the plasma membrane of PC12 cells line (Geerlings et al., 2002). The uptake of glycine by GlyT-1 is down-regulated by protein kinase C and up-regulated by protein kinase G-I, being closely related to NO formation by neuronal NOS and activation of NMDAR (Vargas-Medrano et al., 2011; Jimenez et al., 2011). Inhibition of GlyT-1 induces a pronounced antipsychotic effect and also enhances social memory in rats, which was attributed to an increase on glutamatergic signaling (Harsing et al., 2003; Shimazaki et al., 2010). Recent studies in humans showed that patients who took daily 2 g of sarcosine, a selective inhibitor of GlyT-1, had a reduction in positive and negative symptoms (Hsien-Yuan et al., 2008; Tsai et al., 2004).

Besides the antipsychotic activity, the effects of inhibitors of GlyT-1 on neuromodulation and neuronal survival remain unclear (Hsien-Yuan et al., 2008). Acute blockade of GlyT-1 did not elicit significant neuroprotection of brief oxygen/glucose deprivation (OGD) in the CA1 region of mouse hippocampal slices, but enhanced the amplitude of the NMDA component of a glutamatergic excitatory postsynaptic current in hippocampal pyramidal neurons (Tanabe et al., 2010; Bergeron et al., 1998). Therefore, the aim of the present study was to evaluate if the repetitive administration of sarcosine in rats promotes a neuroprotective phenotype and induces chronic tolerance to OGD insult through the modulation of glutamatergic neurotransmission.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatment

After approval of the experimental protocol by Ethics Committee for Animal Experimentation (Protocol No. 042/11), adult male

Wistar rats, weighing 150–200 g, were maintained on a 12-h dark-light cycle, at 25 °C controlled room, with free access to water and food.

Sarcosine (methylglycine) was obtained from Sigma–Aldrich (Wien, Austria) and was dissolved in physiological saline. In order to define the dose of sarcosine for the following experiments, different doses of the drug (30, 100 or 300 mg/kg) were administered i.p. once a day during seven days. Control animals received saline injections during the same period.

2.2. OGD insult

All animals were sacrificed by decapitation twenty-four hours after the last administration of sarcosine or saline. The brain were carefully removed and submerged in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing: 127 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 10 mM glucose, bubbled with carbogenic mixture (95% O₂ and 5% CO₂). Hippocampus were dissected on ice and sliced on 400 μm with a Mcllwain Tissue Chopper (Brinkman Instruments, UK). As described by Pinheiro et al. (2009), after dissection, the slices were transferred to individual chambers of a superfusion system (SF-12; Brandel, Gaithersburg, MD, USA) and superfused (37 °C) at a constant rate of 0.5 mL/min with ACSF (95% O₂ and 5% CO₂) during 90 min for recovery from the dissection trauma.

OGD was performed by perfusing the ischemic chambers with ACSF containing glucose 4 mM and bubbled with a hypoxic mixture (95% N₂ and 5% CO₂) during 20 min. Paired control slices were maintained on oxygenated ACSF solution containing glucose 10 mM. After the ischemic period, the slices were reperfused with oxygenated ACSF solution with glucose 10 mM during 4 h. Thereafter, hippocampal slices were processed to experimental evaluation. The supernatant from the ischemic period and reperfusion period was collected to additional analysis.

2.3. Homogenization of hippocampal slices

Hippocampal slices were transferred to 1.5 mL tubes, weighed and homogenized (1:10; w/v) in 50 mM of phosphate buffer saline, containing 140 mM of KCl at 4 °C (pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 1000g for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected in 1.0 mL tubes and was frozen at –70 °C. The protein content was measured according to the Bradford's method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard (1 mg/mL).

2.4. Evaluation of hippocampal cells viability

Hippocampus slices submitted to OGD were stained with 6 μM ethidium homodimer (Molecular Probes, Inc.) in oxygenated ACSF/glucose solution for 30 min and then washed for 15 min in oxygenated ACSF/glucose solution at room temperature and protected from light. The cells were excited by red fluorescence (568 nm) and dead cells were evidenced by nucleic acid bound with ethidium homodimer. Fluorescence images were collected and used to quantify the ischemia-induced by OGD. Images were acquired using a fluorescence microscope Axiovert 200 M using the ApoTome system (Carl Zeiss, Germany) to obtain optical sections of the tissue. The Carl Zeiss Axiovision 4.8 software was used to acquire the images.

To improve the quantitative analysis of the images they were processed using the median filter. In the current approach, nucleus was defined as connected pixels that were above the threshold calculated using the image histogram. Regions in the CA1 area of hippocampus were selected from the threshold images and analyzed using the Image J software to calculate the percentage of threshold area in the image, which reflects the number of dead cells.

Additional evaluation of cell death was performed through analysis of lactate dehydrogenase (LDH) content in the incubation media after the period of ischemia/reperfusion (I/R). LDH activity was measured using a colorimetric method through an assay kit (Labtest, Brazil). The results were normalized by protein content and expressed as a percentage of the ischemia control.

2.5. Evaluation of glutamate release

Supernatant from hippocampal slices on the OGD period was collected and centrifuged (1000g at 4 °C for 5 min). Glutamate release was assayed by following the increase on fluorescence due to NADPH production in the presence of NADP and glutamate dehydrogenase as previously described (Nicholls et al., 1987). The concentration of glutamate in the supernatant was determined using a standard concentration and the results were normalized by the protein content. The data were expressed as percentage of the ischemia control.

2.6. Measurement of free radical content and antioxidant enzyme activities

Nitrite measurements were performed by using 2,3-diaminonaphthalene (DAN), (Sigma–Aldrich, Wien, Austria), a fluorescent method previously described (Misko et al., 1993). Briefly, 15 μ L of 3.2 mM DAN were added to 200 μ L of incubation media, collected immediately after OGD period. After 10 min of incubation at 20 °C and protected from light, the reaction was stopped by adding 15 μ L of 2.8 M NaOH. The formation of fluorescent product was measured using a fluorescent plate reader (Cary Eclipse, Varian, USA) with excitation at 360 nm and emission at 440 nm. The results were normalized by protein content and expressed as a percentage of the ischemia control.

ROS measurements were performed using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Sigma–Aldrich, Wien, Austria), a fluorescent probe (Siqueira et al., 2004). Briefly, 20 μ L of the sample was incubated with 80 μ L of DCF-DA (125 μ M) at 37 °C for 30 min and protected from light. Formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively, in a fluorescent plate reader (Cary Eclipse, Varian, USA). The results were normalized by protein content and expressed as a percentage of the ischemia control.

CAT activity was assayed based on the decomposition of H₂O₂ by the enzyme (Shangari and O'Brien, 2006). Briefly, the reaction was started by the addition of supernatant to 7.5 mM of H₂O₂ prepared in 50 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0) in a final volume of 1 mL. The rate of decomposition of H₂O₂ was measured by spectrophotometry and the optical density was noted in 15 s intervals during 1.5 min, on absorbance at 240 nm (25 °C). The results were normalized by protein content and expressed as a percentage of the ischemia control.

Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated using a spectrophotometric method previously described (Marklund and Marklund, 1974). The hippocampal homogenate was incubated in a solution containing 100 mM potassium phosphate buffer and 50 mM EDTA, pH 7.4. Reaction was initiated by the addition of 2 mM pyrogallol. Oxidation of pyrogallol was measured at 420 nm (UV/visible U-200L Spectrophotometer, Hitachinaka, Japan) for 5 min, at intervals of 30 s. A 50% inhibition was defined as one unit (U) of SOD, and the results were normalized by protein content and expressed as a percentage of the ischemia control.

2.7. Evaluation of glutathione system

Activity of glutathione peroxidase (GPX) was determined according to Paglia and Valentine (1967). Briefly, reaction solution

were prepared in 580 μ L of phosphate buffer (100 mM; pH 7.0) containing EDTA 5 mM, 100 μ L of NADPH 8.4 mM, 10 μ L of glutathione reductase (100 IU/mg protein/mL), 10 μ L of Na₃1.125 M; 100 μ L of reduced glutathione 0.15 M and 100 μ L of the sample. Enzymatic reaction was started by adding 250 μ L of 2.2 mM H₂O₂. Conversion of NADPH to NADP was measured by in a spectrophotometer (Hitachi, model U-2001, Hitachinaka City, Japan) during 4 min. Enzyme unit was determined by the oxidation of 1 mol of NADPH per minute and was calculated based on the absorbance of NADPH at 340 nm. The results were normalized by protein of sample and expressed as a percentage of the ischemia control.

Glutathione reductase (GR) was determined according to Carlberg and Mannervik (1975). Briefly, 100 μ L of sample were added to 900 μ L of 0.10 M potassium phosphate buffer and 0.5 mM EDTA with 67 μ M of NADPH and 133 μ M of oxidized glutathione (pH 7.6). Enzyme unit was determined by the oxidation of 1 mol of NADPH per minute and was calculated based on the molar absorptivity of NADPH at 340 nm. The results were normalized by protein of sample and expressed as a percentage of the ischemia control.

Activity of glutathione S-transferase (GST) was performed according to Habig et al. (1974). Briefly, 50 μ L of sample was added to 850 μ L of phosphate buffer 0.1 M and EDTA 1.0 mM (pH 6.5) with GSH (1.06 mM) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (1.06 mM) (Sigma–Aldrich). The reagents were placed directly into buckets and the readings were made in a spectrophotometer (Hitachi, model U-2001, Hitachinaka City, Japan) at 345 nm.

Glutathione reduced (GSH) content was determined according to Tietze (1969). Briefly, 25 μ L of supernatant was added in 96 wells, containing 165 μ L of phosphate buffer 0.1 M and EDTA 1.0 mM (pH 8.0) and 10 μ L of 100 mM of dinitrobenzoic acid were added. The plate were incubated for 30 min and the absorbance was read after 5 min at 412 nm. The results were normalized by protein of sample and expressed as a percentage of the ischemia control.

2.8. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by measuring the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in homogenates and expressed as malonaldehyde (MDA) content, which was measured at 532 nm (UV/visible U-200L Spectrophotometer, Hitachinaka, Japan), as described by Ohkawa et al. (1979). The results were expressed as percentage of increase on TBARS (nmol of MDA/mg protein) relative to their respective controls.

2.9. Data analysis

Experiments of cell viability were analyzed with one-way ANOVA followed by Bonferroni test. The other experiments were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Results were expressed as mean \pm SEM from at least five independent experiments. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Sarcosine preconditioning induced ischemic tolerance in hippocampal slices submitted to OGD

Hippocampal slices from rats pre-treated with different doses of sarcosine (30, 100 and 300 mg/kg) or saline daily during 7 days were submitted to 20 min of OGD and 4 h of reperfusion (Fig. 1). Sarcosine 30 mg/kg did not promote neuroprotection ($p > 0.05$, One-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). Nevertheless, sarcosine 100 mg/kg had a neuroprotective effect as cell death

reduced to $55.05 \pm 6.26\%$ ($p < 0.05$, One-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). The animals treated with 300 mg/kg of sarcosine showed $38.00 \pm 3.33\%$ of cell death ($p < 0.05$, One-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test), a value close to that found in the negative control ($29.28 \pm 2.47\%$ of cell death).

To confirm the ischemic tolerance induced by sarcosine we evaluated the effect of sarcosine 300 mg/kg on the content of LDH in the supernatant. LDH release from hippocampal slices exposed to OGD was lower in the sarcosine group (SRG) ($106.0 \pm 3.45\%$) in comparison with the saline group (SLG) ($154.3 \pm 11.57\%$) after I/R injury (Fig. 1C; $p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). In addition, LDH release from SRG hippocampal slices exposed to OGD was similar to the SRG without OGD injury ($104.4 \pm 12.09\%$) (Fig. 1C). Taken together, these data indicate that preconditioning with sarcosine produced ischemic tolerance in hippocampal slices exposed to OGD.

3.2. Sarcosine preconditioning reduced the release of excitotoxic signals in hippocampal slices submitted to OGD

To investigate the excitotoxic signals in hippocampal slices submitted to OGD, we evaluated the release of glutamate and NO production in the supernatant after 20 min of ischemic insult. Fig. 2A shows that the content of glutamate in the supernatant of SLG hippocampal slices increased by $206.1 \pm 39.51\%$ after 20 min of OGD ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). In contrast, SRG animals submitted to OGD showed a lower release of glutamate in the supernatant ($112.5 \pm 14.27\%$) when compared to SLG ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). Fig. 2B shows that the SRG animals submitted to OGD presented a decrease in NO production ($54.83 \pm 15.82\%$) when compared to SLG ($171.8 \pm 24.48\%$) after 20 min of ischemia ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). These data suggest that preconditioning with sarcosine reduced main signals of excitotoxicity induced by ischemic insult.

3.3. Sarcosine preconditioning reduced oxidative damage in hippocampal slices submitted to OGD

To access cells damage induced by OGD, we firstly performed the evaluation of the content of ROS in hippocampal slices. Fig. 3A shows that OGD insult increased the levels of ROS in SLG hippocampus ($337.4 \pm 55.33\%$) after I/R injury ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). However, the levels of ROS in SRG hippocampus ($61.12 \pm 15.35\%$) were lower when compared to SLG hippocampus ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test), indicating that sarcosine treatment reduced the production of ROS after I/R process.

In accordance with this data, lipoperoxidation of SLG hippocampus submitted to OGD increased by $144.6 \pm 16.34\%$ after I/R injury (Fig. 3B). Preconditioning with sarcosine reduced lipoperoxidation induced by OGD ($72.92 \pm 4.956\%$) when compared with SLG ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). These data suggests that oxidative damage was reduced by the treatment with sarcosine.

3.4. Effect of sarcosine preconditioning on the activity of antioxidant enzymes in hippocampal slices submitted to OGD

In order to evaluate the involvement of antioxidant enzymes on the reduction of oxidative stress in hippocampal slices from SRG submitted to OGD, we performed the biochemical evaluation of CAT and SOD activity. As shown in Fig. 4A, we observed a reduction on SOD activity in SLG submitted to OGD ($77.97 \pm 11.29\%$) ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). In addition, SOD activity of SRG was similar in control and ischemia groups after I/R injury. Sarcosine also reduced SOD activity of hippocampal slices not exposed to OGD, ($63.19 \pm 6.07\%$). In contrast with SOD, CAT activity increased in SLG submitted to OGD ($473.3 \pm 72.83\%$) when compared with the control group ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). Moreover, as observed in Fig. 4B, SRG presented lower CAT activity

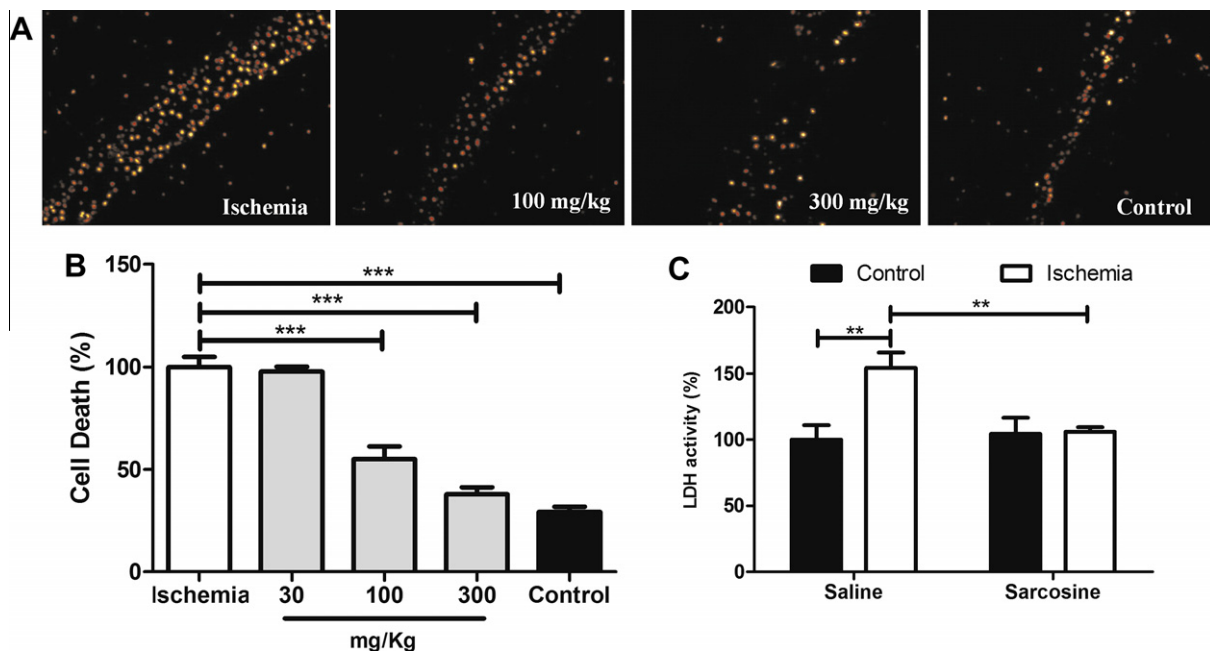


Fig. 1. Preconditioning with sarcosine induced tolerance in hippocampal slices submitted to OGD. (A) Representative hippocampal slices of control and sarcosine groups after I/R process. (B) Cell death assessed by ethidium homodimer stained after I/R process ($***p < 0.001$, One-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). (C) LDH activity in hippocampal slice medium after I/R process ($**p < 0.01$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). The results express the mean \pm SEM of cell death from at least five different animals.

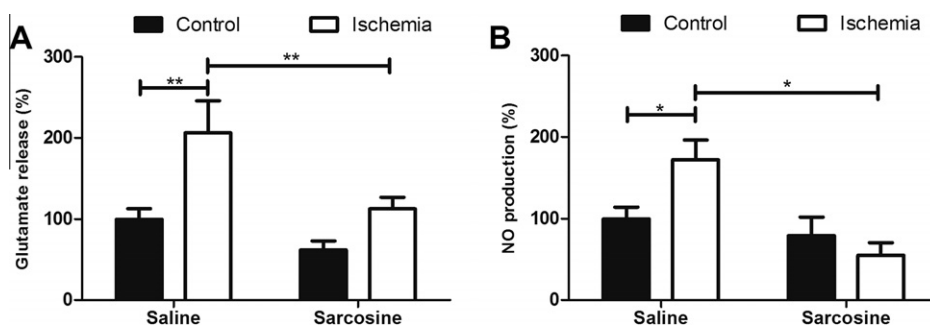


Fig. 2. Preconditioning with sarcosine reduced the release of excitotoxic mediators in hippocampal slices submitted to OGD. (A) Glutamate release from hippocampal slices after 20 min of OGD insult. (B) NO production from hippocampal slices after 20 min of OGD insult. The results express the mean \pm SEM of each group from at least five different animals ($*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test).

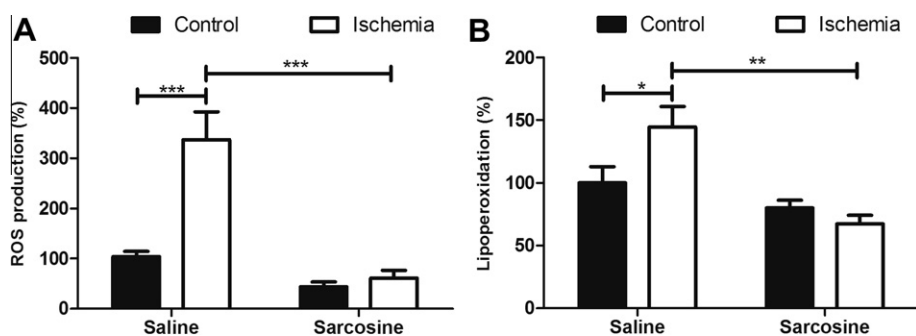


Fig. 3. Preconditioning with sarcosine reduced oxidative stress in hippocampal slices submitted to OGD. (A) ROS production from hippocampal slices after I/R process. (B) Liperoxidation in hippocampal slices after I/R process. The results express the mean \pm SEM of each group from at least five different animals ($*p < 0.05$ and $***p < 0.001$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test).

in hippocampal slices exposed to OGD ($97.32 \pm 30.63\%$) when compared with SLG ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). These data suggest that antioxidant enzymes activities were maintained after I/R process in hippocampus of animals treated with sarcosine.

3.5. Effect of sarcosine preconditioning on glutathione system in hippocampal slices submitted to OGD

As shown in Fig. 5A, there was a significant decrease on total glutathione content in SLG after OGD ($71.75 \pm 5.03\%$) ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test), which was not observed in hippocampal slices of SRG. GPX activity of SLG was also reduced ($72.39 \pm 6.51\%$) after I/R process ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test), which was not observed in SRG (Fig. 5B). On the other hand, GR activity increased in

SLG after OGD ($315.2 \pm 82.0\%$) ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test), an effect that was not observed in SRG exposed to OGD, despite a slight reduction on basal activity when comparing SLG with SRG (Fig. 5C). Similarly, GST activity increased in SLG exposed to OGD ($256.7 \pm 51.10\%$) (Fig. 5D) ($p < 0.05$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test), which was not observed in SRG. We also observed a slight reduction in GST basal activity when comparing SLG with SRG. Taken together, these data indicate that the activity of glutathione system was maintained after I/R process in hippocampus from animals preconditioned with sarcosine.

4. Discussion

The present work demonstrated that pre-treatment with sarcosine can be used as preconditioning stimulus in hippocampal

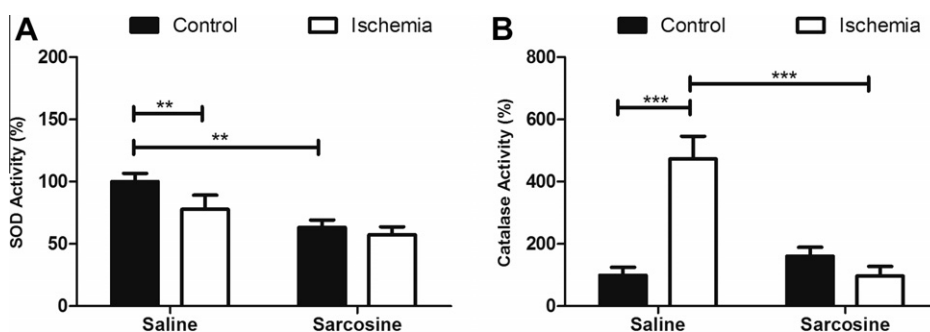


Fig. 4. Preconditioning with sarcosine maintain antioxidant enzymatic activity in hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. (A) SOD activity of hippocampal slices after I/R process. (B) Catalase activity of hippocampal slices after I/R process. The results express the mean \pm SEM of each group from at least five different animals ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test).

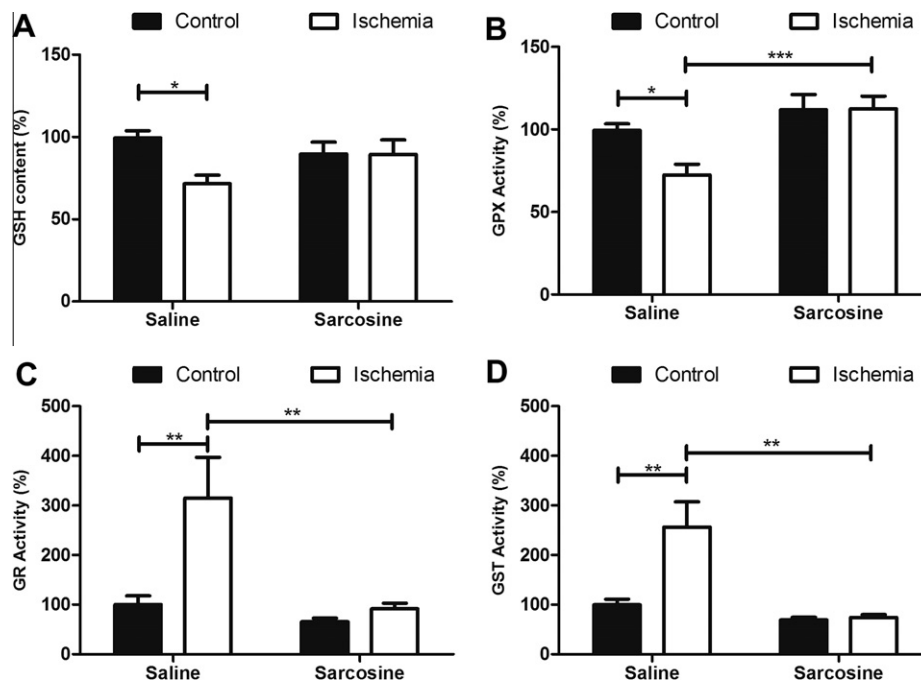


Fig. 5. Preconditioning with sarcosine maintain glutathione system capacity in hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation. (A) Glutathione content of hippocampal slices after I/R process. (B) Glutathione peroxidase activity of hippocampal slices after I/R process. (C) Glutathione reductase activity of hippocampal slices after I/R process. (D) Glutathione-*s*-transferase activity of hippocampal slices after I/R process. The results express the mean \pm SEM of each group from at least five different animals (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test).

slices, which promote an ischemic tolerance against OGD insult. Sarcosine is a competitive inhibitor of GlyT-1 (IC_{50} : 40–150 μ M), a co-agonist of NMDA receptor (IC_{50} : 26 μ M) and a weak agonist of glycine receptors (IC_{50} : 3.0 mM) (Zhang et al., 2009). It is well known that GlyT-1 inhibitors potentiate NMDA receptors response in glutamatergic neurotransmission through an increase of the co-agonist glycine in the synapse cleft (Chen et al., 2003; Lim et al., 2004; Kinney et al., 2003). In addition, the stimulation of pre-synaptic glycine receptors by high concentrations of glycine enhanced the release of glutamate (Waseem and Fedorovich, 2010), which can also activate NMDA receptors. Therefore, the neuroprotection observed with sarcosine is closely related to the modulation of glutamatergic neurotransmission and seems to be related to NMDA receptors.

Indeed, chronic modulation of NMDA receptors is intimately related to tolerance against excitotoxicity. Chronic administration of NMDA antagonist to rodents, as phencyclidine and MK-801, has been associated with an increase on the susceptibility to excitotoxicity, apoptotic cell death and an up-regulation of NMDA receptor (NR1 subunit) (Rujescu et al., 2006; Wang et al., 2000; Wang et al., 1999). On the other hand, NMDA activation with non-convulsant doses induces tolerance to excitotoxicity in several experimental models (Gidday, 2006; Chu et al., 2007; Turovskaya et al., 2011; Ogita et al., 2003; Boeck et al., 2004; Miao et al., 2005). Sarcosine treatment is capable to potentiate NMDA activation and its effect on brain ischemic tolerance seems to be related to an interference on glutamatergic neurotransmission.

In agreement with this idea, we observed a reduction on glutamate release during I/R injury and a trend to reduction of glutamate release under basal conditions in the sarcosine group. Recent studies have shown that some drugs are capable to induce neuroprotection by a similar mechanism. The treatment with resveratrol (30 mg/kg) during 7 days had a neuroprotective effect in a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in rats (Li et al., 2010). This effect was related to a decrease on the release of

excitatory neurotransmitters (glutamate, aspartate and D-serine) during the I/R period and an increase on basal levels of inhibitory neurotransmitters (GABA, glycine and taurine). It was also described the neuroprotective effect of ceftriaxone and beta-lactam antibiotics in *in vitro* OGD model and *in vivo* MCAO model of brain ischemia after 5 days of treatment, being this phenomenon related to an interference on glutamate uptake by the glutamate transporter EAAT2 (Lipski et al., 2007; Chu et al., 2007; Rothstein et al., 2005).

We also observed that sarcosine treatment decreased NO release from hippocampal slices after OGD. It is well known that NMDA receptors present a physical binding to nNOS, which corroborate to NO production during glutamate activation of neurons (Jimenez et al., 2011). Taken together this data indicate that cell death was reduced by a decrease of excitotoxic mediators, indicating that ischemic tolerance achieved by sarcosine is related to the classic preconditioning effect observed with NMDA agonists, which involves the reduction of glutamate release and also the excitotoxic signals during OGD.

We observed a reduction on the production of ROS from hippocampal slices of the animals treated with sarcosine, which is in agreement with the decrease on glutamate and NO signaling. The reduction of ROS production during the ischemic insult is related to the low lipoperoxidation in hippocampal slices of sarcosine treated animals submitted to OGD. On the other hand, the oxidative stress is an important step of the ischemic tolerance induced by a preconditioning stimulus (Obrenovitch, 2008). In fact, the administration of antioxidant compounds can suppress the ischemic preconditioning in MCAO model (Mori et al., 2000). The preconditioning treatment with sarcosine did not change the basal activity of SOD or CAT, as well the activity during the ischemic insult. Some studies using hypoxic condition as a preconditioning agent reported an increase on the expression and activity of SOD enzymes at basal condition (Arthur et al., 2004; Danielisová et al., 2005). In contrast, this effect did not occur in a MCAO model of preconditioning (Puisieux et al., 2004). In this model, CAT activ-

ity increased after 5 min of four-vessel occlusion precondition. Although it does not affect the activity of these enzymes, other antioxidant system may be involved.

The glutathione system is involved in the control of peroxides by brain cells and protection against ROS (Ralf, 2000). Primary cultures of rat cortical neurons subjected to hypoxic preconditioning presents an increase in GPX and GR activities, which is in accordance with the role of an antioxidant mechanism during the preconditioning (Arthur et al., 2004). Nevertheless, ischemic tolerance induced by MCAO in rats did not change the activity and expression of GPX (Puisieux et al., 2004). Our results showed that preconditioning stimulus with sarcosine was able to maintain the activity of glutathione system after the OGD insult with no increase on the antioxidant capacity.

In conclusion, brain ischemic tolerance induced by a preconditioning treatment with sarcosine seems to be related to a reduction on glutamate release during the OGD insult. The decrease on glutamate release reduced the production of NO and ROS and consequently, decreased cell damage that was not associated with an increase on the activity of antioxidant enzymes. Brain ischemic tolerance induced by sarcosine preconditioning might be related to protein expression in membrane or/and with mitochondrial function. Further studies using *in vitro* and *in vivo* approaches are necessary to investigate the preconditioning effect of sarcosine in other brain structures, the functional activity of animals exposed to ischemic insult, as well as, the glutamatergic activity after neuromodulation.

Acknowledgement

This study was supported by Capes 1444/2011, Capes/Decit 2865/2010, Capes PNPD, Fapemig, MCT-INCT Medicina Molecular and CNPq. Gomez M.V., Massensini A.R. and Gomez R.S. are CNPq fellowship recipients.

References

- Aragón, C., López-Corcuera, B., 2003. Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *Eur. J. Pharmacol.* 479 (1–3), 249–262.
- Arthur, P.G., Lim, S.C.C., Meloni, B.P., Munns, S.E., Chan, A., Knuckey, N.W., 2004. The protective effect of hypoxic preconditioning on cortical neuronal cultures is associated with increases in the activity of several antioxidant enzymes. *Brain Res.* 1017 (1–2), 146–154.
- Bergeron, R., Meyer, T.M., Coyle, J.T., Greene, R.W., 1998. Modulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (26), 15730–15734.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 7 (2), 248–254.
- Boeck, C.R., Ganzella, M., Lottermann, A., Vendite, D., 2004. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia* 45 (7), 745–750.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250 (14), 5475–5480.
- Chen, L., Muhlhauser, M., Yang, C.R., 2003. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurophysiol.* 89 (2), 691–703.
- Cho, S., Park, E.-M., Zhou, P., Frys, K., Ross, M.E., Iadecola, C., 2005. Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25 (4), 493–501.
- Chu, K., Lee, S.T., Sinn, D.I., Ko, S.Y., Kim, E.H., Kim, J.M., Kim, S.J., Park, D.K., Jung, K.H., Song, E.C., Lee, S.K., Kim, M., Roh, J.-K., 2007. Pharmacological induction of ischemic tolerance by glutamate transporter-1 (EAAT2) upregulation. *Stroke* 38 (1), 177–182.
- Cubelos, B., Gimenez, C., Zafra, F., 2005. Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb. Cortex.* 15 (4), 448–459.
- Dahl, N.A., Balfour, W.M., 1964. Prolonged anoxic survival due to anoxia pre-exposure: brain ATP, lactate, and pyruvate. *Am. J. Physiol.* 207, 452–456.
- Danielisová, V., Némethová, M., Gottlieb, M., Burda, J., 2005. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem. Res.* 30 (4), 559–565.
- Furuichi, T., Liu, W., Shi, H., Miyake, M., Liu, K.J., 2005. Generation of hydrogen peroxide during brief oxygen-glucose deprivation induces preconditioning neuronal protection in primary cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* 79 (6), 816–824.
- Geerlings, A., Núñez, E., Rodenstein, L., López-Corcuera, B., Aragón, C., 2002. Glycine transporter isoforms show differential subcellular localization in PC12 cells. *J. Neurochem.* 82 (1), 58–65.
- Gidday, J.M., 2006. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (6), 437–448.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249 (22), 7130–7139.
- Harsing Jr, L.G., Gacsalyi, I., Szabo, G., Schmidt, E., Sziray, N., Sebban, C., Tesolin-Decros, B., Matyus, P., Egyed, A., Spedding, M., Levay, G., 2003. The glycine transporter-1 inhibitors NFPS and Org 24461: a pharmacological study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74 (4), 811–825.
- Hsien-Yuan, L., Yi-Ching, L., Chieh-Liang, H., Yue-Cune, C., Chun-Hui, L., Cheng-Hwang, P., Guochuan, E.T., 2008. Sarcosine (*N*-methylglycine) treatment for acute schizophrenia: a randomized, double-blind study. *Biol. Psychiatry* 63 (1), 9–12.
- Jimenez, E., Zafra, F., Pérez-Sen, R., Delicado, E.G., Miras-Portugal, M.T., Aragón, C., López-Corcuera, B., 2011. P2Y purinergic regulation of the glycine neurotransmitter transporters. *J. Biol. Chem.* 286 (12), 10712–10724.
- Kinney, G.G., Sur, C., Burno, M., Mallorga, P.J., Williams, J.B., Figueroa, D.J., Wittmann, M., Lemaire, W., Conn, P.J., 2003. The glycine transporter Type 1 inhibitor N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine potentiates nmda receptor-mediated responses *in vivo* and produces an antipsychotic profile in rodent behavior. *J. Neurosci.* 23 (20), 7586–7591.
- Li, C., Yan, Z., Yang, J., Chen, H., Li, H., Jiang, Y., Zhang, Z., 2010. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. *Neurochem. Int.* 56 (3), 495–500.
- Lim, R., Hoang, P., Berger, A.J., 2004. Blockade of glycine transporter-1 (GLYT-1) potentiates NMDA receptor-mediated synaptic transmission in hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 92 (4), 2530–2537.
- Lipski, J., Wan, C.K., Bai, J.Z., Pi, R., Li, D., Donnelly, D., 2007. Neuroprotective potential of ceftriaxone *in vitro* models of stroke. *Neuroscience* 146 (2), 617–629.
- Liu, X.-q., Sheng, R., Qin, Z.-h., 2009. The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol. Sin.* 30 (8), 1071–1080.
- Nicholls, D.J., Sihra, T.S., Sanchez-Prieto, J., 1987. Calcium-dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* 49, 50–57.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47 (3), 469–474.
- Miao, B., Yin, X.-H., Pei, D.-S., Zhang, Q.-G., Zhang, G.-Y., 2005. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via *N*-methyl-D-aspartate Receptor-mediated Akt1 Activation. *J. Biol. Chem.* 280 (23), 21693–21699.
- Misko, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M., Currie, M.G., 1993. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal. Biochem.* 214 (1), 11–16.
- Mori, T., Muramatsu, H., Matsui, T., McKee, A., Asano, T., 2000. Possible role of the superoxide anion in the development of neuronal tolerance following ischaemic preconditioning in rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26 (1), 31–40.
- Obrenovitch, T.P., 2008. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol. Rev.* 88 (1), 211–247.
- Ogita, K., Okuda, H., Yamamoto, Y., Nishiyama, N., Yoneda, Y., 2003. *In vivo* neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurochem.* 85 (5), 1336–1346.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95 (2), 351–358.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70 (1), 158–169.
- Perez-Pinzon, M.A., Dave, K.R., Raval, A.P., 2005. Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* 7 (9–10), 1150–1157.
- Pinheiro, A.C.N., Silva, A.J., Prado, M.A.M., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Batista, M.C., Castro-Junior, C.J., Massensini, A.R., Guatimosim, C., Romano-Silva, M.A., Kushmerick, C., Gomez, M.V., 2009. Phenoethia spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus* 19 (11), 1123–1129.
- Puisieux, F., Deplanque, D., Bulckaen, H., Maboudou, P., Gelé, P., Lhermitte, M., Lieuffe, G., Bordet, R., 2004. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. *Brain Res.* 1027 (1–2), 30–37.
- Ralf, D., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62 (6), 649–671.
- Rothstein, J.D., Patel, S., Regan, M.R., Haenggli, C., Huang, Y.H., Bergles, D.E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D.S., Toan, S.V., Bruijn, L.L., Su, Z.-z., Gupta, P., Fisher, P.B., 2005. [beta]-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433 (7021), 73–77.
- Rujescu, D., Bender, A., Keck, M., Hartmann, A.M., Ohl, F., Raeder, H., Giegling, I., Genius, J., McCarley, R.W., Möller, H.-J., Grunze, H., 2006. A pharmacological model for psychosis based on *N*-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol. Psychiatry* 59 (8), 721–729.

- Schurr, A., Reid, K.H., Tseng, M.T., West, C., Rigor, B.M., 1986. Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res.* 374 (2), 244–248.
- Shangari, N., O'Brien, P.J., 2006. Catalase activity assays. *Curr. Protoc. Toxicol.* Chapter 7, Unit 7 7 1–15.
- Shimazaki, T., Kaku, A., Chaki, S., 2010. D-Serine and a glycine transporter-1 inhibitor enhance social memory in rats. *Psychopharmacology* 209 (3), 263–270.
- Siqueira, I.R., Cimarosti, H., Fochesatto, C., Salbego, C., Netto, C.A., 2004. Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1025 (1–2), 226–230.
- Tanabe, M., Nitta, A., Ono, H., 2010. Neuroprotection via strychnine-sensitive glycine receptors during post-ischemic recovery of excitatory synaptic transmission in the hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* 113 (4), 378–386.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27 (3), 502–522.
- Tsai, G., Lane, H.-Y., Yang, P., Chong, M.-Y., Lange, N., 2004. Glycine transporter 1 inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 55 (5), 452–456.
- Turovskaya, M.V., Turovsky, E.A., Zinchenko, V.P., Levin, S.G., Shamsutdinova, A.A., Godukhin, O.V., 2011. Repeated brief episodes of hypoxia modulate the calcium responses of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 496 (1), 11–14.
- Vargas-Medrano, J., Castrejon-Tellez, V., Plenge, F., Ramirez, I., Miranda, M., 2011. PKC β -dependent phosphorylation of the glycine transporter 1. *Neurochem. Int.* 59 (8), 1123–1132.
- Wang, C., Showalter, V.M., Hillman, G.R., Johnson, K.M., 1999. Chronic phencyclidine increases NMDA receptor NR1 subunit mRNA in rat forebrain. *J. Neurosci. Res.* 55 (6), 762–769.
- Wang, C., Kaufmann, J.A., Sanchez-Ross, M.G., Johnson, K.M., 2000. Mechanisms of N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in phencyclidine-treated cultured forebrain neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294 (1), 287–295.
- Waseem, T., Fedorovich, S., 2010. Presynaptic glycine receptors influence plasma membrane potential and glutamate release. *Neurochem. Res.* 35 (8), 1188–1195.
- Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N.C., Gimenez, C., Storm-Mathisen, J., 1995a. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15 (5 Pt 2), 3952–3969.
- Zafra, F., Gomez, J., Olivares, L., Aragón, C., Giménez, C., 1995b. Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the Rat CNS. *Eur. J. Neurosci.* 7 (6), 1342–1352.
- Zhang, H.X., Lyons-Warren, A., Thio, L.L., 2009. The glycine transport inhibitor sarcosine is an inhibitory glycine receptor agonist. *Neuropharmacology* 57 (5–6), 551–555.

12.2. Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography–mass spectrometry method



Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography–mass spectrometry method



Mauro Cunha Xavier Pinto^{a,f}, Maria José Nunes de Paiva^b, Onésia Cristina Oliveira-Lima^c, Helvécio Costa Menezes^b, Zenilda de Lourdes Cardeal^b, Marcus Vinícius Gomez^d, Rodrigo Ribeiro Resende^e, Renato Santiago Gomez^{f,*}

^a Laboratório de Neurociências, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena 190, 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, R. Domingos Vieira, 590, Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^f Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena, 190, 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2013

Received in revised form 22 November 2013

Accepted 26 November 2013

Available online 7 December 2013

Keywords:

Rodents

Amino acids

Neurochemistry

Gas chromatography–mass spectrometry

ABSTRACT

The analysis of amino acid levels is crucial for neuroscience studies because of the roles of these molecules as neurotransmitters and their influence on behavior. The present study describes the distribution and levels of 16 amino acids (alanine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glycine, glutamic acid, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, sarcosine, serine, valine, and threonine) in brain tissues (prefrontal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) and the serum. Neurochemical analysis was performed on Wistar rats and C57BL/6 mice using an efficient method for extraction, a fast microwave-assisted derivatization and gas chromatography–mass spectrometry analysis. The amino acid concentration varied across brain regions for 14 of the 16 analyzed molecules, with detection limits ranging from $0.02 \pm 0.005 \mu\text{mol L}^{-1}$ to $7.07 \pm 0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$. In rats, the concentrations of alanine, glycine, methionine, serine and threonine were higher in prefrontal cortex than in other areas, whereas in mice, the concentrations of glutamic acid, leucine and proline were highest in the hippocampus. In conclusion, this study provides a cerebral profile of amino acids in brain regions and the serum of rats and mice.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The analysis of amino acid levels is crucial for the study of neuroscience because amino acids play important roles as neurotransmitters and can influence behavior under physiological conditions. In neuroscience, the amino acids are divided into non-neurotransmitters, which are important for structural and

metabolic functions, and neurotransmitters, which are able to deliver messages across synapses (Shah et al., 2002). Amino acid neurotransmitters provide both excitatory and inhibitory neurotransmission in the central nervous system (CNS). The inhibitory amino acids (IAAs), including alanine, glycine, GABA, and taurine, reduce the activity of post-synaptic neurons. In contrast, the excitatory amino acids (EAAs), including aspartate, cysteine, homocysteine, and glutamate, increase the excitability of post-synaptic neurons (Shah et al., 2002).

Changes in amino acid levels in the CNS are widely associated with psychiatric and neurological disorders. EAAs can damage neurons by excessive stimulation; this phenomenon is called excitotoxicity and is involved in brain ischemia, epilepsy and Alzheimer's disease. Disruptions in glutamate neurotransmission have also been associated with schizophrenia and bipolar disorder. In addition, changes in neurotransmission by IAAs such GABA and glycine are associated with anxiety and some motor disorders (Bowery and Smart, 2006; Rajendra et al., 1997).

Abbreviations: aCSF, artificial cerebrospinal fluid; BSTFA, N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide; CNS, central nervous system; EAA, excitatory amino acids; GC, gas chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; IAA, inhibitory amino acids; LOD, detection limits; LOQ, quantification limits; MS, mass spectrometry; OPA, o-phthalaldehyde; MTBSTFA, N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide; TMCS, trimethylchlorosilane.

* Corresponding author at: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Professor Alfredo Balena, 190 Bairro Santa Efigênia, CEP: 30130-100 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 031 3409 9753.

E-mail address: renatogomez2000@yahoo.com.br (R.S. Gomez).

The amino acid neurotransmitters can be found at concentrations ranging from nanomolar to micromolar in the CNS, requiring high-performance methods for accurate quantification of these molecules. These methods involve two steps. First, it is necessary to separate the neurotransmitters, which can be done by chromatography. Next, the molecules are detected, which depends on their chemical features. Amino acids are small aliphatic molecules and do not possess chemical features that permit direct analysis, as fluorescent emission or UV absorbance, necessitating an additional stage of derivatization (Shah et al., 2002). For analysis of amino acids, *o*-phthalaldehyde (OPA) is the most common derivatization agent, generating derivatives with fluorescent and electroactive features after reaction with primary amines in the presence of thiol groups. The amino acids derivatized with OPA are usually separated using high-performance liquid chromatography (HPLC) and analyzed with fluorescent detectors. However, there is an alternative method, which uses gas chromatography (GC). In this method, the amino acids are converted into more volatile analytes to be separated by GC, which can be monitored using either electron capture or mass spectrometric (MS) detection (Shah et al., 2002). The GC–MS method for detection of amino acids provides greater selectivity and ability to distinguish analytes, and it is more accurate than HPLC for the measurement of amino acids (Shah et al., 2002).

Because amino acids act as neurotransmitters on different cerebral substrates and in several neuropathologies, it is important to have effective methods for evaluating the profiles of these molecules in health and disease conditions. Therefore, this work describes the application of a recently developed GC–MS method (Paiva et al., 2013) in prefrontal cortex, striatum, hippocampus, cerebellum and serum samples from Wistar rats and C57BL/6 mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats (250–300 g) and C57BL/6 mice (25–30 g) of both sexes were used in this study. The animals were housed in plastic cages, maintained on a 12:12 h light–dark cycle and fed ad libitum. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of our institution (Protocols N°. 042/11 and 182/13).

2.2. Chemicals and solutions

The artificial cerebrospinal fluid (aCSF) was manufactured with chemicals from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) as follows: 127 mmol L⁻¹ NaCl, 2 mmol L⁻¹ KCl, 1.2 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 26 mmol L⁻¹ NaHCO₃, 2 mmol L⁻¹ MgSO₄, 2 mmol L⁻¹ CaCl₂, 10 mmol L⁻¹ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and 10 mmol L⁻¹ glucose, bubbled with carbogenic mixture (95%, v/v O₂ and 5%, v/v CO₂).

The lysis buffer solution was prepared with a Sigma–FAST Protease Inhibitor cocktail Tablet (St. Louis, MO, USA), which contains 2 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, 1 mM Phosphoramidon, 130 mM Bestatin, 14 mM E-64, 1.0 mM Leupeptin, 0.2 mM Aprotinin, 10 mM Pepstatin A, and 50 mM sodium fluoride, and 1 mM sodium orthovanadate was added. The final pH was 7.20.

The following amino acid standards were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA): L-alanine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-cysteine, L-glycine, L-glutamic acid, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-proline, sarcosine, L-serine, L-valine, L-threonine. The standard solution of each amino acid was prepared at an initial concentration of 1.0 mg mL⁻¹ in H₂O and

stored at –20 °C. Primary standard mixtures, from the separate standard solutions, containing 10 µg mL⁻¹ of the indicated amino acids, were prepared in H₂O. These working solutions were stored at 4 °C.

HPLC-grade methanol was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) + trimethylchlorosilane (TMCS) 99:1 (v/v), and pyridine anhydrous 99.8% (m/m) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and methoxyamine hydrochloride 98% m/m was obtained from Fluka (St. Louis, MO, USA).

2.3. Collecting and sample preparation procedures

The animals were euthanized by decapitation, and blood samples were collected. Next, the brain was rapidly removed from the cranium and submerged in ice-cold aCSF. The regions of interest (prefrontal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) were dissected out on an ice-cold plate as described by Chiu et al. (2007). Then, each component was weighed, placed in a 1.5 mL microcentrifuge tube and homogenized in 400 µL of lysis buffer solution for 30 s. After homogenization, the samples were centrifuged (8000 × *g* for 10 min at 4 °C), and aliquots of the supernatants were stored at –20 °C until the derivatization step. The blood samples were centrifuged to collect the serum (2000 × *g* for 5 min at 4 °C).

2.4. Derivatization procedure

The derivatization procedure was performed as described in Paiva et al. (2013). Briefly, an aliquot of 100 µL of supernatants homogenate was transferred to a tube (or 50.0 µL, for cerebellum and serum), and to precipitate the protein was added 900 µL of methanol at –10 °C for each tube. The solution was vortexed for 1 min and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at room temperature. Then, 100 µL of supernatant was transferred to a glass GC vial and evaporated to dryness at room temperature under N₂. Next, 15 µL of methoxyamine in pyridine at 20 mg mL⁻¹ was added, followed by 35 µL of BSTFA with 1% TMCS. The solution was vortexed for 30 s and submitted to microwave irradiation in a domestic microwave oven (700 W power) equipped with a turning table for 3 min. The final solution was used for GC–MS analysis.

2.5. Analysis of gas chromatography–mass spectrometry

The amino acid analyses were performed using a Shimadzu (Kyoto, Japan) GC–MS system model GC-2010/QP-2010 high performance quadrupole. The mass spectrometer operated in electron impact mode (EI) at 70 eV. The analytes were separated on a Restek (Bellefonte, PA, USA) Rtx-5MS fused-silica capillary column chemically bonded (30 m × 0.25 mm id × 0.25 µm film thickness) containing 5% diphenyl, 95% dimethylpolysiloxane. The oven temperature program began at 80 °C, rose to 200 °C at 8 °C min⁻¹, rose to 300 °C at 30 °C min⁻¹, and held that temperature for 3 min. The injector was operated at 280 °C in splitless mode for 3 min, followed by a 1:20 split ratio. Helium with a purity of a 99.99% was used as the carrier gas, at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. Samples were injected manually with a 10 µL microsyringe Hamilton (Reno, NV, USA), in splitless mode, with a 1 min vent open time, and an injected volume of 1.0 µL. The ion source temperature was 200 °C and the GC–MS interface was kept on 260 °C. For identification and confirmation, each amino acid solution was prepared separately for derivatization in optimized conditions. Next, 1.0 µL of solution was injected into the GC–MS apparatus, and the analysis was performed in full scan mode (range 45–300 *m/z*), with a scan time of 2 scan s⁻¹. The retention times achieved and ions used for

identification and quantification are shown in Fig. 1. The quantification was achieved in single ion monitoring. Signal acquisition and data processing were performed using the Labsolution software Shimadzu (Kyoto, Japan). A domestic microwave from Philco (model PRC-700W, São Paulo, Brazil) was used for microwave-assisted derivatization.

The method parameters of merit were performed according to (EURACHEM, 2002) guidelines. The lysis buffer solution was used as a blank matrix. Six concentration levels were analyzed, with three measurements at each concentration level. The linear models for the calibration curves were constructed by the standard least

squares method. Linearity was established for all the analytes from 0.02 to 100.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

2.6. Statistics

Group means were compared via two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. The results were expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance was established at $P < 0.05$. In addition, factor analysis was applied, using principal component analysis for factor extraction, with varimax normalized rotation for factor loading and marked loadings greater than 0.70.

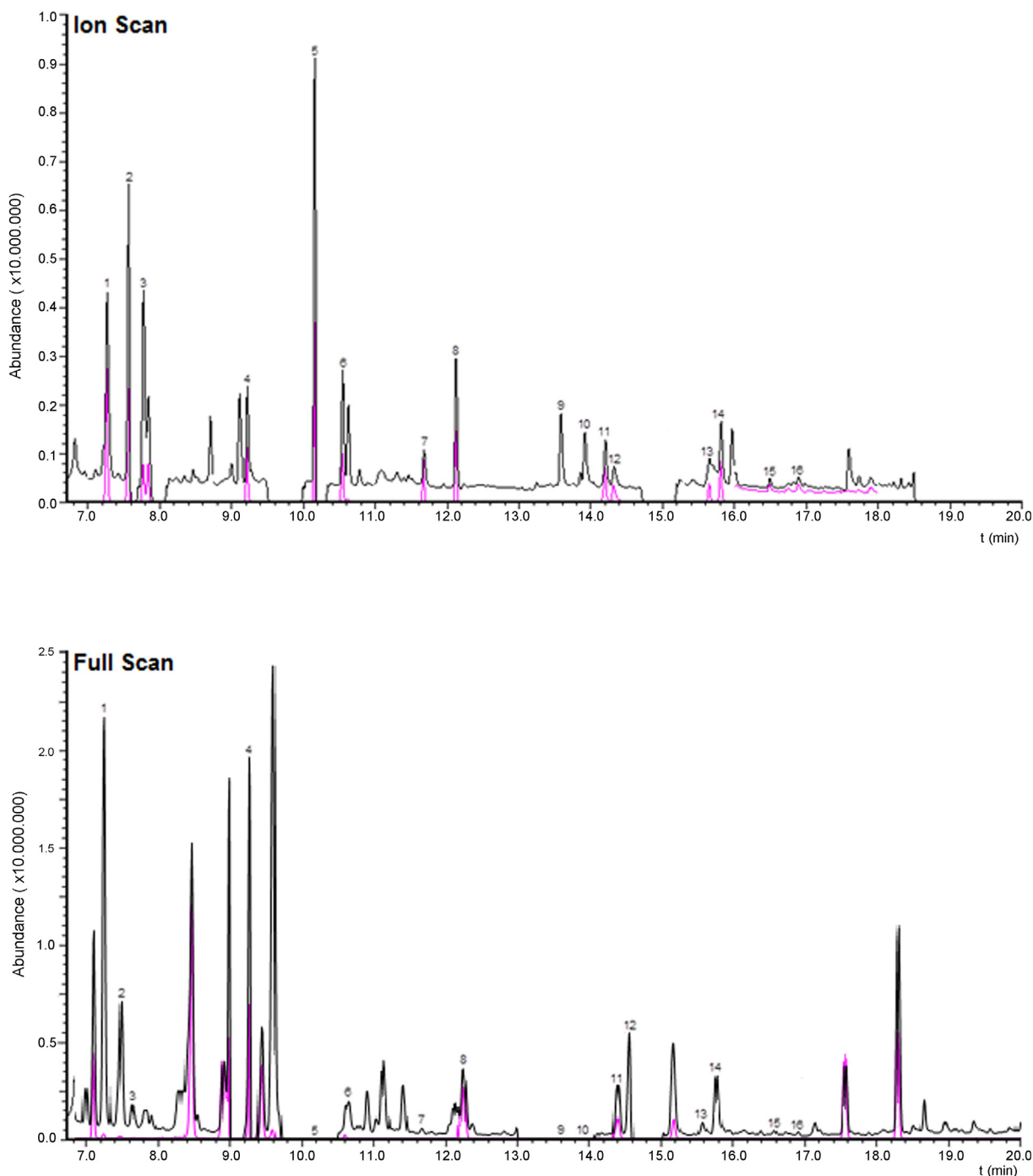


Fig. 1. Representative chromatogram of standard amino acids. The output order was L-alanine (1), glycine (2), sarcosine (3), L-valine (4), L-leucine (5), L-isoleucine (6), L-serine (7), L-threonine (8), L-aspartic acid (9), L-methionine (10), L-proline (11), L-cysteine (12), L-glutamic acid (13), L-phenylalanine (14), L-asparagine (15) and L-lysine (16).

Table 1
Amino acid levels in the brain and serum from Wistar rats.

Amino acids ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of proteins)	Prefrontal cortex		Striatum		Hippocampus		Cerebellum		Serum	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Alanine	6.81 ± 1.11	14.07 ± 2.24	5.36 ± 0.56	7.23 ± 0.84	8.35 ± 0.54	9.22 ± 0.59	7.41 ± 0.78	6.17 ± 1.72	13.05 ± 1.40	2.46 ± 1.60
Glycine	3.17 ± 0.41	4.91 ± 1.10	1.13 ± 0.13	1.73 ± 0.23	3.99 ± 1.86	8.15 ± 1.46	2.24 ± 0.28	2.62 ± 0.28	0.91 ± 0.03	0.89 ± 0.05
Sarcosine	1.51 ± 0.11	1.67 ± 0.14	5.77 ± 3.76	1.35 ± 0.13	1.17 ± 0.33	0.93 ± 0.05	5.11 ± 3.40	5.94 ± 4.17	4.96 ± 4.31	2.67 ± 2.00
Valine	1.48 ± 0.10	2.41 ± 0.26	1.00 ± 0.05	2.63 ± 1.42	1.15 ± 0.11	1.21 ± 0.07	1.69 ± 0.20	1.26 ± 0.11	6.63 ± 0.80	1.20 ± 0.66
Leucine	11.05 ± 2.48	19.65 ± 4.26	12.72 ± 2.12	19.04 ± 1.85	12.88 ± 2.92	15.32 ± 1.07	10.40 ± 1.10	10.18 ± 3.56	5.23 ± 0.67	1.20 ± 0.65
Isoleucine	1.34 ± 0.08	1.58 ± 0.22	0.73 ± 0.07	1.10 ± 0.09	0.69 ± 0.11	0.64 ± 0.03	1.31 ± 0.18	1.39 ± 0.08	2.72 ± 0.34	0.44 ± 0.01
Serine	6.79 ± 1.10	17.35 ± 2.98	3.35 ± 0.47	5.99 ± 0.70	7.07 ± 0.59	9.21 ± 1.25	5.35 ± 1.01	5.15 ± 1.18	6.27 ± 0.90	0.82 ± 0.01
Threonine	3.38 ± 0.51	7.59 ± 1.26	2.02 ± 0.20	3.71 ± 0.43	3.23 ± 0.34	3.88 ± 0.53	3.48 ± 0.13	3.74 ± 1.03	5.34 ± 0.83	0.44 ± 0.01
Aspartic acid	30.08 ± 8.05	35.75 ± 9.17	24.86 ± 5.07	36.70 ± 4.78	24.76 ± 4.75	29.33 ± 3.58	26.20 ± 4.75	28.62 ± 10.30	1.85 ± 0.20	1.28 ± 0.02
Methionine	2.14 ± 0.20	2.39 ± 0.19	1.27 ± 0.14	1.86 ± 0.17	1.23 ± 0.15	1.26 ± 0.07	2.36 ± 0.30	2.43 ± 0.07	1.36 ± 0.23	0.84 ± 0.01
Proline	171.2 ± 54.24	119.93 ± 64.62	127.36 ± 27.75	180.25 ± 31.13	108.49 ± 42.50	186.93 ± 11.19	0.89 ± 0.11	199.56 ± 81.67	32.92 ± 9.53	0.28 ± 0.02
Cysteine	36.17 ± 8.92	92.25 ± 15.59	27.51 ± 1.61	42.32 ± 4.18	205.85 ± 109.40	112.89 ± 25.22	19.80 ± 7.02	28.72 ± 12.03	31.25 ± 6.92	1.46 ± 0.74
Glutamic Acid	93.90 ± 26.82	104.58 ± 42.36	43.19 ± 8.79	105.89 ± 11.47	80.37 ± 26.99	86.46 ± 15.12	14.18 ± 1.80	84.07 ± 34.42	2.76 ± 0.92	1.14 ± 0.02
Phenylalanine	1.05 ± 0.07	1.50 ± 0.53	1.06 ± 0.14	2.30 ± 0.21	0.70 ± 0.08	0.80 ± 0.21	1.20 ± 0.14	1.13 ± 0.06	1.11 ± 0.36	0.39 ± 0.01
Aparagine	0.29 ± 0.10	0.35 ± 0.20	0.38 ± 0.06	0.48 ± 0.06	0.41 ± 0.11	0.63 ± 0.18	0.39 ± 0.07	0.59 ± 0.21	0.51 ± 0.23	0.04 ± 0.02
Lysine	3.15 ± 0.35	3.27 ± 0.27	1.89 ± 0.23	3.15 ± 0.24	1.70 ± 0.22	1.82 ± 0.11	3.66 ± 0.53	4.89 ± 1.24	1.36 ± 0.06	1.34 ± 0.01

Mean ± SEM.

3. Results

3.1. Amino acid extraction and gas chromatography–mass spectrometry

The extraction with lysis buffer solution and GC–MS analysis showed good linearity in the range studied; the curves obtained $R^2 = 0.975$ (L-cysteine) to 0.998 (L-aspartic acid). Detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ) were calculated from the mean and standard deviation of ten blank measurements with 95% confidence. The LOD ranged from $0.01 \pm 0.005 \mu\text{mol L}^{-1}$ to $4.23 \pm 0.02 \mu\text{mol L}^{-1}$ for L-glutamic acid and L-lysine, respectively. The LOQ ranged from $0.02 \pm 0.005 \mu\text{mol L}^{-1}$ to $7.07 \pm 0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ for the same analytes. In assessing the intra-assay precision (repeatability) and inter-day precision (reproducibility), ten replicates at the three concentration levels were analyzed the same day and on consecutive days, respectively. The coefficient of variation for repeatability was 4.12–15.59%. The coefficient of variation for inter-day precision ranged from 6.36% to 17.74%. Recovery study was performed with spiked free amino acids in the lysis buffer solution. The recovery ranged from 88.50% (L-lysine) to 129.40% (L-glutamic acid).

3.2. Amino acid content in Wistar rat brain tissue and serum

The amino acid content in Wistar rats was evaluated in four brain regions (prefrontal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) and in the serum by GC–MS (Table 1). To improve the understanding of these results, the amino acids were grouped by chemical features, and differences between tissues and genders were analyzed. Fig. 2 shows representative chromatograms from brain regions and serum of Wistar rats.

The first group of amino acids analyzed was aliphatic amino acids, which includes alanine, glycine, sarcosine, leucine and isoleucine (Fig. 3). Alanine content was higher in the cortex than in the striatum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). A similar difference was observed in glycine content, where the cortex level was higher than that found in striatum and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). Furthermore, the hippocampal level of glycine was higher than that found in striatum, cerebellum and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). Leucine levels did not differ among the brain tissues studied ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test), but it was lower in serum than in prefrontal cortex, striatum or hippocampus ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). Isoleucine levels were higher in prefrontal cortex than in hippocampus and striatum, the hippocampal isoleucine level was lower than the cerebellar. In contrast with other members of this group, the valine level was higher in serum than in brain tissues. There was no difference in the amount of sarcosine between the analyzed tissues ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

The second group analyzed was the hydroxyl amino acids, serine and threonine (Fig. 3). Serine levels were higher in the cortex than in the other tissues, and the hippocampal level was significantly higher than the serum level ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). The threonine level in cortex was higher than in striatum and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

The third group was the sulfur-containing amino acids (Fig. 4). The amounts of methionine in the cortex and cerebellum were higher than the levels in striatum, hippocampus and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). In contrast, the amount of cysteine in the hippocampus was higher than that in the striatum or in serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

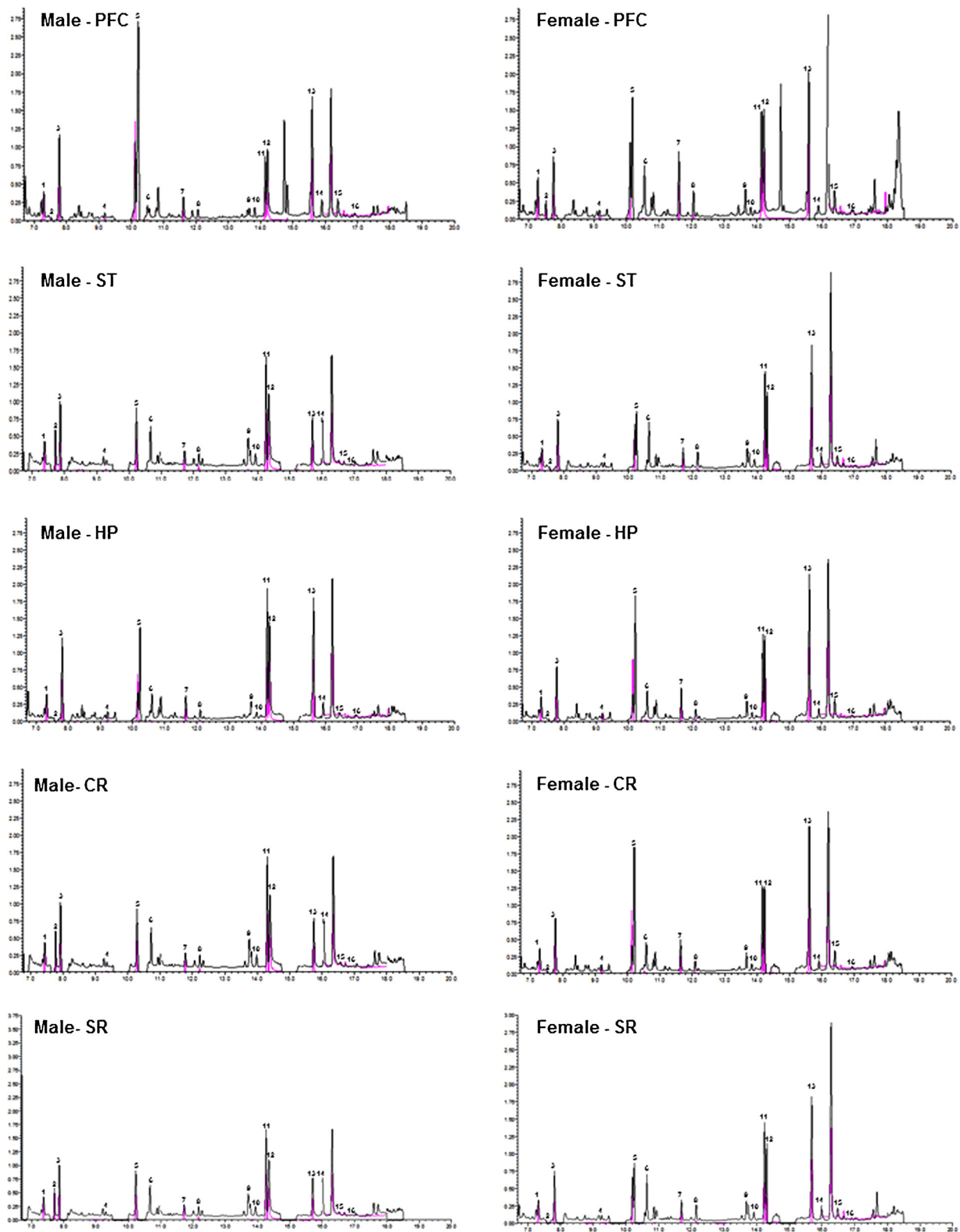


Fig. 2. Representative chromatograms of brain regions and serum of male and female Wistar rats. The prefrontal cortex (PFC), striatum (ST), hippocampus (HP), cerebellum (CR) and serum (SR) were analyzed as described in Section 2.

The fourth group analyzed was the acidic amino acids (glutamic acid, aspartic acid and its amide asparagine) (Fig. 4). The levels of glutamate and aspartate were higher in brain tissue than in the serum, with no significant differences between the brain tissues ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). The amide asparagine did not show differences between the analyzed

tissues ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). The other three groups, cyclic amino acid (proline), aromatic amino acid (phenylalanine) and basic amino acid (lysine), were also analyzed. The amount of proline was higher in striatum than in serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). The amount of phenylalanine was higher in the striatum than

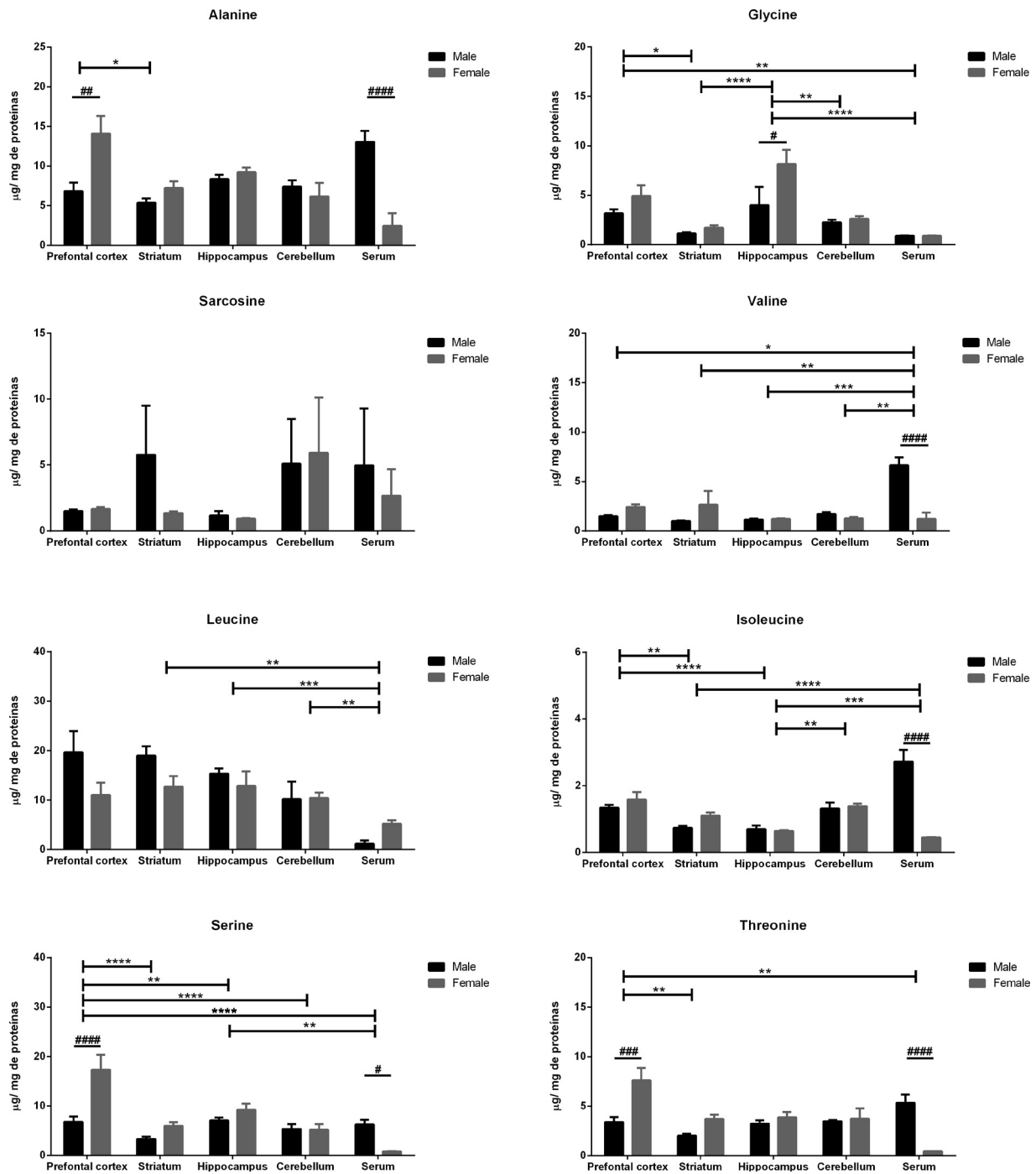


Fig. 3. Brain content of amino acids in Wistar rats. The amino acids were determined using gas chromatography–mass spectrometry. Four brain structures (prefrontal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) and serum were analyzed. The results are expressed as the mean \pm SEM from at least five different animals ($P > 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

in the hippocampus. Lysine levels were higher in the cerebellum than in the other brain tissues and greater in the striatum than in the serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

In Wistar rats, most of the gender differences were found in serum, where alanine, valine, threonine, isoleucine and serine were significantly higher in male than in female samples ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). In prefrontal cortex, alanine and threonine were higher in females than males, whereas serine was higher in males than females. Glycine and phenylalanine were significantly higher in females in the

hippocampus and striatum, respectively ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

Based on the results generated by the data matrix analyses of amino acids in different brain regions of Wistar rats, we decided to perform an exploratory factorial analysis to understand the distribution of these molecules in the brain (Fig. 5). In the prefrontal cortex, the amino acids A, T, S, V, L and C are associated with factor 1, whereas the amino acids Sr, M, K, D and E are associated with factor 2. In hippocampus, the amino acids A, T, S, G, V, P, C, D and E are associated with factor 1 and the amino acids Sr, L, I, F, M and K with factor 2. In cerebellum, factor 1 is composed of

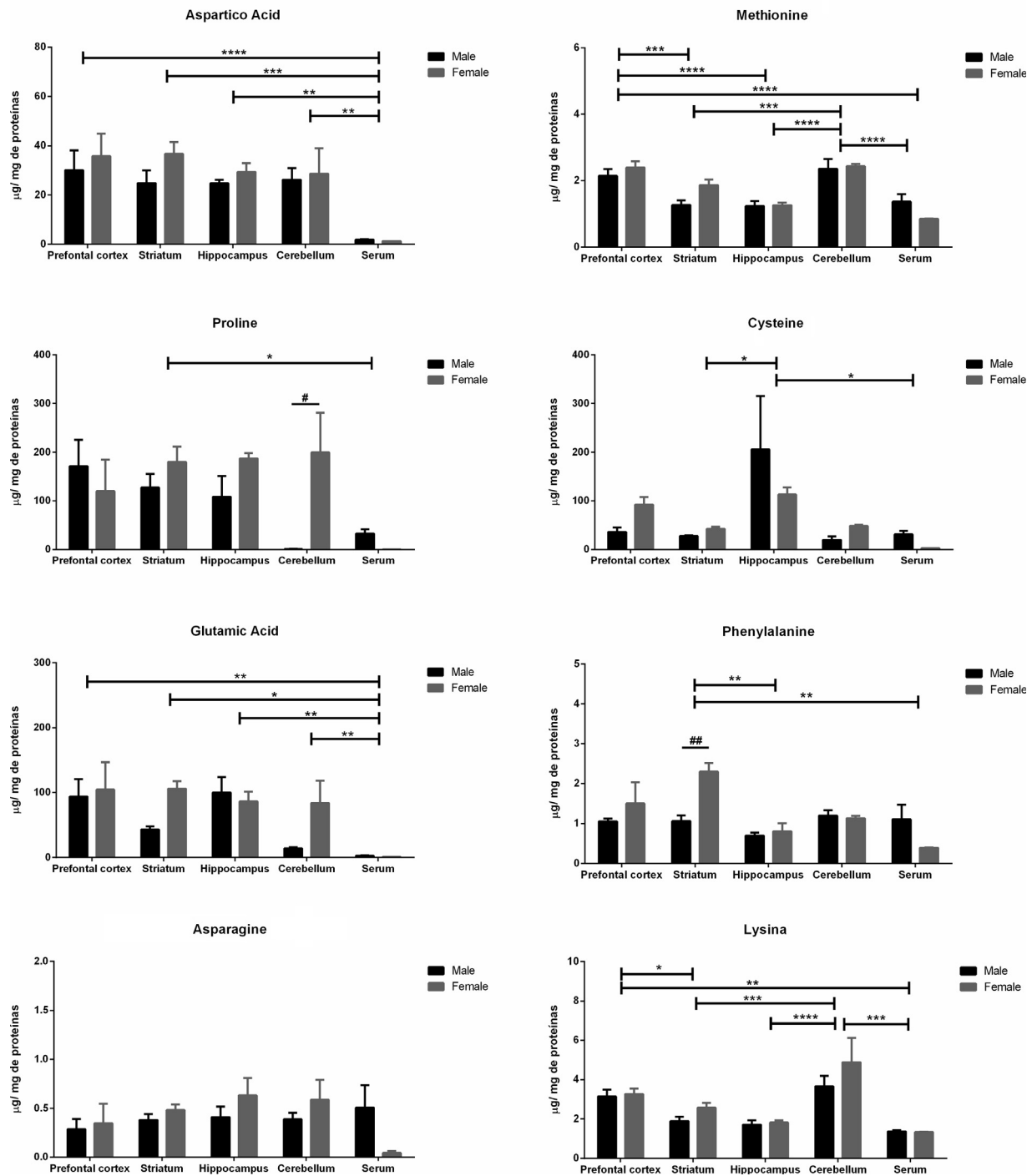


Fig. 4. Brain content of amino acids in Wistar rats. The amino acid levels were determined using gas chromatography–mass spectrometry. Four brain structures (prefrontal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) and serum were analyzed. The results are expressed as the mean \pm SEM from at least five different animals ($P > 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

the amino acids A, T, S, L, P, C, D and E and factor 2 of the amino acids G, V, I, M and F. In the striatum, the amino acids A, T, S, F, C, D and E are associated with factor 1, and the amino acids G, V, L, I, M and K with factor 2.

3.3. Amino acid contents in C57BL/6 mouse brain tissue and serum

The amino acid content was evaluated in four cerebral regions (prefrontal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) and in the serum by GC–MS from C57BL/6 mice (Table 2). The chromatogram profile is shown in Fig. 6.

The aliphatic amino acids (alanine, glycine, sarcosine, leucine and isoleucine) were also analyzed in mice (Fig. 7). Alanine content was higher in the cortex when compared with striatum and serum and was also higher in hippocampus than in striatum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). Glycine content was also higher in the cortex than in striatum and serum, higher in the hippocampus than in the striatum and serum, and higher in the cerebellum than in the hippocampus and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). Sarcosine content was higher in cerebellum than in prefrontal cortex, hippocampus and serum. Sarcosine was also more concentrated in the cortex

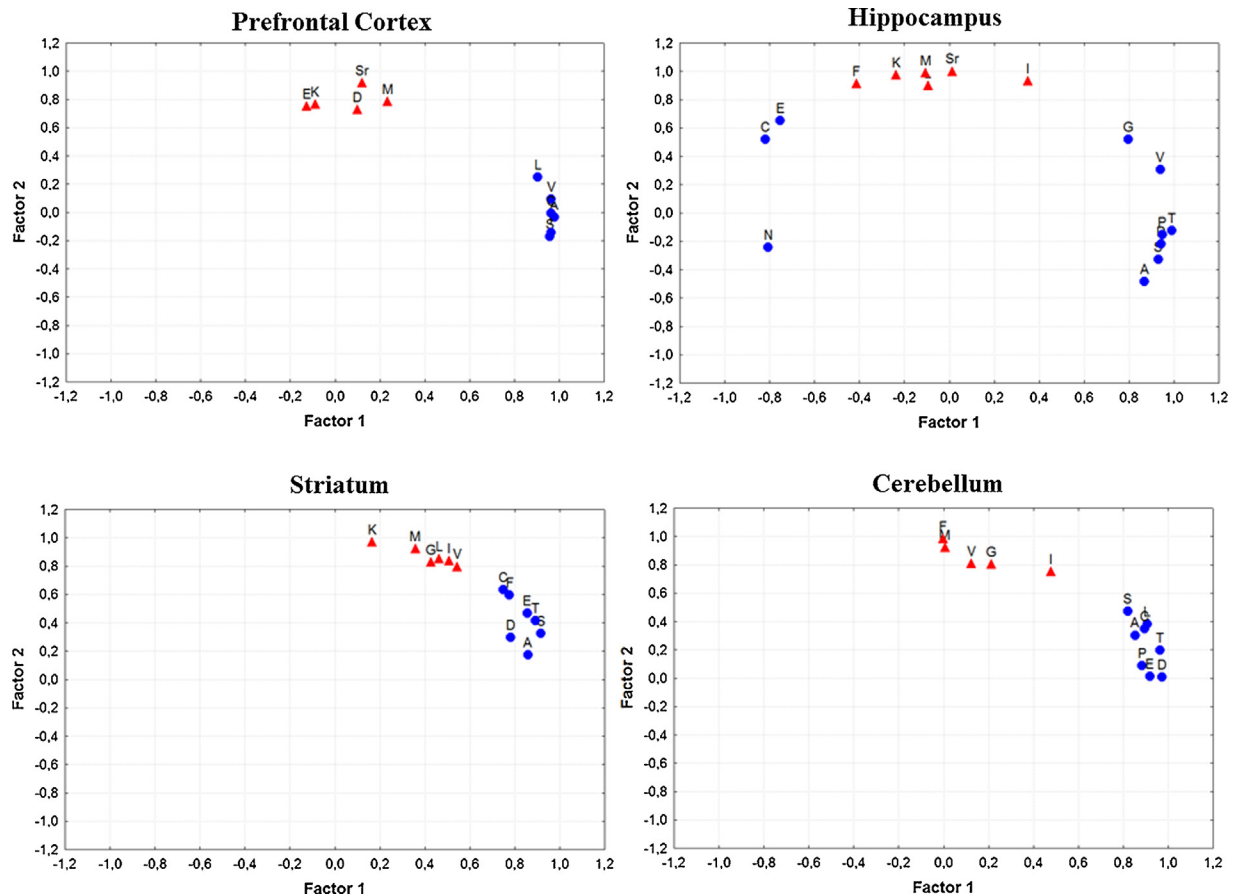


Fig. 5. Factorial analysis of brain levels of amino acids in Wistar rats. Alanine (A), glycine (G), sarcosine (Sr), L-valine (V), L-leucine (L), L-isoleucine (I), L-serine (S), L-threonine (T), L-aspartic acid (D), L-methionine (M), L-proline (P), L-cysteine (C), L-glutamic acid (E), L-phenylalanine (F), L-asparagine (N) and L-lysine (K). The data were extracted by the principal components method; varimax normalization was used as factor Loadings and was marked for loadings greater than 0.70.

than in the striatum and serum. The valine content was lower in striatum than in prefrontal cortex and cerebellum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). Leucine content was higher in hippocampus than in prefrontal cortex, cerebellum and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test), whereas isoleucine showed no differences among the brain tissues studied ($P > 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

The hydroxyl amino acids (serine and threonine) were also analyzed (Fig. 7). Serine content was higher in the cortex than in the striatum and serum, lower in striatum than hippocampus and cerebellum, and more concentrated in cerebellum than serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). In contrast, threonine levels showed no differences among the brain tissues studied ($P > 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

Table 2
Amino acid levels in the brain and serum from C57BL/6 mice.

Amino acids ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of proteins)	Prefrontal cortex		Striatum		Hippocampus		Cerebellum		Serum	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Alanine	7.05 \pm 0.88	6.27 \pm 0.76	3.32 \pm 0.39	3.48 \pm 0.50	4.32 \pm 1.09	8.04 \pm 1.46	6.31 \pm 0.46	5.08 \pm 0.62	10.34 \pm 5.81	2.99 \pm 0.78
Glycine	4.98 \pm 0.19	4.79 \pm 0.23	2.41 \pm 0.19	2.61 \pm 0.16	3.05 \pm 0.34	4.78 \pm 1.05	5.36 \pm 0.33	5.49 \pm 0.77	1.92 \pm 0.10	2.13 \pm 0.28
Sarcosine	3.32 \pm 0.12	3.22 \pm 0.18	5.29 \pm 3.73	6.42 \pm 4.76	13.48 \pm 7.08	3.00 \pm 0.59	4.48 \pm 0.90	3.72 \pm 0.54	1.31 \pm 0.06	1.46 \pm 0.19
Valine	2.28 \pm 0.13	2.17 \pm 0.10	1.11 \pm 0.11	1.16 \pm 0.08	1.48 \pm 0.19	1.95 \pm 0.30	2.35 \pm 0.14	2.39 \pm 0.32	6.01 \pm 3.30	1.36 \pm 0.33
Leucine	10.16 \pm 0.82	9.69 \pm 0.71	9.11 \pm 1.11	12.70 \pm 1.00	11.19 \pm 4.07	25.07 \pm 4.88	9.89 \pm 1.20	6.95 \pm 1.74	6.67 \pm 4.39	1.45 \pm 0.20
Isoleucine	2.42 \pm 0.09	2.31 \pm 0.12	2.74 \pm 1.50	1.28 \pm 0.07	1.49 \pm 0.18	2.09 \pm 0.34	2.49 \pm 0.19	2.62 \pm 0.38	2.65 \pm 1.17	1.11 \pm 0.14
Serine	4.83 \pm 0.30	4.60 \pm 0.24	2.48 \pm 0.27	2.70 \pm 0.22	3.24 \pm 0.50	5.26 \pm 0.79	4.84 \pm 0.33	4.99 \pm 0.70	1.93 \pm 0.09	1.98 \pm 0.25
Threonine	2.62 \pm 0.12	2.49 \pm 0.13	1.37 \pm 0.13	1.49 \pm 0.11	1.71 \pm 0.25	2.68 \pm 0.45	2.97 \pm 0.13	2.83 \pm 0.34	3.21 \pm 1.56	1.31 \pm 0.19
Aspartic Acid	17.49 \pm 2.49	14.85 \pm 3.42	15.89 \pm 4.21	10.86 \pm 3.09	9.68 \pm 2.67	22.69 \pm 5.78	36.53 \pm 4.55	21.04 \pm 6.94	4.80 \pm 2.15	3.02 \pm 0.42
Methionine	4.68 \pm 0.17	4.48 \pm 0.24	2.29 \pm 0.20	2.48 \pm 0.13	2.87 \pm 0.34	4.02 \pm 0.70	4.88 \pm 0.37	5.12 \pm 0.74	2.15 \pm 0.41	1.98 \pm 0.28
Proline	70.28 \pm 9.86	69.86 \pm 12.26	47.80 \pm 7.86	50.34 \pm 11.15	59.37 \pm 15.98	132.30 \pm 37.06	127.20 \pm 13.91	55.38 \pm 27.13	29.65 \pm 18.49	4.28 \pm 3.18
Cysteine	21.47 \pm 0.89	20.05 \pm 2.14	11.77 \pm 1.59	13.19 \pm 2.62	14.91 \pm 2.89	26.79 \pm 4.93	20.42 \pm 0.66	15.39 \pm 1.47	117.60 \pm 70.14	176.70 \pm 85.09
Glutamic Acid	7.95 \pm 0.77	7.33 \pm 1.30	6.06 \pm 1.99	8.00 \pm 3.52	12.50 \pm 5.39	30.69 \pm 11.65	13.91 \pm 3.8	10.66 \pm 2.66	6.39 \pm 4.09	2.64 \pm 0.37
Phenylalanine	2.13 \pm 0.08	2.04 \pm 0.10	1.06 \pm 0.11	1.18 \pm 0.08	1.42 \pm 0.19	2.20 \pm 0.41	2.28 \pm 0.15	2.35 \pm 0.32	1.67 \pm 0.85	0.92 \pm 0.12
Aparagine	0.30 \pm 0.11	0.15 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.12 \pm 0.04	0.07 \pm 0.02
Lysine	7.29 \pm 0.26	6.94 \pm 0.38	3.52 \pm 0.27	3.84 \pm 0.21	4.48 \pm 0.54	6.16 \pm 1.09	7.54 \pm 0.58	7.95 \pm 1.20	2.79 \pm 0.10	3.11 \pm 0.43

Mean \pm SEM.

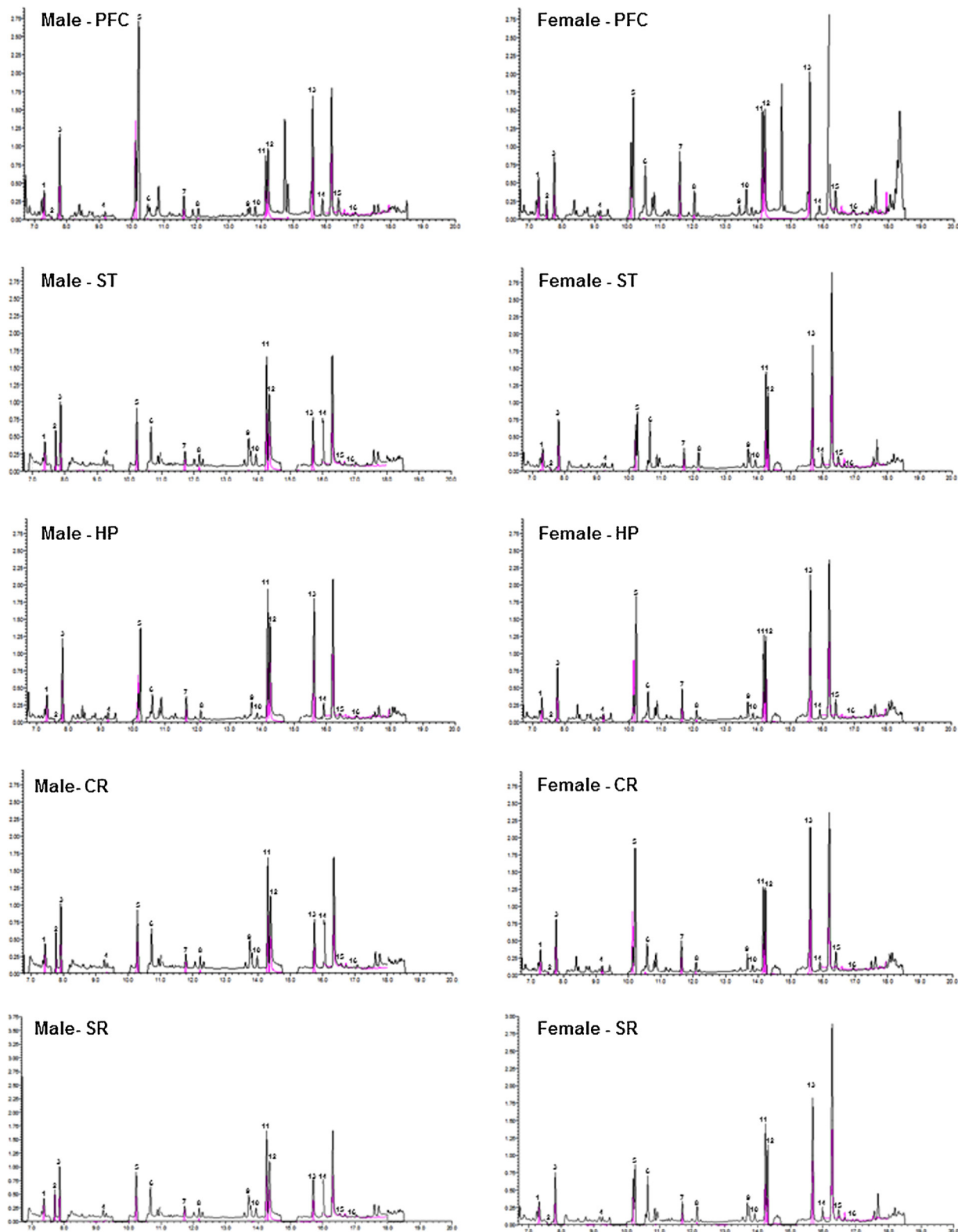


Fig. 6. Representative chromatograms of brain regions and serum of male and female C57BL/6 mice. The prefrontal cortex (PFC), striatum (ST), hippocampus (HP), cerebellum (CR) and serum (SR) were analyzed as described in Section 2.

The sulfur-containing amino acids (methionine and cysteine) were analyzed in mice (Fig. 8). Methionine content was higher in the cortex than in striatum and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). Furthermore, the cerebellar level of methionine was greater than that of the serum or hippocampus. Cysteine, the other sulfur-containing amino acid, was present at

higher levels in blood than in other tissues ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

The acidic amino acids (glutamic acid, aspartic acid and its amide asparagine) were also evaluated (Fig. 8). The level of aspartic acid was higher in cerebellum than in other tissues ($P < 0.05$, Two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test), whereas the level of

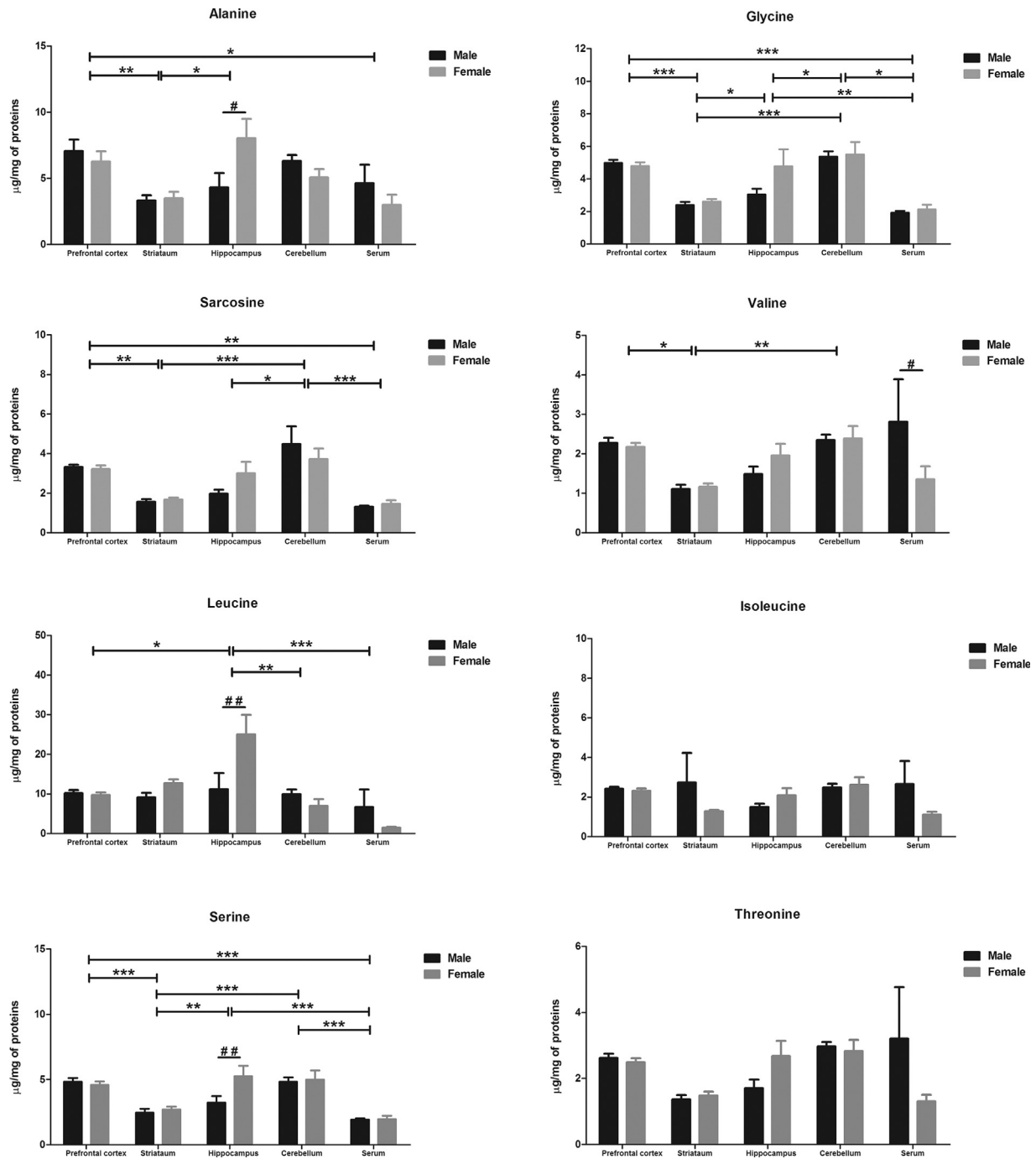


Fig. 7. Brain content of sulfur-containing amino acids in C57BL/6 mice. Levels of the amino acids methionine and cysteine were determined using gas chromatography–mass spectrometry. Four brain structures (prefrontal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) and serum were analyzed. The results are expressed as the mean \pm SEM from at least five different animals ($P > 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

glutamic acid was higher in hippocampus than in other tissues. Asparagine showed no differences between the analyzed tissues ($P > 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

The levels of proline (cyclic amino acid), phenylalanine (aromatic amino acid) and lysine (basic amino acid) were also analyzed (Fig. 8). Proline content was lower in serum when compared with hippocampus and cerebellum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). The amount of phenylalanine was higher in cortex, hippocampus and cerebellum than in striatum and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). Lysine levels were higher in cortex than striatum and serum, and lysine was also more concentrated in

cerebellum than striatum, hippocampus and serum ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

In C57BL/6 mice, most of the gender differences were found in hippocampus, where alanine, leucine, serine and proline were higher in females than males ($P < 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test). In cerebellum, aspartic acid and proline levels were higher in males than females, whereas valine levels were higher in male mice.

The exploratory factor analysis revealed that in prefrontal cortex, the amino acids G, V, I, S, T, F, K are associated with factor 1 and the amino acids A, C, P, D, E with factor 2 (Fig. 9). In hippocampus, we find that amino acids G, V, I, M, C, N, F, K are

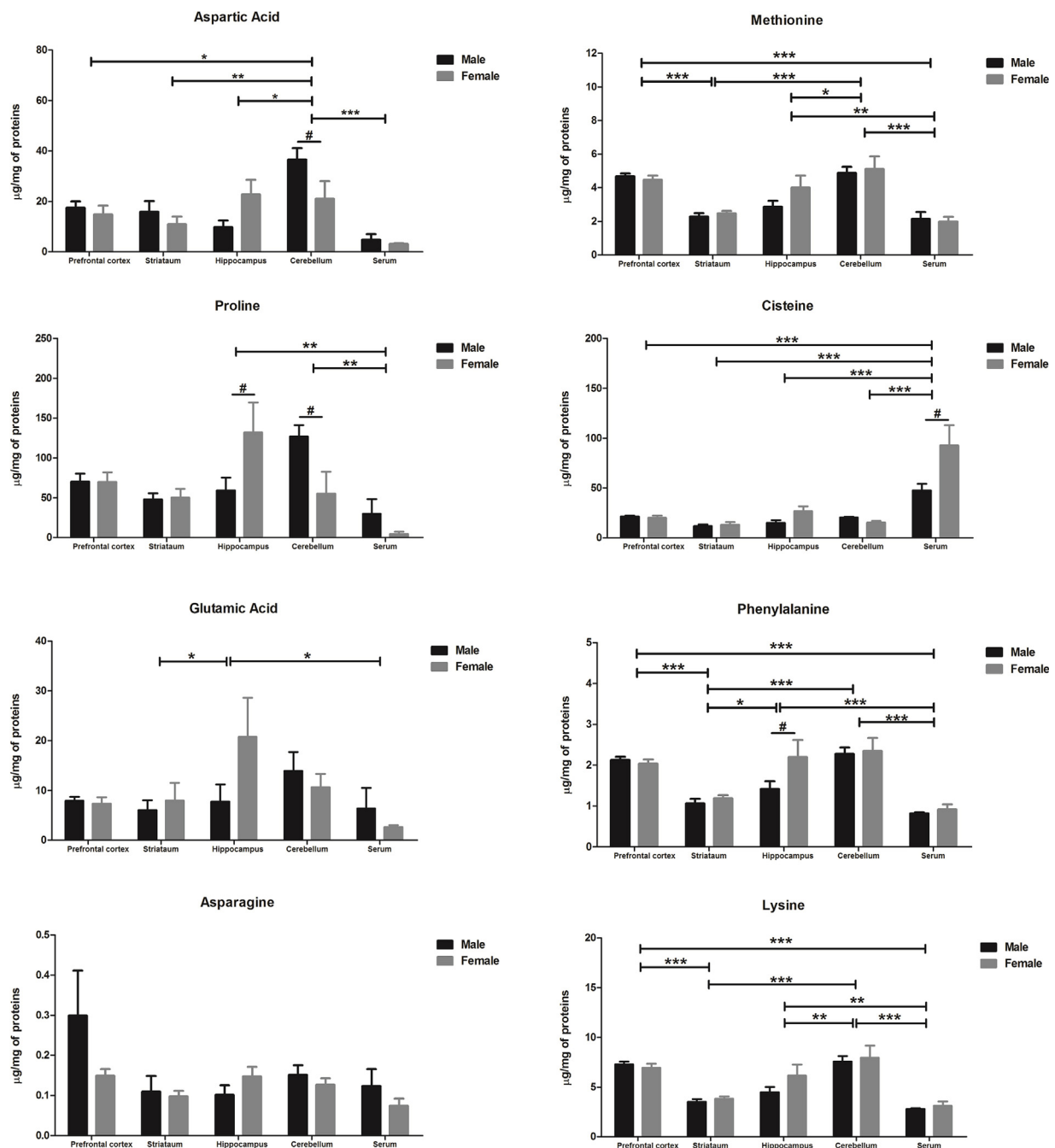


Fig. 8. Brain content of acidic amino acids in C57BL/6 mice. The levels of acidic amino acids (glutamate, aspartate, and asparagine) were determined using gas chromatography–mass spectrometry. Four brain structures (prefrontal cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) and serum were analyzed. The results are expressed as the mean \pm SEM from at least five different animals ($P > 0.05$, two-way ANOVA, with Bonferroni's post hoc test).

associated with factor 1, and amino acids A, L, S, P, D and E with factor 2. In cerebellum, the amino acids A, G, V, I, S, T, M, F and K are associated with factor 1, and the amino acids L, C, P, D and E are associated with factor 2. The most distinctive pattern was found in the striatum, where factor 1 is composed of the amino acids A, G, V, S, T, M, F, K, C, P, D and E, and factor 2 is composed of the amino acids I, N.

4. Discussion

The measurement of amino acid levels from brain tissue using lysis buffer solution extraction, BSTFA microwave derivatization and CG–MS analysis showed great sensitivity and rapid performance.

Amino acid analysis in brain tissues can be performed by several chromatography methods (HPLC with photodiode array and fluorescence detection, liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) or ultra-high-performance-liquid-chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS)); however, the most common method uses ion-exchange liquid chromatography followed by UV detection (Schwarz et al., 2005; Kaspar et al., 2009; Waldhier et al., 2010; Waterval et al., 2009; Visser et al., 2011). This method is useful, but it can be time-consuming, and the sensitivity is often low. On the other hand, GC/MS methods present good separation, high sensitivity, robustness and large spectrum libraries, and these technical advantages are responsible for good results in metabolite analysis (Shah et al., 2002).

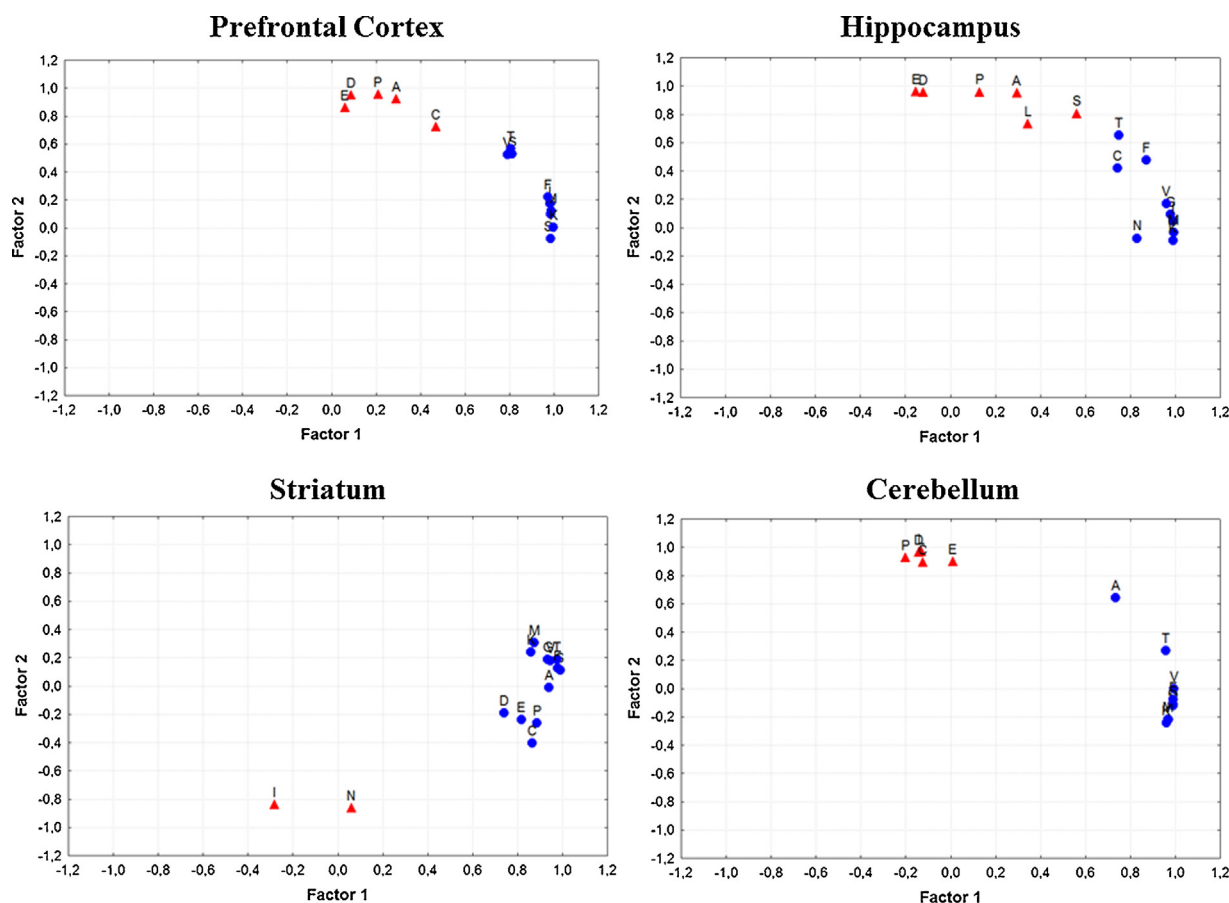


Fig. 9. Factorial analysis of brain levels of amino acids in C57BL/6 mice. Alanine (A), glycine (G), sarcosine (Sr), L-valine (V), L-leucine (L), L-isoleucine (I), L-serine (S), L-threonine (T), L-aspartic acid (D), L-methionine (M), L-proline (P), L-cysteine (C), L-glutamic acid (E), L-phenylalanine (F), L-asparagine (N) and L-lysine (K). The data were extracted by the principal components method; varimax normalization was used as factor loadings and was marked for loadings greater than 0.70.

Our method includes two steps before analysis, extraction and derivatization, which consume 25 and 3 min, respectively. The extract made here used a neutral pH (7.20) with a cocktail of protease inhibitors, which minimize the degradation of the samples, followed by deproteinization with cold methanol. In several methods, the deproteinization process involves homogenization of the tissue in an aqueous strong acid solution and the separation of an insoluble pellet from the supernatant by centrifugation (Shah et al., 2002). This type of preparation can induce hydrolysis of several amino acids, such as asparagine to aspartic acid and glutamine to glutamic acid (Shah et al., 2002). Moreover, BSTFA microwave derivatization requires a shorter time and has lower limits of quantification than other methods (Schwarz et al., 2005; Kaspar et al., 2009; Waldhier et al., 2010; Waterval et al., 2009; Visser et al., 2011). Furthermore, it was demonstrated that a single BSTFA derivatization was useful for the analysis of 16 amino acids in brain samples, which allowed speed and efficiency. However, this method was unable to detect arginine and histidine due to the thermal instability of their derivatives. This method showed good resolution, comparable to those that use N-(tert-butylidimethylsilyl)-N-methyltrifluoro-acetamide (MTBSTFA) for derivatization (Wood et al., 2006), and is a suitable alternative technique for the determination of amino acid levels in brain samples.

In rats and mice, the glutamate and aspartate levels were more concentrated in brain than in serum. Glutamatergic neurotransmission is the most important excitatory pathway in the brain, being involved in several physiological mechanisms such as synaptic plasticity, learning and memory (Shah et al., 2002; Coyle,

2012). Over the last decade, new findings have supported the hypothesis that hypofunction of glutamatergic neurotransmission contributes to the etiology of schizophrenia (Coyle, 2012; Javitt, 2012). Although the role of aspartate in neurotransmission is less studied, several reports have demonstrated its function in neurons. An interesting feature of aspartate is its great affinity for excitatory amino acid transporters, higher than glutamate, and its lower affinity for glutamate receptors, which indicate a neuromodulatory function of this neurotransmitter (Shah et al., 2002).

Proline, which is derived from the amino acid L-glutamate, was also less concentrated in serum than brain structures of rats and mice. In the brain, proline also shows a neuromodulatory function on glutamatergic neurotransmission because proline transporters are expressed on presynaptic neurons of excitatory pathways (Ferreira et al., 2012; Delwing et al., 2007; Cohen and Nadler, 1997a, 1997b). The genetic deficiency on proline catabolism (hyperprolinemia) may cause brain damage and spatial memory deficits (Wyse and Netto, 2011; Bavaresco et al., 2005).

Glycine content in rats and mice was highest in cortex, hippocampus and cerebellum, which is consistent with its role in glutamatergic and glycinergic neurotransmission. Glycine is a co-activator of NMDA receptors and is the key for the involvement of glycine in the pathophysiology of schizophrenia (Shah et al., 2002; Cubelos et al., 2005; Zafra et al., 1995a, 1995b). Furthermore, glycine is the second major inhibitory neurotransmitter in the CNS and has an important role in inhibitory interneurons in the spinal cord (Bowerly and Smart, 2006). Glycinergic neurotransmission is also important for sensorimotor control and is widely present in the medial corticothalamic tract, in spinal afferents from the

raphe nuclei and reticular formation and in interneurons located in the striatum and substantia nigra (Bowery and Smart, 2006; Rajendra et al., 1997).

We also studied the concentration of sarcosine, an intermediate of the glycine–choline pathway and, although not a neurotransmitter, this molecule plays an important role in the CNS. Sarcosine is a competitive inhibitor of glycine transporter type 1, a co-agonist of NMDA receptor and a weak agonist of glycine receptors (Zhang et al., 2009). It is well known that glycine transporter type 1 inhibitors potentiate the NMDA receptor response in glutamatergic neurotransmission through an increase of the co-agonist glycine in the synaptic cleft (Chen et al., 2003; Lim et al., 2004; Kinney et al., 2003). Based on these pharmacological activities, sarcosine has antischizophrenic and neuroprotective activity (Hsien-Yuan et al., 2008; Tsai et al., 2004; Pinto et al., 2012). The study of this molecule is of great interest to the field of neuroscience because variations in its concentration can affect behavior and brain function in models of schizophrenia.

Another important amino acid for glutamatergic neurotransmission is serine, which was higher in cortex and hippocampus than in serum in both rodents. L-Serine can be converted to D-serine by serine racemase, a brain-enriched enzyme, in neurons in the visual system (Wolosker et al., 2008; Baumgart and Rodríguez-Crespo, 2008). D-Serine acts in glutamatergic neurotransmission by binding to the glycine site of NMDA receptors (Wolosker et al., 2008; Baumgart and Rodríguez-Crespo, 2008). D-Serine modulates NMDA function and is involved in several physiological and pathological processes, such as schizophrenia and neurotoxicity (Wolosker et al., 2008; Baumgart and Rodríguez-Crespo, 2008).

We also studied the concentrations of methionine and cysteine. The first was higher in brain structures than in serum, whereas the second was higher in hippocampus for rats and serum for mice. Methionine is a major methyl donor in the brain and shows some antidepressant properties in rodents, but that mechanism remains unclear (Young and Shalchi, 2005). Cysteine shows two antagonist effects: the first is a neuroprotective effect through glutathione synthesis in neurons, where cysteine serves as an inorganic sulfate for detoxification reactions (Janáky et al., 2000). In contrast, the second effect is neurotoxic, with exogenous administration of L-cysteine evoking cell damage and behavioral deficits in animal models (Janáky et al., 2000). L-Cysteine may play a role as a neuromodulator and has been related to neurological disorders (Janáky et al., 2000).

In rats, we observed that isoleucine was more concentrated in serum than in brain structures, while we observed no differences in mice. In rats, leucine was less concentrated in serum than in brain structures; however, in mice, leucine was most concentrated in the hippocampus. The alterations in the levels of leucine, isoleucine and valine, also known as branched-chain amino acids (BCAA), are closely linked to behavioral disorders and obesity (Coppola et al., 2013). In rats, dietary supplementation of BCAA decreases exploratory behavior in the elevated plus maze test, indicating increased anxiety (Coppola et al., 2013).

In rats, phenylalanine levels were higher in striatum than in hippocampus and serum, whereas in mice, phenylalanine was lower in striatum than in other brain structures. In striatum, accumulation of phenylalanine is associated with the synthesis and degradation of monoamines (Mehta et al., 2005). Acute depletion of tyrosine and phenylalanine disrupts dopamine levels and alters working memory in humans (Mehta et al., 2005). The high concentrations of L-phenylalanine during phenylketonuria (>1.20 mM) cause mental retardation, which is characteristic of the genetic disorder phenylketonuria (Glushakov et al., 2002). These effects occur in part due to the L-phenylalanine inhibition of NMDA receptor current in neurons through the glycine-binding

site, which causes depression in glutamatergic synapses (Glushakov et al., 2002, 2005).

Exploratory factorial analysis is a statistical technique that seeks relationship patterns between large numbers of dependent variables. This analysis allows the reduction of the number of dependent variables to a smaller number (factors) and to extract additional information from these hidden factors. In mice, the analysis revealed a dichotomy between the factors in the brain structures, and it was possible to observe an association between the excitatory amino acids (aspartate, glutamate and proline) or structural and inhibitory amino acids (glycine, valine, phenylalanine and lysine). In rats, the excitatory amino acids glutamate and aspartate were associated with all rat brain tissues. The construction of these factors shows how these molecules are related to each other in different parts of the brain, a balance that is crucial to the function of the CNS.

5. Conclusion

In conclusion, this work shows that the determination of amino acid levels in brain samples of Wistar rats and C57BL/6 mice using a gas chromatography–mass spectrometry method provides a cerebral profile of amino acids in brain substrates and serum. The lysis buffer solution showed good sample extraction and enabled parallel analyses by western blotting and GC–MS, and the microwave derivatization allows a faster process. This study shows that this GC–MS method is a reproducible, fast and efficient procedure, permitting multiple analyses with the same samples. This method offers a useful tool for pharmacological and physiological studies to improve the understanding of cerebral chemistry during physiological and pathological conditions.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Capes 1444/2011; Capes/Decit 2865/2010, Capes PNPd, FAPEMIG, MCT-INCT Medicina Molecular and CNPq. Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG. Gomez M.V., Resende R.R. and Gomez R.S. are CNPq fellowship recipients.

References

- Baumgart, F., Rodríguez-Crespo, I., 2008. D-Amino acids in the brain: the biochemistry of brain serine racemase. *FEBS Journal* 275 (14) 3538–3545.
- Bavaresco, C., Luíz Streck, E., Netto, C., Wyse, A., 2005. Chronic hyperprolinemia provokes a memory deficit in the Morris water maze task. *Metabolic Brain Disease* 20 (1) 73–80.
- Bowery, N.G., Smart, T.G., 2006. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British Journal of Pharmacology* 147 (S1) S109–S119.
- Chen, L., Muhlhauser, M., Yang, C.R., 2003. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Neurophysiology* 89 (2) 691–703.
- Chiu, K., Lau, W.M., Lau, H.T., So, K.-F., Chang, R.C.-C., 2007. Micro-dissection of rat brain for RNA or protein extraction from specific brain region. *Journal of Visualized Experiments* (7) e269.
- Cohen, S.M., Nadler, J.V., 1997a. Proline-induced inhibition of glutamate release in hippocampal area CA1. *Brain Research* 769 (2) 333–339.
- Cohen, S.M., Nadler, J.V., 1997b. Proline-induced potentiation of glutamate transmission. *Brain Research* 761 (2) 271–282.
- Coppola, A., Wenner, B.R., Ilkayeva, O., Stevens, R.D., Maggioni, M., Slotkin, T.A., Levin, E.D., Newgard, C.B., 2013. Branched-chain amino acids alter neurobehavioral function in rats. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 304 (4) E405–E413.
- Coyle, J.T., 2012. NMDA receptor and schizophrenia a brief history. *Schizophrenia Bulletin* 38 (5) 920–926.
- Cubelos, B., Gimenez, C., Zafra, F., 2005. Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cerebral Cortex* 15 (4) 448–459.
- Delwing, D., Delwing, D., Sanna, R.J., Wofchuk, S., Wyse, A.T.S., 2007. Proline promotes decrease in glutamate uptake in slices of cerebral cortex and hippocampus of rats. *Life Sciences* 81 (25–26) 1645–1650.

- EURACHEM, 2002. Guide to Quality in Analytical Chemistry in AID to Accreditation. CITAC/EURACHEM.
- Ferreira, A.K., da Cunha, A., Scherer, E., Machado, F., da Cunha, M., Braga, A., Mussulini, B., Moreira, J., Wofchuk, S., Souza, D., Wyse, A.S., 2012. Evidence that hyperprolinemia alters glutamatergic homeostasis in rat brain: neuroprotector effect of guanosine. *Neurochemical Research* 37 (1) 205–213.
- Glushakov, A.V., Dennis, D.M., Morey, T.E., Summers, C., Cucchiara, R.F., Seubert, C.N., Martynyuk, A.E., 2002. Specific inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function in rat hippocampal neurons by L-phenylalanine at concentrations observed during phenylketonuria. *Molecular Psychiatry* 7 (4) 359–367.
- Glushakov, A.V., Glushakova, O., Varshney, M., Bajpai, L.K., Summers, C., Laipis, P.J., Embury, J.E., Baker, S.P., Otero, D.H., Dennis, D.M., Seubert, C.N., Martynyuk, A.E., 2005. Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria. *Brain* 128 (2) 300–307.
- Hsien-Yuan, L., Yi-Ching, L., Chieh-Liang, H., Yue-Cune, C., Chun-Hui, L., Cheng-Hwang, P., Guochuan, E.T., 2008. Sarcosine (N-methylglycine) treatment for acute schizophrenia: a randomized, double-blind study. *Biological Psychiatry* 63 (1) 9–12.
- Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P., Oja, S.S., 2000. Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochemical Research* 25 (9–10) 1397–1405.
- Javitt, D.C., 2012. Glycine transport inhibitors in the treatment of schizophrenia. *Handbook of Experimental Pharmacology* (213) 367–399.
- Kaspar, H., Dettmer, K., Chan, Q., Daniels, S., Nimkar, S., Daviglus, M.L., Stamler, J., Elliott, P., Oefner, P.J., 2009. Urinary amino acid analysis: a comparison of iTRAQ-LC-MS/MS, GC-MS, and amino acid analyzer. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877 (20–21) 1838–1846.
- Kinney, G.G., Sur, C., Burno, M., Mallorga, P.J., Williams, J.B., Figueroa, D.J., Wittmann, M., Lemaire, W., Conn, P.J., 2003. The glycine transporter type 1 inhibitor N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine potentiates NMDA receptor-mediated responses in vivo and produces an antipsychotic profile in rodent behavior. *The Journal of Neuroscience* 23 (20) 7586–7591.
- Lim, R., Hoang, P., Berger, A.J., 2004. Blockade of glycine transporter-1 (GLYT-1) potentiates NMDA receptor-mediated synaptic transmission in hypoglossal motoneurons. *Journal of Neurophysiology* 92 (4) 2530–2537.
- Mehta, M., Gumaste, D., Montgomery, A., McTavish, S., Grasby, P., 2005. The effects of acute tyrosine and phenylalanine depletion on spatial working memory and planning in healthy volunteers are predicted by changes in striatal dopamine levels. *Psychopharmacology* 180 (4) 654–663.
- Paiva, M.J.N., Menezes, H.C., Christo, P.P., Resende, R.R., Cardeal, Z.L., 2013. An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 931, 97–102.
- Pinto, M.C.X., Mourão, F.A.G., Binda, N.S., Leite, H.R., Gomez, M.V., Massensini, A.R., Gomez, R.S., 2012. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning. *Neurochemistry International* 61 (5) 713–720.
- Rajendra, S., Lynch, J.W., Schofield, P.R., 1997. The glycine receptor. *Pharmacology & Therapeutics* 73 (2) 121–146.
- Shah, A.J., Crespi, F., Heidbreder, C., 2002. Amino acid neurotransmitters: separation approaches and diagnostic value. *Journal of Chromatography B* 781 (1–2) 151–163.
- Schwarz, E.L., Roberts, W.L., Pasquali, M., 2005. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta* 354 (1–2) 83–90.
- Tsai, G., Lane, H-Y., Yang, P., Chong, M-Y., Lange, N., 2004. Glycine transporter 1 inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 55 (5) 452–456.
- Visser, W.F., Verhoeven-Duif, N.M., Ophoff, R., Bakker, S., Klomp, L.W., Berger, R., de Koning, T.J., 2011. A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography–tandem mass spectrometry based method for the quantification of D-amino acids in body fluids. *Journal of Chromatography A* 1218 (40) 7130–7136.
- Waldhler, M.C., Dettmer, K., Gruber, M.A., Oefner, P.J., 2010. Comparison of derivatization and chromatographic methods for GC-MS analysis of amino acid enantiomers in physiological samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878 (15–16) 1103–1112.
- Waterval, W.A., Scheijen, J.L., Ortman-Ploemen, M.M., Habets-van der Poel, C.D., Bierau, J., 2009. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism. *Clinica Chimica Acta* 407 (1–2) 36–42.
- Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., Foltyn, V.N., 2008. D-Amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS Journal* 275 (14) 3514–3526.
- Wood, P.L., Khan, M.A., Moskal, J.R., 2006. Neurochemical analysis of amino acids, polyamines and carboxylic acids: GC-MS quantitation of tBDMs derivatives using ammonia positive chemical ionization. *Journal of Chromatography B* 831 (1–2) 313–319.
- Wyse, A.S., Netto, A.C., 2011. Behavioral and neurochemical effects of proline. *Metabolic Brain Disease* 26 (3) 159–172.
- Young, S.N., Shalchi, M., 2005. The effect of methionine and S-adenosylmethionine on S-adenosylmethionine levels in the rat brain. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 30 (1) 44–48.
- Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N.C., Gimenez, C., Storm-Mathisen, J., 1995a. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *Journal of Neuroscience* 15, 3952–3969.
- Zafra, F., Gomez, J., Olivares, L., Aragón, C., Giménez, C., 1995b. Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *European Journal of Neuroscience* 7 (6) 1342–1352.
- Zhang, H.X., Lyons-Warren, A., Thio, L.L., 2009. The glycine transport inhibitor sarcosine is an inhibitory glycine receptor agonist. *Neuropharmacology* 57 (5–6) 551–555.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO MAURO CUNHA XAVIER PINTO - 2010718172


Realizou-se, no dia 24 de janeiro de 2014, às 14:00 horas, faculdade de medicina, sala 526, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *EFEITO NEUROPROTETOR DA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR DE GLICINA DO TIPO I*, apresentada por MAURO CUNHA XAVIER PINTO, número de registro 2010718172, graduado no curso de Farmácia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Renato Santiago Gomez (UFMG) – presidente da banca, Prof. André Ricardo Massensini (UFMG) - coorientador, Prof.^a Luciene Bruno Vieira (UFMG), Prof(a). Cristina Guatimosim Fonseca (UFMG), Prof.^a Carla Ines Tasca (UFSC), Prof.^a Maira de Castro Lima (UFSJ).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 24 de janeiro de 2013.


Prof. Renato Santiago Gomez (UFMG)
Orientador


Prof. André Ricardo Massensini (UFMG)
Coorientador


Prof.^a Luciene Bruno Vieira (UFMG),


Prof(a). Cristina Guatimosim Fonseca (UFMG)

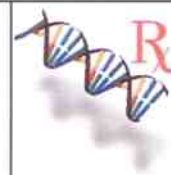
Prof.^a Carla Ines Tasca (UFSC)


Prof.^a Maira de Castro Lima (UFSJ)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO NEUROPROTETOR DA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR DE GLICINA DO TIPO I

MAURO CUNHA XAVIER PINTO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, área de concentração Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Aprovada em 24 de janeiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Renato Santiago Gomez (UFMG)


Prof. André Ricardo Massensini (UFMG)


Prof.^a Luciene Bruno Vieira (UFMG)


Prof(a). Cristina Guatimosim Fonseca (UFMG)


Prof.^a Carla Ines Tasca (UFSC)


Prof.^a Maira de Castro Lima (UFSJ)

Belo Horizonte, 24 de janeiro de 2014.