

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOQUÍMICA**

NICHOLAS GUERINI SELISTRE

**EFEITO DO FLUOROCITRATO SOBRE O METABOLISMO E PARÂMETROS
ASTROGLIAIS EM CÉLULAS C6**

**Porto Alegre
2020**

NICHOLAS GUERINI SELISTRE

EFEITO DO FLUOROCITRATO SOBRE O METABOLISMO E
PARÂMETROS ASTROGLIAIS EM CÉLULAS C6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre
2020

Dedico este trabalho ao CNPq e a CAPES por continuarem sendo o sustentáculo da ciência brasileira em um período de grande retrocesso científico e educacional.

AGRADECIMENTOS

Ciência é um trabalho em conjunto construído através do tempo, então diversas pessoas participaram ativamente nesse trabalho, mesmo sendo de forma direta ou indireta, então gostaria de agradecer:

- A minha família (Flávia, Daniel e Bernardo), que mesmo em encontros e desencontros, sempre me apoiaram e estiveram do meu lado, ressaltando sempre a importância da educação e do crescimento profissional, são essenciais para minha existência e amo vocês incondicionalmente;
- A minha madrinha Helena, minha segunda mãe, você me apresentou o mundo dos filmes e da leitura e sem isso não existiria o cientista nerd que sou hoje, obrigado por me entender e me aceitar;
- Ao João, o farol que ilumina os meus aspectos mais escuros, você torna tudo mais leve e cintilante, sua paciência e calma foram fundamentais para acalmar as tempestades que acontecem no cérebro de um aluno pós graduação muito ansioso e nervoso, te amo muito;
- A Krista, minha mãe e mentora científica, você é um dos pilares que sustentam esse trabalho, o seu apoio em momentos difíceis foi imprescindível para a construção de um jovem pesquisador que vos escreve, obrigado por todo aprendizado e por me ensinar a ser uma pessoa melhor;
- A Lets, a minha diva da vida real, o seu vasto conhecimento auxiliou intensamente para o andamento desse trabalho, espero que essas breves palavras demonstrem o quanto a sua presença me acrescenta diariamente no meu desenvolvimento pessoal e profissional;
- Ao CA, meu orientador, que acreditou no meu potencial, você me mostrou que fazer ciência é possível e é um ato político também, obrigado por ser um modelo de educador e pesquisador;
- Ao laboratório 33 e 31, principalmente a Lily, Barbara e Jéssica, gostaria de poder mencionar todas as pessoas com quem eu trabalho e divido o dia-a-dia, mas infelizmente o espaço é pequeno para a quantidade de pessoas maravilhosas que me rodeiam, obrigado por tudo;
- Ao Germano e a Marina, falar de vocês é como falar de um pedaço de mim, representam o que há de mais puro e bonito sobre amizade, são a família que eu escolhi para estar por perto, amo muito vocês.

SUMÁRIO

1 RESUMO	7
2 ABSTRACT	8
3 LISTA DE ABREVIACÕES	9
4 INTRODUÇÃO	11
4.1 Sistema Nervoso Central	11
4.2 Astrócitos	12
4.3 Metabolismo Energético Astrocítico.....	12
4.4 Metabolismo Glutamatérgico	13
4.5 Proteína S100B	15
4.6 Fluorocitrato.....	17
4.7 Modelos Astrocíticos <i>in vitro</i> e Células Astrogliais C6	18
5 OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo Geral.....	20
5.2 Objetivos Específicos.....	20
6 METODOLOGIA	21
6.1 Materiais	21
6.2 Culturas Astrogliais C6	21
6.3 Tratamento	22
6.4 Ensaios de Viabilidade e Integridade Celular	22
6.4.1 Redução do MTT (<i>Brometo de Dimetiltiazoldifeniltetrazólio</i>)	22
6.4.2 Avaliação da Liberação da Lactato Desidrogenase (LDH)	22
6.5 Captação de Glicose.....	23
6.6 Liberação de Lactato	23
6.7 Captação de Glutamato.....	23
6.8 Atividade da Enzima Glutamina Sintetase	24
6.9 Conteúdo de Glutathiona Reduzida.....	25
6.10 Secreção de S100B.....	25
6.11 Dosagem de Proteína	26
6.12 Análise Estatística.....	26

7 RESULTADOS.....	27
7.1 Efeito do FC sob a viabilidade e integridade celular	27
7.2 FC causa prejuízo ao metabolismo energético	29
7.3 Alteração da secreção de lactato é dependente de tempo com o tratamento de FC	31
7.4 Alterações no metabolismo glutamatérgico via tratamento de FC	33
7.5 FC aumenta a secreção da proteína S100B e é dependente da concentração	35
8 DISCUSSÃO	37
9 CONCLUSÃO	48
10 PERSPECTIVAS.....	49
REFERÊNCIAS.....	51

1 RESUMO

Os astrócitos, células gliais mais abundantes do SNC, atuam como um componente ativo em funções cerebrais essenciais, tais como no metabolismo energético neuronal, dando suporte via lançadeira de lactato astrócito-neurônio (ANLS). Esse tipo celular é crucial na depuração do glutamato na fenda sináptica, reciclando-o através da glutamina sintetase (GS), sendo essa enzima um importante marcador astrocítico. Outro marcador muito utilizado é a proteína ligante de cálcio S100B, que é expressa e secretada principalmente por astrócitos. O fluorocitrato (FC) é um inibidor seletivo do metabolismo glial, principalmente em astrócitos, inibindo reversivelmente a enzima aconitase componente do ciclo de Krebs. Seus principais efeitos em astrócitos são alterações no metabolismo glutamatérgico e GABAérgico. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do FC sobre metabolismo (energético e glutamatérgico) e a secreção da proteína S100B, em células astrogliais C6, que são modelos amplamente usados de astrócitos. Para isso, cultivou-se as células em DMEM com 5% de SFB, as quais posteriormente foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com FC nas concentrações de 1, 10 e 100 μM por 1 e 24 horas sem a presença de SFB. O teste estatístico utilizado para análise de resultados foi a ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey com significância $p < 0,05$. Como resultados, nas concentrações utilizadas o FC não exerceu efeitos tóxicos que levariam à perda da viabilidade e integridade celular. O FC na concentração de 100 μM em 1 hora de tratamento promoveu alterações nas células astrogliais C6, como aumento da captação de glicose, captação de glutamato, aumento no conteúdo de GSH e aumento na secreção da proteína S100B em relação ao basal. Em 24 horas de tratamento houve diminuição na liberação de lactato (100 μM) e aumento na captação de glicose nas concentrações inferiores (1 e 10 μM de FC). Não foram observadas mudanças na atividade da enzima GS em 1 hora de tratamento. No presente estudo observou-se que o FC possui efeito sobre o metabolismo astrogliar, alterando parâmetros energéticos e glutamatérgicos, bem como sobre o marcador astrocítico, a S100B. Essas mudanças e respostas que o tratamento por FC causa elucidam o funcionamento astrogliar e também ressaltam as diferenças metabólicas entre células C6 e astrócitos. Esse trabalho é o primeiro a demonstrar a ação do FC em células astrogliais C6.

2 ABSTRACT

Astrocytes, the most abundant cells in CNS, are an active component in essential brain functions, such as in neuronal energetic metabolism, given support via astrocyte-neuron lactate shuttle. This cell type is crucial to glutamate clearance in synaptic cleft, recycling it through glutamine synthetase (GS) and this enzyme is an important astrocyte marker. Other marker commonly used is the calcium binding protein S100B, that is expressed and secreted mainly by astrocytes and plays important roles intra and extra cellularly in CNS. Fluorocitrate (FC) is a selective inhibitor of glial metabolism, mainly at astrocytes, reversibly inhibiting the aconitase enzyme, element of the citric acid cycle. FC main effects in astrocytes are alterations in glutamatergic and GABAergic metabolism. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effects of FC on metabolism (both energetic and glutamatergic) and the secretion of S100B protein in astroglial C6 cells, a widely used astrocyte model. For that, cells were cultivated in DMEM with 5% FBS and after seeded in 24 wells plate and then treated with FC (concentrations 1, 10 and 100 μM) for 1 and 24 hours without FBS. The statistics test used to analyze data was one-way ANOVA followed by Tukey post-test with significance $p < 0.05$. Results shown, with the concentrations used here, that FC did not exert toxic effects once we have not seen loss of cell viability and integrity. FC 100 μM at 1-hour treatment caused responses in astroglial c6 cells, such as the increase in glucose and glutamate uptake, GSH content and S100B secretion in comparison to the basal group. At 24 hours treatment, it was observed a decrease in extracellular lactate release (100 μM) and an increase in glucose uptake at lowers concentrations (1 and 10 μM). We have not observed changes in the activity of GS enzyme at 1-hour treatment. In the present study we observed the effects of FC on astroglial metabolism, evidenced by energetics and glutamatergics alterations, as well as on the astrocyte protein S100B. These changes and responses caused by FC treatment help to elucidate astroglial functions and points some differences between C6 cells and astrocytes. This work is the first to demonstrate the action of FC in astroglial C6 cells.

3 LISTA DE ABREVIACÕES

ANLS	Lançadeira de Lactato Astrócito-Neurônio
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSO	Butiona Sulfoximina
AMP _c	Monofosfato Cíclico de Adenosina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EAAT	Transportador de Aminoácido Excitatórios
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK	Cinases Reguladas Por Sinal Extracelular
FC	Fluorocitrato
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GCL	Glutamato Cisteína-ligase
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Gliat
GLUT	Transportador de Glicose
GS	Glutamina Sintetase
GSH	Glutationa Reduzida
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks
HCAR1	Receptor de Ácido Hidrocarboxílico 1
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipolissacarídeo
MCT	Transportador de Monocarboxilatos
MTT	Brometo de Dimetiltiazoldifeniltetrazólio
NO	Óxido Nitrico
OPD	O-fenilenediamina
OPT	O-ftaldeído
PI-3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase

PKC	Proteína Cinase C
RAGE	Receptor Para Produtos De Glicação Avançada
SEM	Erro Padrão da Média
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

4 INTRODUÇÃO

4.1 Sistema Nervoso Central

O cérebro é um órgão muito pequeno em comparação ao resto do corpo humano (cerca de 2% do peso corporal), porém representa 25% do consumo de glicose ¹, de forma a atuar na manutenção das funções do sistema nervoso central (SNC). Em algumas situações como jejum, exercício físico intenso e no desenvolvimento do SNC, ele faz uso de outros substratos energéticos como os corpos cetônicos. O trifostato de adenosina (ATP) é a molécula energética resultante da respiração oxidativa necessária para a sobrevivência celular, por isso há necessidade de um controle severo e preciso do metabolismo energético para manutenção do SNC, sendo que qualquer mudança na sua regulação pode levar a inúmeros distúrbios cerebrais ².

O SNC é composto por diferentes tipos celulares, incluindo neurônios e células gliais (astrócitos, micróglia e oligodendrócitos). Os neurônios foram por muito tempo considerados os principais tipos celulares responsáveis pelo processamento da informação, enquanto que as células gliais eram apenas reconhecidas pelo seu papel de suporte no SNC ³. Observou-se nas últimas décadas que as células da glia, principalmente os astrócitos, não atuam apenas como um elemento de suporte, mas como um elemento ativo em funções importantíssimas para o funcionamento cerebral. Esses dois tipos de células trabalham em conjunto para garantir a aquisição, processamento e armazenamento de informação, permitindo a manutenção de um processo sináptico eficiente, rápido e preciso ⁴⁻⁶.

4.2 Astrócitos

Os astrócitos, células gliais mais abundantes e altamente distribuídas no SNC, possuem uma relação intrínseca com os neurônios, por estarem dispostos em uma rede de processos interpostos. Atuam no desenvolvimento e funções do SNC; na sinaptogênese; na homeostase iônica do meio extracelular e microcirculação cerebral; na modulação da sinalização sináptica, além de possuírem um papel essencial no suporte metabólico dos neurônios^{7,8}. Sua função no metabolismo energético neuronal está correlacionada ao fato de serem um dos constituintes da barreira hematoencefálica (BHE), assim atuam no transporte fisiológico de glicose, captando-a dos vasos capilares, e no seu controle homeostático para o SNC. Resumidamente, quando a demanda de ATP está alta, os astrócitos aumentam a oferta de nutrientes e oxigênio pela sua ação na modulação do fluxo sanguíneo⁹⁻¹¹. Especificamente no SNC, os astrócitos são os principais reservatórios de glicogênio e ainda fornecem substrato energético em forma de lactato e piruvato para os neurônios^{12,13}. Além disso, atuam também na regulação e manutenção da BHE, restringindo a entrada e saída de moléculas¹⁴.

4.3 Metabolismo Energético Astrocítico

O conteúdo captado de glicose em neurônios e astrócitos é similar, porém os destinos são diferentes. Em neurônios, grande parte da glicose é destinada à via das pentoses, para atender as vias biosintéticas e os requisitos dos antioxidantes^{15,16}. Dessa forma os astrócitos atendem um suporte energético para os neurônios via produção de lactato, sendo essa hipótese conhecida com a lançadeira de lactato astrócito-neurônio (ANLS), que consiste na captação de glicose a partir circulação sanguínea, formação de lactato e transporte para os neurônios¹⁷. A formação de

lactato em astrócitos ocorre através de uma relação indireta a captação de glutamato, porque através dessa função há uma estimulação na bomba $\text{Na}^{+2}/\text{K}^{+}$ -ATPase, que é ativada para manter o gradiente iônico. Por sua vez, o gasto de ATP pela bomba acaba causando o aumento do fluxo glicolítico e conseqüentemente aumentando a produção de lactato. Este, posteriormente, é captado pelos neurônios via transportadores de monocarboxilatos (MCT), onde será utilizado como substrato aeróbico para formação de energia necessária em condições específicas ^{18,19}.

O transporte da glicose é mediado pela família de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs). No SNC, os principais tipos de transportadores expressos nas células são os GLUT1, presentes na BHE e nas células gliais, e o GLUT3 majoritariamente encontrado nos neurônios. O GLUT1 é abundante nas células endoteliais, nos pés astrocíticos associados aos vasos sanguíneos e em pequenos processos astrocíticos encontrados entre os elementos neuronais ¹³.

4.4 Metabolismo Glutamatérgico

Além das diversas funções descritas, os astrócitos possuem papéis específicos, como o tamponamento do potássio, captação e conversão do glutamato em glutamina, defesa antioxidante, homeostase do cálcio. ³. Os astrócitos liberam diversas moléculas conhecidas como gliotransmissores, como o ATP, Fator de Necrose Tumoral Alfa ($\text{TNF}\alpha$), prostaglandinas e diversas outras proteínas e peptídeos, influenciando a fisiologia neuronal e sináptica do SNC. Também é conhecido que os astrócitos liberam como gliotransmissores o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA), mas o comportamento tradicional dessas células é fornecer glutamina para então gerar essas duas moléculas dentro dos corpos

neuronal para atuação como neurotransmissores, sendo que esse processo normalmente ocorre nas sinapses tripartites²⁰⁻²³.

A sinapse tripartite é composta por três elementos celulares: os neurônios pós e pré-sinápticos e os astrócitos, nesse mecanismo os astrócitos atuam regulando, a partir de diversas moléculas a sinapse²⁴. Em especial, nas sinapses do tipo glutamatérgicas, o neurônio pré-sináptico libera o neurotransmissor glutamato em vesículas para interagir com os receptores acoplados ao neurônio pós-sináptico. Posteriormente, os astrócitos captam o glutamato fazendo uma depuração da fenda sináptica através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs)^{24,25}. O glutamato é reciclado através de uma importante enzima, um marcador celular de astrócitos e responsável por algumas das funções próprias: a glutamina sintetase (GS). Ela sintetiza glutamina que é posteriormente devolvida para os neurônios para geração de glutamato, concluindo então o ciclo denominado de glutamato-glutamina. Dessa maneira impede que haja excitotoxicidade na fenda sináptica através do glutamato e, também, purifica o SNC do excesso de amônia²⁶⁻²⁸.

Além do ciclo glutamato-glutamina, o glutamato astrocitário é utilizado na síntese do tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH), que é uma molécula muito importante na proteção antioxidante do SNC atuando, por exemplo, através da redução do peróxido de hidrogênio e do óxido nítrico. A GSH é também formada pelos aminoácidos glicina e cisteína, e a síntese, nos astrócitos, ocorre através da ligação do glutamato com a cisteína pela ação da enzima glutamato cisteína ligase (GCL). Posteriormente, ocorre uma reação que liga a glicina à essa molécula intermediária catabolizada pela enzima GSH sintetase (GSS)^{8,29}.

Ademais, os astrócitos secretam GSH para o meio extracelular, onde a molécula é clivada pela enzima glutamil transpeptidase para produzir glutamato e

cisteinil-glicina, que posteriormente sofre a ação de outra enzima aminopeptidase gerando glicina e cisteína que será captada pelo neurônio através do EAAT3 e então ser utilizada para a síntese GSH para esse tipo celular. Ou seja, os neurônios necessitam dos aminoácidos precursores fornecidos pelos astrócitos para síntese de GSH, isso deve ao fato que os neurônios serem incapazes de usar a cistina oxidada do meio extracelular. Assim demonstrando a relevância da GSH astrocítica na neuroproteção^{30,31}.

4.5 Proteína S100B

Como visto, a enzima GS é um marcador astrocítico, contudo existem outros como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a S100B. A GFAP é o principal componente dos filamentos intermediários de astrócitos maduros, considerada um dos principais antígenos utilizados para a identificação e estudo do comportamento astrocitário^{27,32}.

A S100B, uma proteína ligante de cálcio, é expressa e secretada principalmente por astrócitos, exercendo diversos efeitos autócrinos e parácrinos sobre outras células do SNC³³⁻³⁵. Intracelularmente, a S100B interage e liga-se a inúmeras proteínas, como a proteína supressora tumoral P53, a proteína cinase C (PKC) e o fator anti-apoptótico Bcl-2³⁴. Regula a polimerização do citoesqueleto, inibindo a fosforilação da GFAP, agindo na modulação da plasticidade, metabolismo energético e proliferação celular dos astrócitos⁵.

O receptor para produtos de glicação avançada (RAGE), é um receptor multiligante que é expresso em diversas células (incluindo células no SNC), e está relacionado a inúmeros efeitos mediados pela ligação com a S100B³⁶ Essa interação da S100B com o RAGE mostrou-se ser importante pela transdução de sinais

intracelulares e através da ligação controla vários processos através de diversas vias de sinalização ^{37,38}. É observado também que o metabolismo da glicose está relacionado com esse mecanismo, visto que a S100B ao se ligar ao RAGE diminui a captação de glicose via ERK. Também a insulina influencia no mecanismo de secreção da S100B via Fosfoinosítido 3-quinase (PI-3K), aumentando-a, o que elucida diversos quadros de modificação da secreção da S100B, expressão de RAGE e aumento ou diminuição da sensibilidade à insulina, como por exemplo na doença de Alzheimer, cetose e uso de antipsicóticos ³⁹⁻⁴¹.

Em estudos com cultura celular, é visto que essa proteína possui propriedades tróficas e neurotóxicas de acordo com sua concentração. Em níveis nanomolares, a S100B apresenta efeito positivo na sobrevivência de neurônios e atua facilitando o crescimento de neuritos. Entretanto, em concentrações micromolares, o efeito que ela apresenta é neurotóxico, pois a S100B estimula a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como por exemplo a interleucina 1 β (IL-1 β), TNF α e a interleucina 6 (IL-6). Além disso, também auxilia na produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), podendo-se considerá-la extracelularmente uma proteína potencialmente envolvida na comunicação entre neurônio e glia ^{5,34}.

Foi evidenciado que a S100B está relacionada a processos neuroinflamatórios, visto que em trabalhos anteriores (tanto em cultura primária de astrócitos, células astrogliais C6 e fatias hipocâmpais) essa proteína pode ser estimulada pela IL-1 β via cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) ⁴². Além disso, em modelos *in vitro* e *in vivo* de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias gram negativas, podem estimular a secreção da proteína S100B ⁴³. Também é visto que o conteúdo extracelular de S100B pode ser utilizado

como um marcador molecular útil em situações de dano encefálico crônico ou agudo, condições de neurodegeneração e outras doenças que acometem o SNC ^{5,44}.

4.6 Fluorocitrato

O fluorocitrato (FC) começou a ser estudado no início da década de 1960, quando se descobriu que a sua molécula precursora, fluoroacetato, podia ser convertida endogenamente para o FC e conseqüentemente inibir a ação da enzima aconitase que catalisa a reação de citrato para isocitrato no ciclo de Krebs ^{45,46}. O fluoroacetato é um composto originário de algumas plantas sul-africanas do gênero *Dichapetalum*, essa molécula foi utilizada para elaboração do anticancerígeno 5-fluoroacil (Acrucil®), que possui efeitos adversos neurológicos. A formação de FC a partir de fluoroacetato no interior celular ocorre quando esse composto é convertido a fluoroacetil-CoA pela ação da enzima acetato tiocinase. Esse segundo composto posteriormente reagirá e ligará com o oxaloacetato na presença da enzima citrato sintetase resultando no FC, que se ligará fortemente (mas não covalentemente) na aconitase inibindo o seu funcionamento, sendo essa reação análoga à formação de citrato a partir de acetato ⁴⁷.

A inibição seletiva de astrócitos por intermédio do FC ou do fluoroacetato é devido à maior capacidade deste tipo celular em captar acetato e citrato e incorporar esses compostos ao metabolismo, principalmente relacionado ao metabolismo glutamatérgico e GABAérgico astrocítico ⁴⁸. Esses dois compostos inibitórios foram utilizados tanto em estudos *in vivo* quanto em *in vitro*. Quando administrado via cirurgia intracerebroventricular (ICV), o FC causou mudanças morfológicas e também fisiológicas, como por exemplo a diminuição expressiva de glutamina e GSH e diminuição mais tênue de glutamato, aspartato e GABA ⁴⁹. Fatias hipocampais

tratadas com FC mostram alterações similares no metabolismo glutamatérgico ⁵⁰. Resultados similares também são vistos em cultura primária de astrócitos, mostrando uma redução no metabolismo glutamatérgico, porém mesmo com o ciclo de Krebs inibido via FC, não ocorreu mudanças no conteúdo de ATP, sugerindo que os astrócitos, mesmo sem produzir ATP oxidativamente, conseguem sobreviver e ser funcionais ⁵¹.

4.7 Modelos Astrocíticos *in vitro* e Células Astrogliais C6

O uso da cultura primária de astrócitos auxiliou no desenvolvimento de diversos estudos para compreensão de mecanismos próprios desse tipo celular, como sinalização de cálcio, liberação e captação de gliotransmissores e mudanças bioquímicas e morfológicas próprias. Assim como desenvolvimento de drogas utilizadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, sendo assim um excelente modelo para estudar os astrócitos em um sistema isolado. Porém, o processo de isolamento e cultivo dessa é trabalhoso e de alto custo, o que proporcionou alternativas para o estudo de culturas de astrócitos ⁵².

Uma alternativa utilizada é a linhagem de astrócitos imortalizados, que são uma cultura que sofreu mudanças genéticas para possuírem alta capacidade proliferativa. Ao contrário da cultura primária de astrócitos, essa linhagem possui características mais homogêneas e mais rápidas e fáceis de manipular, além de poderem ser estocadas e congeladas para usos futuros ⁵².

Outro modelo disponível para estudo dos astrócitos são as células astrogliais C6, que são abrangentemente utilizadas e uma alternativa para estudos *in vitro*. Essa linhagem celular foi isolada de um glioma murino e em altas passagens (acima de 100) apresenta uma alta expressão de marcadores de astrócitos ⁵³. Porém, mesmo

com algumas limitações, esse tipo celular possui parâmetros muito semelhantes a astrócitos, como a expressão das proteínas GFAP e S100B, da enzima GS e dos transportadores de glutamato, a produção de GSH e captação de glutamato ⁵⁵⁻⁵⁸. Outra particularidade das células astrogliais C6 é que elas expressam principalmente GLUT1, ao contrário dos tumores astrocíticos humanos que expressam GLUT3 predominantemente, sendo semelhante aos astrócitos ⁵⁹.

Apesar de serem modelos alternativos para o estudo *in vitro* de astrócitos amplamente utilizados, a linhagem de astrócitos imortalizados e a linhagem de células astrogliais C6 possuem suas limitações, como por exemplo a expressão dos marcadores GFAP e S100B estarem diminuídas nesses dois tipos celulares quando comparados com cultura primária de astrócitos ⁵². Outra diferença evidenciada, é o metabolismo glutamatérgico nessas linhagens, que se comporta diferente de astrócitos de uma cultura primária, tendo em vista que a atividade da GS é mais baixa e o conteúdo de glutamato acaba sendo direcionado para a síntese de GSH, devido, provavelmente, ao seu perfil mais proliferativo ⁵².

Visando o efeito seletivo do FC em células gliais e as alterações que esse ocasiona no metabolismo astrocítico, além da carência de dados sobre a influência desse composto em parâmetros específicos e particulares de astrócitos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do FC em cultura astrogliar C6 e as alterações decorrentes em marcadores e funções específicas de astrócitos, tendo em vista as diferenças morfológicas e fisiológicas que essa linhagem possui.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do fluorocitrato sobre a via glicolítica e parâmetros bioquímicos em culturas de células astrogliais C6.

5.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma curva de concentração e tempo de incubação com fluorocitrato sobre a viabilidade e integridade celular;
- Avaliar o efeito do fluorocitrato sobre a captação de glicose;
- Avaliar a secreção de lactato sob o efeito do fluorocitrato;
- Avaliar a funcionalidade do metabolismo glutamatérgico utilizando como parâmetros a captação de glutamato, atividade da enzima GS e o conteúdo de GSH;
- Avaliar o efeito do fluorocitrato sobre a secreção da proteína S100B.

6 METODOLOGIA

6.1 Materiais

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e outros materiais para cultura de células foram adquiridos da Gibco (California, USA). Fluorocitrato (FC), anticorpo anti-S100B monoclonal (SH-B1), glutationa reduzida, o-ftalaldeído (OPT), o-fenilenediamina (OPD) e brometo de Dimetiltiazoldifeniltetrazólio (MTT) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA). Anti-S100B policlonal e anti-rabbit peroxidase foram adquiridos da DAKO (São Paulo, Brasil) e GE (Little Chalfont, Reino Unido), respectivamente. [2,3³H] Glutamato e D-[3-³H] glicose foram adquiridos da Amersham International (UK) e Perkin-Elmer (Boston, MA, USA) respectivamente. Kit para atividade da lactato desidrogenase (LDH) e dosagem de lactato extracelular foram adquiridos da Bioclin, (Belo Horizonte, Brasil).

6.2 Culturas Astrogliais C6

As células foram obtidas do American Type Culture Collection (Rockville, MA, USA) e cultivadas como descrito anteriormente.^{39,40,60,61} As células de passagem altas (posteriores a 100 passagens) foram semeadas e cultivadas em frasco com DMEM (pH 7,4) contendo 5% de soro fetal bovino, 0,1% de anfotericina B e 0,032% de gentamicina. As células foram mantidas em estufa com temperatura constante de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Quando atingiam a confluência, as células eram descoladas dos frascos utilizando 0,05% de tripsina com EDTA e semeadas (5x10³ células/cm²) em placas de 24 poços. As células em placas foram mantidas nas condições por 3 dias ou até atingirem a confluência.

6.3 Tratamento

Após as células atingirem a confluência foi retirado o meio de cultivo e substituído por DMEM sem soro com ou sem a presença de fluorocitrato (1, 10 e 100 μM) por 1 hora ou 24 horas de tratamento.^{62,63} O fluorocitrato foi diluído em ácido clorídrico 50 mM que foi utilizado como controle nas demais técnicas.

6.4 Ensaio de Viabilidade e Integridade Celular

6.4.1 Redução do MTT (Brometo de Dimetiltiazoldifeniltetrazólio)

As células, após o término dos tratamentos, foram incubadas com MTT (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos em estufa a 5% CO_2 e 37°C. Subsequentemente, o meio foi removido e os cristais de MTT foram dissolvidos com DMSO 100%. Os valores de absorvância foram medidos a 560 e 650 nm e o cálculo foi realizado pela subtração dos valores de absorvância, posteriormente expressados como porcentagem do controle.⁶⁰

6.4.2 Avaliação da Liberação da Lactato Desidrogenase (LDH)

Para avaliar a quantidade da enzima LDH no meio extracelular, foi coletado uma alíquota de 150 μL avaliado através de um ensaio comercial de UV (BIOCLIN), seguindo as indicações do fabricante e os resultados foram expressos como porcentagem do controle.⁶⁰

6.5 Captação de Glicose

Foi realizada como descrita anteriormente ¹⁷, com algumas modificações. Então, resumidamente, as células C6 foram incubadas a 35 °C em Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS). O ensaio foi iniciado com a adição de 0,1 µCi/poço de D-[3-³H] deoxy-glicose durante 15 minutos e a reação foi parada após esse tempo com lavagem de HBSS gelado por 3 vezes. As células foram lisadas com uma solução de NaOH 0,5M e a leitura foi realizada em Cintilador. A captação foi calculada subtraindo a captação inespecífica (obtida na presença de citocalasina B 25 µM – inibidor inespecífico do transportador de glicose) a partir da captação total, sendo os valores corrigidos por quantidades de proteínas totais. O material radioativo é adquirido pelo Professor Diogo Onofre Souza tem autorização do CNEN (Nº AP0107) para aquisição e uso do material. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

6.6 Liberação de Lactato

Para avaliar a quantidade de secreção de lactato no meio extracelular foi coletado uma alíquota de 100 µL e avaliada através de um ensaio comercial (BIOCLIN), seguindo as indicações do fabricante e o resultado foi expressos como porcentagem do controle.

6.7 Captação de Glutamato

Foi realizada como descrita anteriormente ⁶⁴. As células C6 foram incubadas a 37°C em solução salina equilibrada de Hanks (HBSS). O ensaio foi iniciado pela

adição de 0,1 mM de L-glutamato e 0,33 $\mu\text{Ci/mL}$ de L-[2,3- ^3H] glutamato. A incubação foi parada após 10 min pela remoção do meio e lavagem das células três vezes com HBSS gelado. As células foram lisadas em uma solução 0,5 M de NaOH. A captação foi calculada subtraindo a captação inespecífica (obtida na ausência de sódio – necessário para o funcionamento do transportador de glutamato) a partir da captação total, sendo os valores corrigidos por quantidades de proteínas totais. O material radioativo é adquirido pelo Professor Diogo Onofre Souza tem autorização do CNEN (Nº AP0107) para aquisição e uso do material. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

6.8 Atividade da Enzima Glutamina Sintetase

As células foram lisadas em imidazol 50 mM e incubadas a 37°C em tampão A, contendo os substratos da enzima e seus cofatores (Tampão A: imidazol 50 mM, hidroxilamina 50 mM, L-glutamina 100 mM, arsenato de sódio 25 mM, ADP 0,2 mM e cloreto de manganês 2 mM). Após 15 minutos, a reação foi parada com tampão B (Tampão B: cloreto férrico 0,37 M, ácido tricloroacético 0,2 M e ácido clorídrico 0,67 M). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos a fim de separar as proteínas precipitadas e o sobrenadante foi lido a 530 nm em espectrofotômetro. Para a curva da GS, foram pesadas quantidades padrão de γ glutamil-hidroxamato em concentrações variando de 0,156 mM a 10 mM e adicionados a tampão A e tampão B para comparação com as amostras ⁶⁵. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

6.9 Conteúdo de Glutathiona Reduzida

As células foram lisadas em tampão fosfato contendo KCl (20 mM/140 mM) e, após, foi adicionado ácido metafosfórico (concentração final de 4,6 mg/mL). O homogeneizado foi então centrifugado 1000 x g por 10 minutos. As amostras e os pontos da curva foram pipetados em microplaca de 96 poços, contendo tampão GSH (fosfato de sódio monobásico 0,1 M e EDTA 0,005 M). Após, a placa foi incubada com OPT a 1 mg/mL, diluído em metanol por 15 minutos a temperatura ambiente. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 nm e 420 nm, respectivamente ⁶⁶. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

6.10 Secreção de S100B

A secreção da proteína S100B foi quantificada a partir do meio de extracelular através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) ⁶⁷. Resumidamente, 50 µL de amostra mais 50 µL de tampão Tris foram incubados por 2 horas numa placa de 96 poços, que foi anteriormente incubada com anticorpo monoclonal anti-S100B (SH-B1, Sigma). Após, foi incubado o anticorpo policlonal anti-S100B (DAKO) por 30 minutos e posteriormente com o anticorpo anti-rabbit ligado a peroxidase por mais 30 minutos. A reação colorimétrica é ocasionada pela adição de O-Fenilenodiamina (OPD) e quantificada no comprimento de onda 492 nm. Os valores da concentração foram calculados a partir da comparação da absorbância das amostras com a curva padrão utilizada para quantificação, que é composta por valores de 0,002 até 1 ng/mL da proteína S100B. Posteriormente os resultados foram convertidos e expressos como porcentagem do controle.

6.11 Dosagem de Proteína

O conteúdo de proteína nas amostras, necessário para a quantificação da captação de glicose, captação de glutamato, atividade da GS e conteúdo de GSH, foi avaliado pelo método de Lowry modificado por Peterson⁶⁸. Que consistiu na aplicação das amostras e da curva, seguido da aplicação o reagente de Lowry com incubação por 10 minutos, após a aplicação do reagente de Folin 0,33 N durante 30 minutos. A dosagem é quantificada no comprimento de onda de 750 nm.

6.12 Análise Estatística

Inicialmente foi realizada a análise estatística descritiva e a avaliação da normalidade dos dados. A partir dos resultados obtidos com o teste de normalidade foi utilizado teste comparativo para os tratamentos realizados. Os dados estão apresentados como média \pm S.E.M. Cada experimento foi realizado em triplicata a partir de pelo 6-8 experimentos independentes. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e seguido do pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o software Graphpad Prism versão 8 (La Jolla, CA, EUA). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Efeito do FC sob a viabilidade e integridade celular

Quando as células C6 foram tratadas com as concentrações de FC (1, 10 e 100 μM) não houve perda na viabilidade e integridade celular, visto que após 1 hora (Figura 1A, $p= 0,7214$ e $f_{(3, 20)}= 0,4481$, e 1C, $p= 0,8504$ e $f_{(3, 20)}= 0,2642$) e 24 horas de tratamento (Figura 1B, $p= 0,6305$ e $f_{(3, 20)}= 0,5872$, 1D, $p= 0,7965$ e $f_{(3, 12)}= 0,3405$), não causaram diminuição na porcentagem em comparação ao basal (linha que representa 100%) na avaliação liberação extracelular da LDH nem na redução do MTT, respectivamente. O tratamento realizado nas células C6 não causou danos que resultassem em morte celular, portanto todo o efeito observado nos resultados a seguir é devido ao tratamento de FC e não por mecanismos de apoptose ou necrose celular. Para a preparação da solução de FC, utilizou-se ácido clorídrico (HCl) 1 M como solvente. Desta maneira, devido ao baixo pH que poderia prejudicar a funcionalidade das células, todos os experimentos de viabilidade e integridade celular, assim como os outros resultados desse trabalho, foram comparados com um grupo controle veículo, que consistia em uma solução de HCl 50 mM, utilizada na solubilização de FC 100 μM . Esse grupo controle veículo não apresentou diferenças em comparação ao grupo basal, demonstrando que o uso de HCl não prejudicava as células e assim consequentemente os resultados (dados não mostrados).

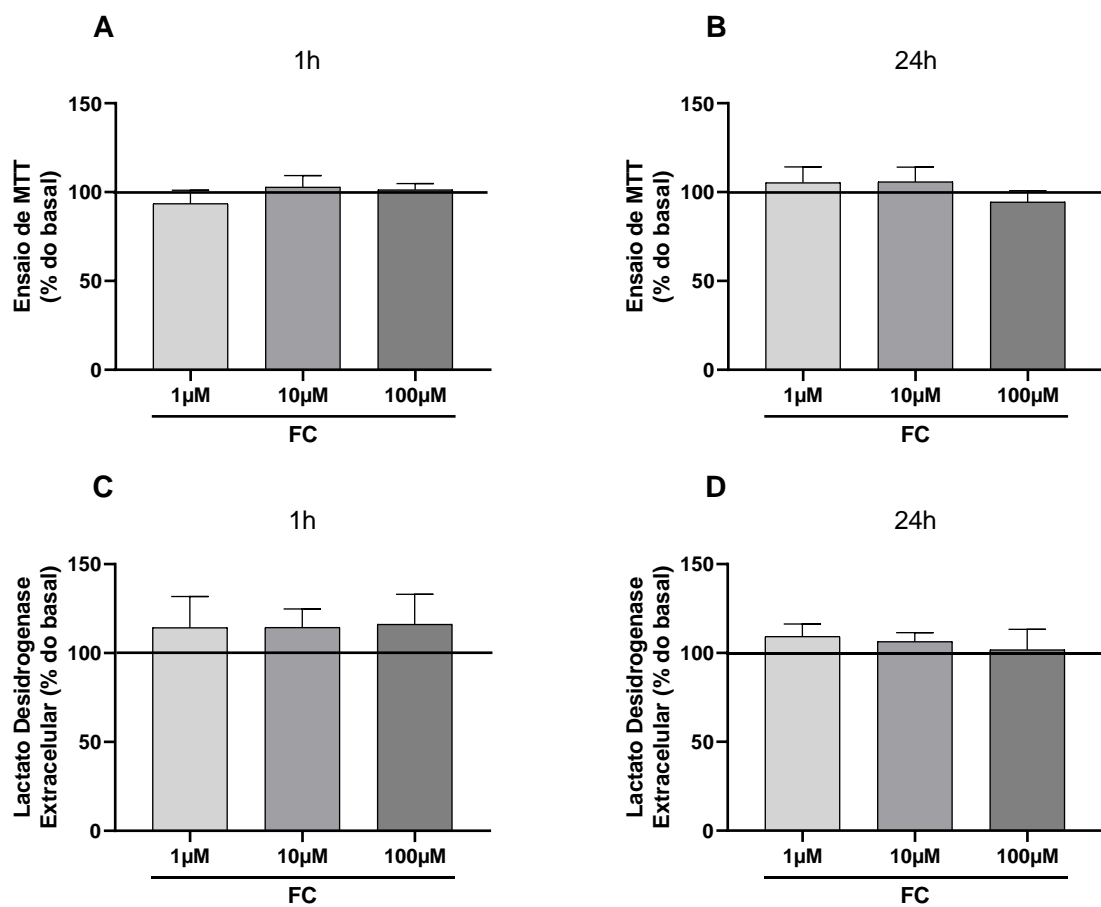


Figura 1: Teste de viabilidade e integridade celular. As células C6 foram tratadas com diversas concentrações de FC (1, 10 e 100 μM) em meio DMEM com a ausência de SFB. Ao final do tratamento avaliou-se a viabilidade celular por redução do MTT em 1 hora (A) e 24 horas (B) e a integridade celular pela avaliação da liberação extracelular da LDH em 1 hora (C) e 24 horas (D). Dados expressos em média da porcentagem em relação ao basal (\pm erro padrão) de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas. A linha representa o valor do basal (100%). Não houve diferença significativa em comparação ao basal pela ANOVA de uma via seguida por pós-teste de Tukey $P > 0,05$.

7.2 FC causa alterações ao metabolismo energético

A adição de FC durante de 1 hora de tratamento causou um aumento na captação de glicose na presença do tratamento 100 μM em comparação com o basal (Fig. 2A, $p= 0,0102$ e $f_{(3, 28)}= 4,551$). Quando tratadas por 24 horas nas mesmas condições, ocorreu um aumento na captação de glicose nas concentrações mais baixas (1 e 10 μM) e na concentração mais alta (100 μM) não mostrou diferença significativa em comparação ao basal, possivelmente por saturação do sistema (Fig. 2B, $p<0,0001$ e $f_{(3, 16)}= 14,85$).

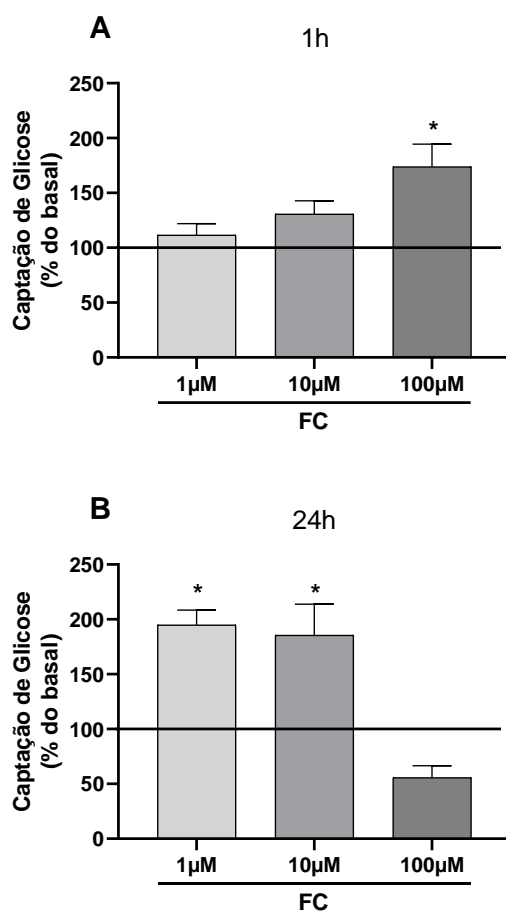


Figura 2: Captação de Glicose. As células C6 foram tratadas com diversas concentrações de FC (1, 10 e 100 μM) em meio DMEM com a ausência de SFB. Ao final do tratamento avaliou-se a quantidade de D-[3- ^3H] deoxy-glicose captadas pelas células em 1 hora (**A**) e 24 horas (**B**) de tratamento. Dados expressos em média da porcentagem (\pm erro padrão) de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas. A linha representa o valor do basal (100%). * Significativamente diferente do basal por ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Tukey $P < 0,05$.

7.3 Alteração da liberação de lactato é dependente de tempo com o tratamento de FC

Na tentativa de tentar entender as consequências do bloqueio do ciclo de Krebs ocasionado pelo FC nas células C6, avaliou-se liberação de lactato, observando que após 1 hora de tratamento não houve diferenças estatísticas (Fig. 3A, $p=0,1345$ e $f_{(3, 28)}=2,016$). Porém após 24 horas de tratamento houve uma diminuição da secreção de lactato na concentração de 100 μM de FC em comparação ao basal (Fig. 3B, $p=0,0011$ e $f_{(3, 12)}=10,47$).

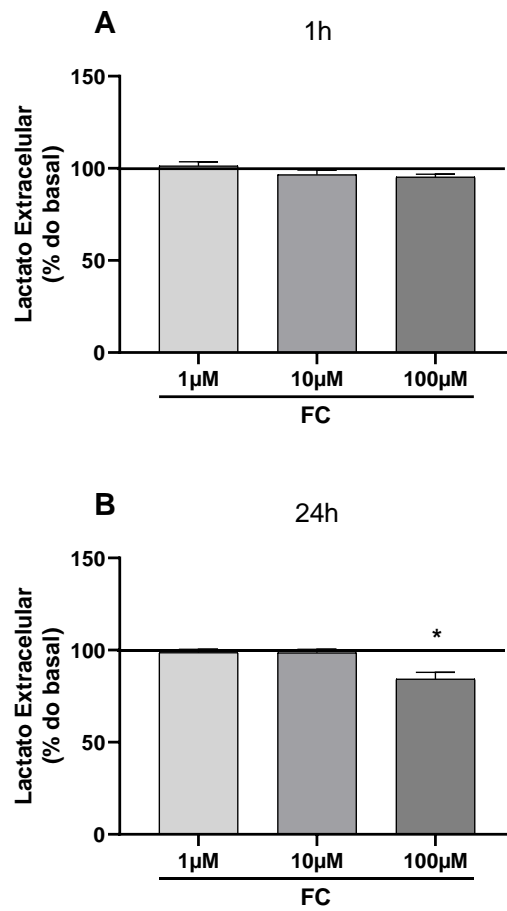


Figura 3: Secreção de lactato. As células C6 foram tratadas com diversas concentrações de FC (1, 10 e 100 μ M) em meio DMEM com a ausência de SFB. O meio extracelular (sobrenadante) foi coletado ao final do tratamento para avaliar a secreção de lactato após 1 hora (**A**) e 24 horas (**B**). Dados expressos em média da porcentagem (\pm erro padrão) de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas. A linha representa o valor do basal (100%). * Significativamente diferente do basal por ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Tukey para $P < 0,05$.

7.4 Alterações no metabolismo glutamatérgico via tratamento de FC

Para entender os efeitos ocasionados pelo FC no metabolismo glutamatérgico usou-se 3 parâmetros diferentes. Posteriormente a 1 hora de tratamento com as concentrações de FC notou-se um aumento significativo, em comparação ao basal, da captação de glutamato na concentração de 100 μM (Fig. 4A, $p= 0,0277$ e $f_{(3, 20)}= 3,742$). Visto esse aumento na captação, investigou-se as rotas do glutamato nos astrócitos que consiste na avaliação da atividade da enzima GS, onde os tratamentos não apresentaram diferenças significativas em comparação com o basal (Fig. 4B, $p= 0,8389$ e $f_{(3, 16)}= 0,2802$). E também se avaliou o conteúdo de GSH, outro destino do glutamato, e observou-se que houve aumento significativo do conteúdo na concentração de 100 μM em comparação ao basal (Fig. 4C, $p= 0,0534$ e $f_{(3, 20)}= 3,028$), corroborando com o aumento na mesma concentração na captação de glutamato.

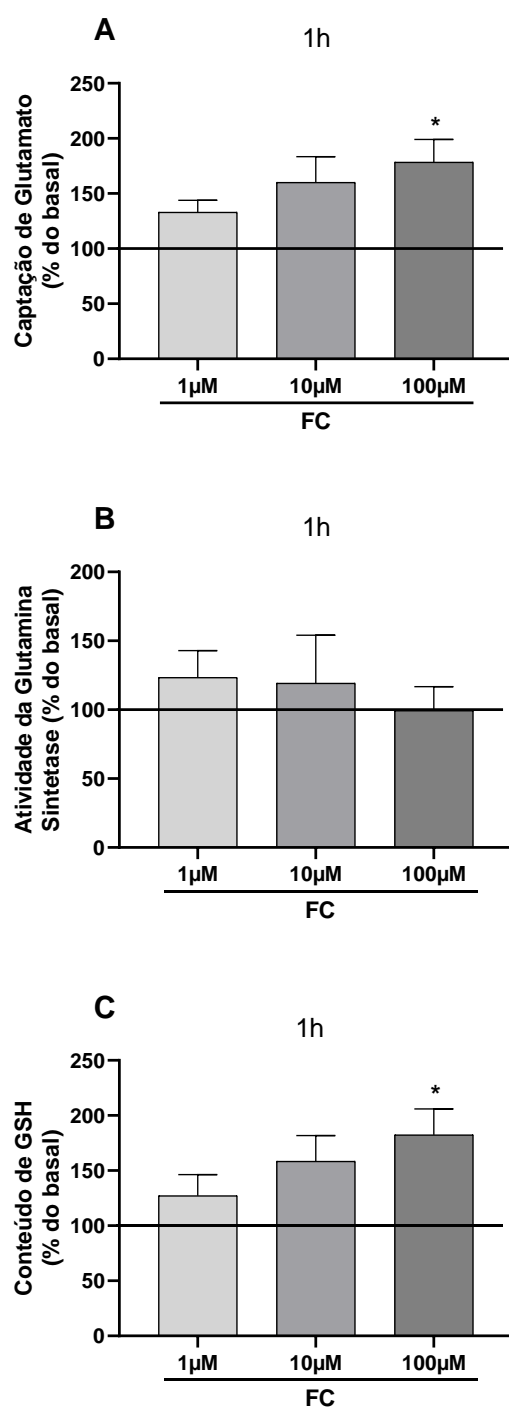


Figura 4: Metabolismo Glutamatérgico. Avaliação, após 1 hora de tratamento, a captação de glutamato (**A**), da atividade da enzima GS (**B**) e do conteúdo de GSH (**C**) utilizou-se células C6, após a confluência, tratadas com concentrações de FC (1, 10 e 100 μM). Dados expressos em média da porcentagem (\pm erro padrão) de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas. A linha representa o valor do basal (100%). * Significativamente diferente do basal por ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Tukey para $P < 0,05$.

7.5 FC aumenta a secreção da proteína S100B e é dependente da concentração

A secreção da proteína S100B aumenta dependendo da concentração de FC durante 1 hora de tratamento em cultura de células astrogliais C6, sendo a concentração mais baixa (1 μM) não possui diferença significativa com o grupo basal e a concentração maior (100 μM) é diferente significativamente do grupo basal (Fig. 5A, $p= 0,0002$ e $f_{(3, 57)}= 7,558$). Quando essas células são tratadas com as mesmas concentrações em um tempo de 24 horas, não apresenta as mesmas alterações observadas em 1 hora de tratamento, não apresentando diferença na secreção entre todas as concentrações de FC em relação ao basal (Fig. 5B, $p= 0,5958$ e $f_{(3, 36)}= 0,6374$).

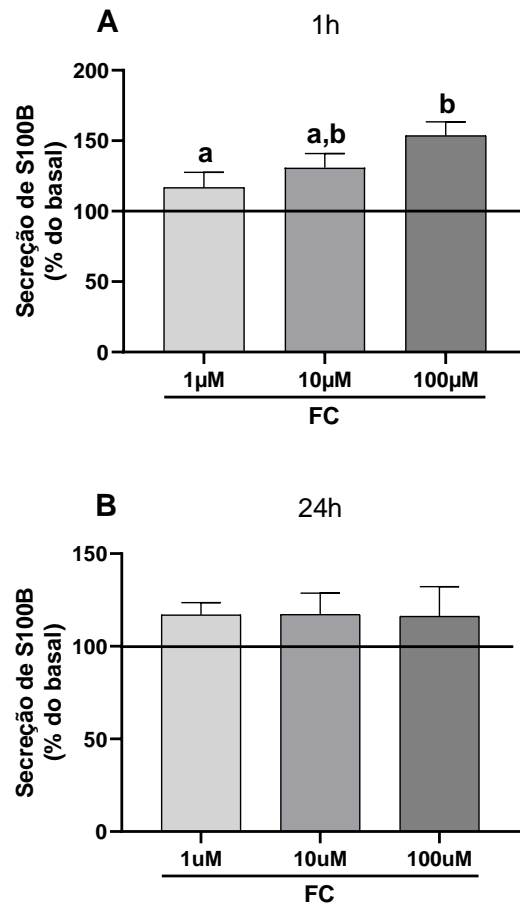


Figura 5: Secreção da proteína S100B. As células C6 foram submetidas a tratamento com FC nas concentrações 1, 10 e 100 μ M em meio DMEM sem SFB. O meio extracelular (sobrenadante) foi coletado no final do tratamento para avaliar a secreção de S100B após 1 hora (**A**) e 24 horas (**B**). Dados expressos em média da porcentagem (\pm erro padrão) de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas. A linha representa o valor do basal (100%). As letras indicam diferentes grupos estatísticos por ANOVA de uma via seguido por pós-teste de Tukey para $P < 0,05$.

8 DISCUSSÃO

Os astrócitos são células muito importantes para o SNC, trazendo um refinamento e complexidade ao tecido neural. É visto que a proporção de neurônios para astrócitos em córtex de roedores é 1:3 e em córtex humano é quase de 1:1⁶⁹. Inicialmente essas células foram divididas morfológicamente em astrócitos protoplasmáticos, localizados substância cinzenta, e fibrosos, localizados na substância branca. Porém atualmente, com o avanço e refinamento de técnicas, viu-se que essas células são muito mais heterogêneas que se imaginava⁷. Além de toda sua complexidade, heterogeneidade e suas capacidades fisiológicas, os astrócitos são células que respondem e reagem a diversos estímulos, incluindo a quadros danosos ao SNC, e essa resposta se dá dependendo do grau de intensidade e severidade. Esse espectro de reações é comumente chamado de astrogliose ou astrócitos reativos e nesse quadro há mudanças morfológicas e fisiológicas astrocíticas, sendo mudanças na proteína GFAP um principais indicadores disso⁷⁰.

Nas últimas décadas, o FC foi frequentemente utilizado no estudo de células gliais, principalmente os astrócitos. Devido ao seu potencial inibitório, diversos estudos o utilizaram na tentativa de mimetizar uma inativação astrocítica, com resultado para estudos fisiopatológicos. Como o FC age diretamente na enzima aconitase, ligando-se fortemente e interrompendo o ciclo de Krebs, muito se debateu sobre a ação inibitória na produção oxidativa de ATP astrocítica. Alguns dados mostraram que o FC não age diretamente no conteúdo de ATP, isso devido aos astrócitos possuírem uma resistência em períodos de baixa produção oxidativa. Porém a ação do FC no metabolismo GABAérgico e glutamatérgico é clara, e diversos

dados mostram que um dos efeitos principais do FC é na diminuição da atividade da GS, que necessita de ATP para o funcionamento, e leva conseqüentemente a uma diminuição na síntese de glutamato e GABA. *In vivo*, o FC é aplicado para inúmeros estudos com propósitos diferentes. Shang et al. (2015) mostraram ao infundir o FC no cérebro de ratos, que além de ocasionar danos cognitivos, aumentou a fosforilação da proteína tau ⁷¹. A inativação da reatividade astrocítica por FC também promoveu melhoras em modelos de depressão, isquemia e traumatismo cranioencefálico ⁷²⁻⁷⁴.

O presente estudo teve como principais achados os efeitos do FC em células astrogliais C6, não observados anteriormente na literatura, e principalmente elucidando as diferenças entre as células astrogliais C6 e os astrócitos. Então, visando compreender os efeitos e as mudanças celulares causadas pelo FC em si, utilizou-se uma curva de FC (1, 10 e 100 μM) e tratou-se células astrogliais C6 durante 1 e 24h. Para isso utilizou-se ensaios de viabilidade e integridade celular para avaliar se o tratamento com o FC causou danos às células astrogliais C6, que são a avaliação da liberação da LDH e a avaliação da redução do MTT. A LDH é uma enzima que catalisa a conversão de lactato para piruvato e está exclusivamente no interior celular, comumente utilizada como marcador tumoral, devido ao seu papel crucial no efeito de Warburg ⁷⁵. Por isso, a liberação dessa enzima no meio extracelular demonstra que há perda da integridade da membrana celular. O MTT é um composto que é endocitado e reduzido apenas em células vivas, acreditava-se que a redução desse composto era feita apenas no interior mitocondrial, porém atualmente sabe-se que o MTT tem afinidades com outras organelas, sendo possível a utilização desse ensaio para organismos não eurarióticos ⁷⁶. Desta forma, quanto maior a formação de cristais de formazana a partir da redução do MTT, maior a viabilidade celular. Sendo assim, quando as células astrogliais C6 foram submetidas ao tratamento por 1 e 24 horas

com a curva de FC (Fig. 1) não se observou nenhuma perda de integridade e viabilidade celular quando os grupos tratados são comparados com o grupo basal, nos dando o entendimento que os dados constatados e discutidos a seguir, são devido a alterações causadas na fisiologia das células astrogliais C6 e não por mecanismos apoptóticos ou necróticos dessas células.

O modelo astrocítico utilizado nesse estudo, as células astrogliais C6, é um modelo astrocitário amplamente utilizado principalmente em avaliações de regulação de crescimento celular, liberação de fatores tróficos e vias de transdução de sinais. Elas possuem diversas características em comum com os astrócitos, como os marcadores proteicos específicos: S100B, GFAP e a enzima GS. Além de realizar funções características como captação de glutamato e a síntese de GSH ^{55,77,78}.

As células astrogliais C6 tratadas na presença das diferentes concentrações de FC apresentaram um aumento na captação de glicose (Fig. 2). Em 1 hora de tratamento, a concentração de 100 μM de FC aumentou significativamente a captação de glicose quando comparada ao grupo basal (Fig. 2A), porém analisando os dados nota-se que esse aumento é dependente de concentração e tempo de exposição ao tratamento. Ao tratar as células nas mesmas condições, porém em 24 horas, houve um aumento significativo na captação nas concentrações inferiores (1 e 10 μM), que anteriormente não haviam mostrado diferenças estatísticas. A concentração de 100 μM de FC não mostrou o mesmo aumento evidenciado em 1 hora, provavelmente por haver uma saturação do sistema (Fig. 2B).

Acredita-se que como o FC age inibindo a aconitase e conseqüentemente o ciclo de Krebs, os tratamentos tenham causado uma desregulação na síntese energética astrocítica e subsequente uma diminuição na produção de ATP. Isso leva a um aumento na captação de glicose numa provável tentativa de as células manterem

a homeostase energética, e Hirose et al (2007) corroboram com este achado, pois também mostraram um aumento na captação da glicose na presença de FC ⁷⁹. Porém alguns grupos contradizem esse comportamento, mostrando que o FC atua na diminuição do metabolismo energético ^{63,80}. É importante considerar que diferentes técnicas em diferentes tipos celulares foram aplicadas para a obtenção desses dados. Sabe-se que as células astrogliais C6 possuem maior capacidade de captar glicose quando comparadas com cultura primária de astrócitos, isso se deve provavelmente a essa linhagem ser inicialmente isolada de um glioma, que são células que possuem uma alta capacidade proliferativa e um metabolismo mais acelerado ⁸¹.

Como visto, os astrócitos têm papel central no metabolismo energético no SNC, além de ser o principal reservatório de glicogênio, eles estão inseridos na hipótese da ANLS, onde eles produzem substrato energético, em forma de lactato, e transportam para os neurônios onde este é oxidado para a geração de ATP ^{19,82}. Portanto decidiu-se avaliar o conteúdo de lactato extracelular sob os tratamentos de diferentes concentrações de FC. Quando submetidas a 1 hora de tratamento, as células astrogliais C6 tratadas com FC não apresentam nenhuma mudança estatísticas quando comparadas ao grupo basal (Fig. 3A). Entretanto em 24 horas de tratamento, houve uma diminuição do conteúdo de lactato extracelular no tratamento de 100 μM (Fig. 3B), nos levando à hipótese de que após a inibição do ciclo de Krebs, as células utilizem a glicose para outras vias, como por exemplo a via das pentoses, diminuindo assim a produção a longo prazo de lactato e conseqüentemente diminuindo a liberação desse metabólito para o meio extracelular. Porém em dados não publicados do nosso grupo, observou-se um aumento do conteúdo extracelular de lactato em fatias hipocâmpais agudas tratadas com 100 μM de FC. A falta de dados comparativos e a diferença entre as amostras utilizadas para a metodologia, nos dá respostas

inconclusivas. A utilização de lactato para sobrevivência das células astrogliais C6 é provavelmente fundamental, visto que, mesmo sendo um modelo astrocítico, essa linhagem celular ainda possui características de um glioma (alta taxa de crescimento e proliferação), Bouzier et al (1998) corroboram com esse fato, onde mostraram a preferência pela utilização de lactato a glicose para o metabolismo oxidativo em células astrogliais C6 ⁸⁴. Entendendo a importância do lactato no metabolismo energético e a mudança ocasionada pelo efeito do fluorocitrato são necessários mais experimentos para investigar e compreender as razões e vias envolvidas nesse processo.

Para a fisiologia dos astrócitos, o glutamato é um componente importantíssimo, visto que ele é substrato para a síntese de dois compostos com diferentes mecanismos e processos celulares. Primeiramente o glutamato está inserido no ciclo glutamato-glutamina, onde os astrócitos presentes em sinapses tripartites, captam o excedente das neurotransmissões glutamatérgicas, depurando a fenda sináptica ²⁷. No interior celular ele sofre ação enzimática da GS sendo convertido em glutamina, que posteriormente é enviada para os neurônios para síntese de novos neurotransmissores ²⁸. Outra rota que o glutamato pode ser utilizado é na síntese da GSH, um composto fundamental para a ação antioxidante no SNC ³¹.

Berg-Johnsen (1993) constatou que o FC age reduzindo a transmissão de sinapses excitatórias, procedido por mudanças no conteúdo de aminoácidos no hipocampo ⁸⁵. Essa mudança é estabelecida pela redução da atividade da enzima GS, que produz glutamina. Conforme é conhecido, a GS necessita de ATP para o seu funcionamento, então um dos efeitos iniciais do FC no metabolismo astrocítico é interromper o funcionamento dessa enzima ⁴⁵. Com isso, avaliou-se o metabolismo glutamatérgico em 3 diferentes técnicas: captação de glutamato, atividade enzimática

da GS e conteúdo intracelular de GSH. Após a 1 hora de tratamento com as concentrações de FC observou-se um aumento na captação de glutamato e no conteúdo de GSH na concentração de 100 μ M (Fig. 4A e 4C) de FC e na atividade da GS não houve diferenças comparadas ao grupo basal (Fig. 4B).

O resultado constatado na avaliação da atividade da GS é contraditório ao que foi evidenciado na literatura, porém duas hipóteses podem esclarecer essa informação. Antes de tudo, o tempo de tratamento utilizado para avaliação foi de 1 hora, o que nos leva a inferir que ação aguda e rápida do FC não gerou mudanças na enzima GS, desta forma, um tempo maior de exposição ao composto talvez poderia ocasionar mudanças nesse parâmetro. Contudo, recentemente foi evidenciado que o metabolismo glutamatérgico é diminuído em células astrogliais C6, visto que a captação de glutamato e a atividade da GS é reduzida nesse tipo celular quando comparado a astrócitos primários. Todavia, foi observado que o FC age aumentando a captação de glutamato e o conteúdo de GSH em células astrogliais C6, ou seja, acreditamos que o conteúdo captado de glutamato está sendo direcionado para a síntese de GSH. Essa informação condiz com o comportamento proliferativo do tipo celular utilizado nesse estudo, onde a alta produção de GSH pode beneficiar células de glioma contra um alto metabolismo oxidativo, porém mais experimentos são necessários para elucidar este questionamento ^{52,86}.

Como já descrito anteriormente, a proteína S100B pertencente à família das proteínas ligantes de cálcio e é um dos principais marcadores astrogliais, sendo produzida e secretada majoritariamente por astrócitos, porém o mecanismo de secreção ainda não está claro ^{34,87}. A proteína S100B também está relacionada com o metabolismo da glicose, visto que em concentrações fisiológicas a S100B é capaz de reduzir a captação de glicose enquanto que a insulina pode promover o aumento

da secreção dessa proteína. Efeitos que são mediados via receptor RAGE-MAPK/ERK e via sinalização PI3K, respectivamente ³⁹. Anteriormente também foi evidenciado que alta concentração de glicose pode estimular o aumento da secreção de S100B e da captação da glutamato em células astrogliais C6, e nesse mesmo trabalho também foi constatado uma conexão entre a secreção de S100B e a captação de glutamato, visto que ao tratar esse mesmo tipo celular com concentrações extracelulares de S100B houve também um aumento na captação de glutamato ⁶¹.

Em um trabalho recente do nosso grupo, foi demonstrado um efeito direto do FC na secreção de S100B, onde fatias hipocampais agudas foram tratadas com 100 μ M de FC e resultou em uma diminuição da secreção da S100B ⁸⁸. A teoria envolvida nesse processo está vinculada a um aumento na formação e liberação de lactato para o meio extracelular devida à ação do FC, e o lactato estaria se ligando ao receptor de ácido hidrocaborxílico 1 (HCAR1). Esse receptor foi previamente descrito em tecido adiposo na inibição da lipólise, ele possui uma proteína G inibitória acoplada que tem como a principal função inibir a adenilil ciclase e conseqüentemente a produção de Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPC) ⁸⁹. Sabe-se que diminuições no AMPC podem conseqüentemente diminuir a secreção da proteína S100B, então o lactato ligando-se ao HCAR1 poderia estar influenciando nessa diminuição da secreção ³⁴ (Fig. 6). Outro estudo em fatias hipocampais agudas mostrou a mesma diminuição na secreção da proteína S100B quando tratadas com 100 μ M de FC e esse quadro foi revertido quando as fatias foram co-tratadas com bicuculina, um antagonista do receptor GABA_A. Este resultado provavelmente corresponde a uma mudança no metabolismo da glicose mediada por esse antagonista ⁹⁰.

Fatias Hipocampais Agudas

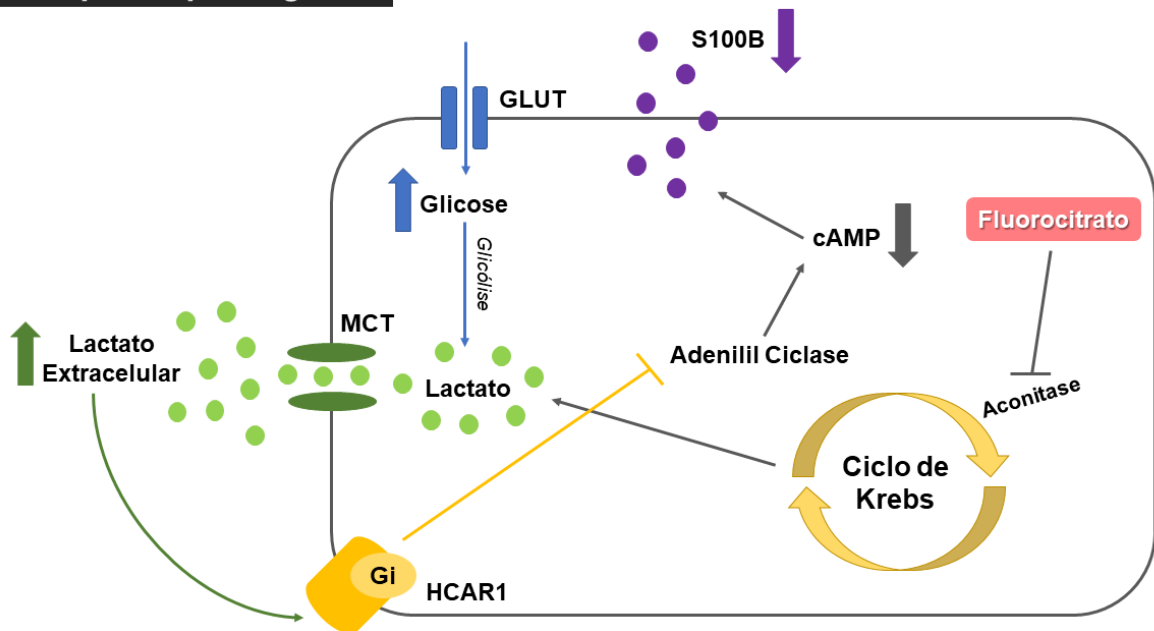


Figura 6: Efeito do fluorocitrato em fatias hipocâmpicas agudas. O fluorocitrato inibe a ação da enzima aconitase, interrompendo o funcionamento do ciclo de Krebs. Levando a um aumento da captação de glicose, que é transportada pelos GLUTs. Devido ao bloqueio do ciclo de Krebs, há um aumento da formação de lactato pela glicólise, esse substrato energético em excesso é liberado para o meio extracelular. O conteúdo elevado de lactato no exterior celular interage com o receptor HCAR1 acoplado a uma proteína G inibitória. Esse receptor age diretamente na enzima adenilil ciclase, inibindo-a, e assim diminuindo a produção de cAMP. A diminuição dessa molécula leva a diminuição da secreção da proteína S100B.

Tendo isso em vista, avaliou-se também o efeito do FC sobre a secreção da proteína S100B em células astrogliais C6, nas mesmas concentrações e tempos. Foram submetidas a curva de concentrações pelos períodos de 1 hora e 24 horas. Notou-se que houve um aumento na secreção da S100B em 1 hora na concentração de 100 μM (Fig. 5A). Entretanto em 24 horas de tratamento não houve mudanças na secreção dessa proteína em comparação ao basal (Fig. 5B). Concluindo que o FC tem um efeito agudo sobre o perfil secretor dessa proteína nas células astrogliais C6, no entanto, novamente resultados contrários são observados, conduzindo a uma discussão sobre os comportamentos celulares distintos entre as células astrogliais C6

e o astrócitos em si. Pertinentemente, há falta de estudos em cultura primária de astrócitos que demonstrem o efeito do fluorocitrato na secreção da proteína S100B, gerando a dúvida se esse comportamento é próprio das células astrogliais C6 ou se esse comportamento se dá a um sistema isolado, ou seja, fatias hipocampais agudas, são constituídas por diversos tipos celulares que medeiam diversos processos interligados, o que poderiam estar relacionados com o resultado dispare desse estudo.

Todavia, como já foi ressaltado, as células astrogliais C6 possuem comportamentos diferentes da cultura primária de astrócitos. Esse tipo celular possui ainda características de um glioma, com um metabolismo oxidativo rápido e consequentemente isso viabiliza maior proliferação, crescimento e sobrevivência celular ^{52,86}. Devido à inibição da aconitase via FC, provavelmente há um acúmulo de citrato intracelular. Essa inibição enzimática via FC induz à liberação e o aumento do citrato para o meio extracelular, onde altas concentrações podem agir como um quelante de cálcio ⁹¹. Sabe-se também que os astrócitos possuem maior capacidade de captar e liberar citrato para o espaço extracelular ⁹². Portanto, a hipótese que explicaria esse comportamento na secreção da proteína S100B seria que a inibição do ciclo de krebs nas células astrogliais C6 pode levar a um acúmulo e liberação de citrato de forma rápida, diferentemente dos astrócitos, e isso agiria quelando o cálcio. Estudos anteriores mostraram que o uso de quelantes como BAPTA e EGTA aumentam a secreção da proteína S100B ^{93,94}. Outro trabalho também evidencia que o uso de anticoagulantes, como o citrato, em pacientes , aumenta os níveis de S100B no plasma ⁹⁵. Então, resumidamente, a ação quelante sob cálcio extracelular, via FC (indiretamente), agiria aumentando a secreção da proteína S100B, porém mais experimentos são necessários para elucidar esse processo.

A proteína S100B pode participar em respostas inflamatórias no SNC, estando ligada a diversas citocinas pró inflamatórias. É observado um aumento do conteúdo extracelular da S100B no SNC em diversos casos patológicos ou insultos, como por exemplo na doença de Alzheimer, epilepsia crônica, síndrome de Down, infecção por HIV, esquizofrenia e neuroinflamação^{5,96,97}. Em quadros como estes há sinalizações pró inflamatórias pela S100B via ligação ao RAGE, promovendo a ação de citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF α ^{96,98}. Trabalhos já publicados mostraram que essas citocinas também podem promover o aumento da secreção da proteína S100B⁴⁰. Dito isso, acreditamos que o aumento da secreção da proteína S100B pode estar correlacionado a uma resposta inflamatória mediada pela ação do FC.

Em resumo, o FC um inibidor seletivo do metabolismo glial, age diretamente na enzima aconitase, inibindo-a. Isso leva a uma alteração do metabolismo energético, visto tanto pela captação de glicose elevada quanto na diminuição a longo prazo na liberação de lactato, numa tentativa adaptativa celular a esse insulto. Além disso há um aumento na captação de glutamato, que provavelmente está sendo utilizado como substrato para formação de GSH, promovendo sobrevivência celular. Além disso, a inibição da aconitase possivelmente leva a um acúmulo de citrato que é liberado para o espaço extracelular, quelando o cálcio e induzindo o aumento da secreção da proteína S100B (Fig. 7).

Células Astrogliais C6

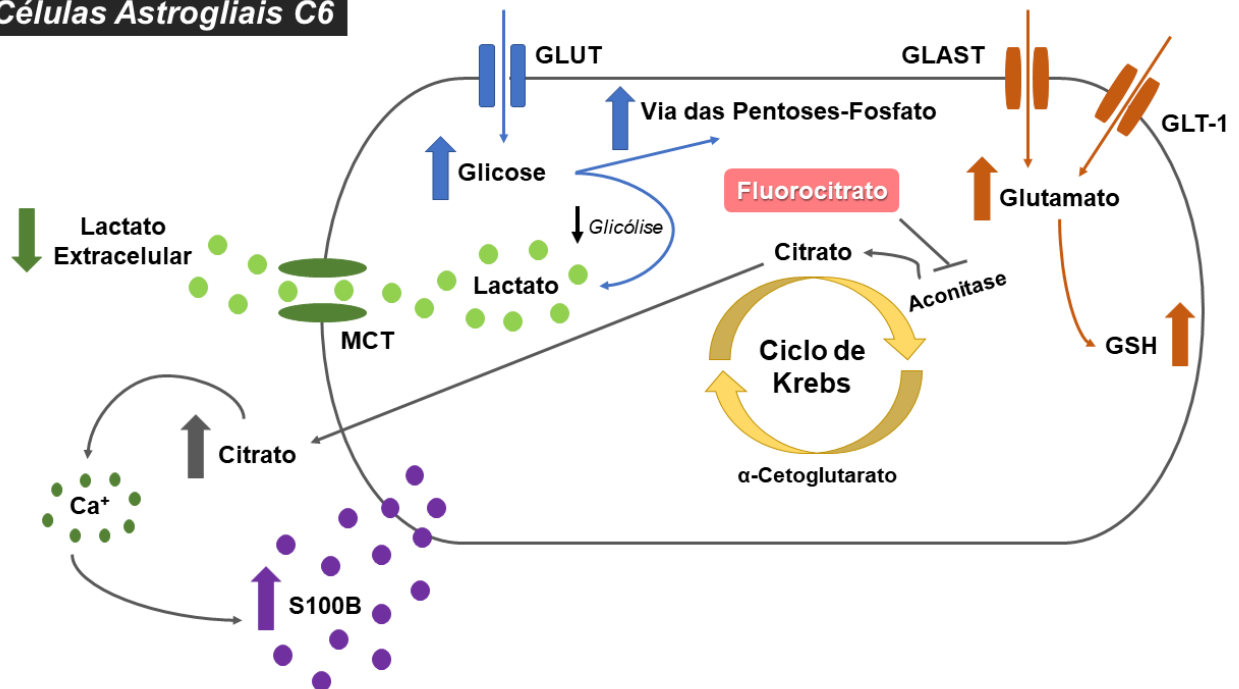


Figura 7: Efeito do fluorocitrato em células astrogliais C6. O fluorocitrato inibe a ação da enzima aconitase, interrompendo o funcionamento do ciclo de Krebs. Levando a um aumento da captação de glicose, que é transportada pelos GLUTs. Também devido ao bloqueio do ciclo de Krebs, há uma diminuição na liberação de lactato, possivelmente devido a glicose captada estar sendo utilizada para rota das pentoses e conseqüentemente diminuindo a produção de lactato. Além disso, há um aumento da captação de glutamato, sendo essa molécula utilizada para proteção da célula via aumento na produção de GSH. Há um provável acúmulo e conseqüente liberação de citrato para o meio extracelular, devido a inibição da aconitase, que age quelando o cálcio, levando ao aumento da secreção da proteína S100B.

9 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou o efeito do FC em células astrogliais C6. Nele foi evidenciado mudanças no metabolismo energético, onde houve um aumento na captação de glicose devido a uma resposta adaptiva a inibição do ciclo de Krebs, e isso a longo prazo levou uma diminuição na liberação extracelular de lactato. Isso também gerou modificações no metabolismo glutamatérgico onde houve um aumento da captação de glutamato e um aumento no conteúdo de GSH, provavelmente decorrente a uma tentativa de suprir a inibição do metabolismo energético e promover sobrevivência celular. Por fim, o FC causou aumento na secreção da proteína S100B, um dos principais marcadores astrocíticos envolvido em diversas funções intra e extra celulares, por uma ação quelante do citrato, com acúmulo e liberação ao meio extracelular, sob o cálcio e talvez gerando uma resposta de citocinas pró inflamatórias. Porém, são necessários mais experimentos e dados para comprovar as sinalizações e as vias relacionadas a esses resultados, assim afirmando as hipóteses propostas. Vale ressaltar, que esse trabalho é primeiro a demonstrar os efeitos do FC em células astrogliais C6.

10 PERSPECTIVAS

- Avaliar o metabolismo glutamatérgico com as concentrações de FC (1, 10 e 100 μM) sob tratamento de 24 horas;
- Avaliar a atividade da enzima glutamato-cisteína ligase (GCL) e o seu papel na síntese de GSH nos tratamentos com concentrações de FC (1, 10 e 100 μM) nos períodos de 1 e 24 horas;
- Avaliar o impacto da inibição da GCL via o inibidor butionina sulfoximina (BSO) no metabolismo glutamatérgico e na secreção da proteína S100B;
- Avaliar via das pentoses-fostafo
- Avaliar a liberação de citrato extracelular;
- Avaliar a ação quelante do citrato sob a secreção da proteína S100B;
- Avaliar a secreção de $\text{TNF}\alpha$ sob tratamento nas concentrações de FC (1, 10 e 100 μM) nos períodos de 1 e 24 horas, para possível compreensão da atividade alarmina dessa proteína e da S100B.

REFERÊNCIAS

1. Howarth, C., Gleeson, P. & Attwell, D. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **32**, 1222–1232 (2012).
2. Nehlig, A. Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **70**, 265–275 (2004).
3. Perea, G. & Araque, A. Glial calcium signaling and neuron–glia communication. *Cell Calcium* **38**, 375–382 (2005).
4. Perea, G., Sur, M. & Araque, A. Neuron-glia networks: Integral gear of brain function. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**, 1–8 (2014).
5. Van Eldik, L. J. & Wainwright, M. S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* **21**, 97–108 (2003).
6. Elsayed, M. & Magistretti, P. J. A new outlook on mental illnesses: Glial involvement beyond the glue. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**, 1–20 (2015).
7. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* **119**, 7–35 (2010).
8. Bélanger, M. & Magistretti, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin. Neurosci.* **11**, 281–295 (2009).
9. Filosa, J. A., Morrison, H. W., Iddings, J. A., Du, W. & Kim, K. J. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience* **323**, 96–109 (2016).
10. Molofsky, A. V. *et al.* Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* **26**, 891–907 (2012).
11. Duelli, R. & Kuschinsky, W. Brain glucose transporters: Relationship to local

- energy demand. *News Physiol. Sci.* **16**, 71–76 (2001).
12. Anderson, C. M. & Swanson, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**, 1–14 (2000).
 13. Leino, R. L., Gerhart, D. Z., van Bueren, A. M., McCall, A. L. & Drewes, L. R. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J. Neurosci. Res.* **49**, 617–626 (1997).
 14. Sidoryk-Wegrzynowicz, M. & Aschner, M. Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **14**, 23 (2013).
 15. Delgado-Esteban, M., Almeida, A. & Bolaños, J. P. D-Glucose Prevents Glutathione Oxidation and Mitochondrial Damage After Glutamate Receptor Stimulation in Rat Cortical Primary Neurons. *J. Neurochem.* **75**, 1618–1624 (2002).
 16. Herrero-Mendez, A. *et al.* The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.* **11**, 747–752 (2009).
 17. Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10625–10629 (1994).
 18. Aubert, S. *et al.* Activity-Dependent Regulation of Energy Metabolism by Astrocytes: An Update. *Glia* **55**, 1251–1262 (2007).
 19. Pellerin, L. Brain energetics (thought needs food): *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **11**, 701–705 (2008).
 20. Volterra, A., Magistretti, P. J. & Haydon, P. G. The tripartite synapse: glia in synaptic transmission. (2002).
 21. Angulo, M. C., Le Meur, K., Kozlov, A. S., Charpak, S. & Audinat, E. GABA, a

- forgotten gliotransmitter. *Progress in Neurobiology* **86**, 297–303 (2008).
22. Malarkey, E. B. & Parpura, V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochemistry International* **52**, 142–154 (2008).
 23. Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences* **32**, 421–431 (2009).
 24. Farhy-Tselnicker, I. & Allen, N. J. Astrocytes, neurons, synapses: A tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development* **13**, (2018).
 25. Parpura, V. *et al.* Glial cells in (patho)physiology. *Journal of Neurochemistry* **121**, 4–27 (2012).
 26. Chan, K. *et al.* Loss of function mutation of the Slc38a3 glutamine transporter reveals its critical role for amino acid metabolism in the liver, brain, and kidney. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **468**, 213–227 (2016).
 27. Kimelberg, H. K. & Nedergaard, M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* **7**, 338–353 (2010).
 28. Jayakumar, A. R. & Norenberg, M. D. Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders. in *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle* 327–350 (Springer, Cham, 2016).
 29. Gegg, M. E. *et al.* Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: Implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J. Neurochem.* **86**, 228–237 (2003).
 30. Stridh, M. H. *et al.* Enhanced glutathione efflux from astrocytes in culture by low extracellular Ca²⁺ and curcumin. *Neurochem. Res.* **35**, 1231–1238 (2010).
 31. Bélanger, M., Allaman, I. & Magistretti, P. J. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism* **14**, 724–738 (2011).
 32. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. & Lee, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-

- one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* **25**, 1439–1451 (2000).
33. Donato, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* **60**, 540–551 (2003).
 34. Donato, R. *et al.* S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 1008–1022 (2009).
 35. Donato, R. *et al.* Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24–57 (2013).
 36. Donato, R. *et al.* S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 1008–1022 (2009).
 37. Gonzalez-Reyes, R. E. & Rubiano, M. G. Astrocyte's RAGE: More Than Just a Question of Mood. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **18**, 39–48 (2016).
 38. Huttunen, H. J. *et al.* Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 40096–40105 (2000).
 39. Wartchow, K. M. *et al.* Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism. *Neurochem. Res.* **41**, 1420–1429 (2016).
 40. de Souza, D. F. *et al.* Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **43**, 14–22 (2013).
 41. Rodrigues, L. *et al.* Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J. Alzheimer's Dis.* **17**, 193–202 (2009).
 42. de Souza, D. F. *et al.* S100B secretion is stimulated by IL-1 β in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J. Neuroimmunol.* **206**, 52–57 (2009).

43. Guerra, M. C. *et al.* Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: A study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J. Neuroinflammation* **8**, (2011).
44. Guerra, M. C. *et al.* Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: A study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J. Neuroinflammation* **8**, 128 (2011).
45. Fonnum, F., Johnsen, A. & Hassel, B. Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* **21**, 106–113 (1997).
46. Peters, R. A. Mechanism of the toxicity of the active constituent of *Dichapetalum cymosum* and related compounds. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* **18**, 113–159 (1957).
47. Peters, R. A. *Biochemical Lesions and Lethal Synthesis: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Modern Trends in Physiological Sciences.* (Elsevier Science, 1963).
48. Hassel, B., Paulsen, R. E., Johnsen, A. & Fonnum, F. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res.* **576**, 120–124 (1992).
49. Paulsen, R. E., Contestabile, A., Villani, L. & Fonnum, F. An In Vivo Model for Studying Function of Brain Tissue Temporarily Devoid of Glial Cell Metabolism: The Use of Fluorocitrate. *J. Neurochem.* **48**, 1377–1385 (1987).
50. Benjamin, A. M. & Verjee, Z. H. Control of aerobic glycolysis in the brain in vitro. *Neurochem. Res.* **5**, 921–934 (1980).
51. Swanson, R. A. & Graham, S. H. Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Res.* **664**, 94–100 (1994).
52. Galland, F. *et al.* Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells.

- Neurochem. Int.* **131**, (2019).
53. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. & Sweet, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science (80-.)*. **161**, 370–371 (1968).
 54. Auer, R. N., Maestro, R. F. D. & Anderson, R. A Simple and Reproducible Experimental in Vivo Glioma Model. *Can. J. Neurol. Sci. / J. Can. des Sci. Neurol.* **8**, 325–331 (1981).
 55. Bobermin, L. D. *et al.* Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells. *PLoS One* **7**, (2012).
 56. Baber, Z. & Haghghat, N. Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. *Metab. Brain Dis.* **25**, 413–418 (2010).
 57. Esposito, E. *et al.* Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J. Pineal Res.* **44**, 78–87 (2008).
 58. Luis Albasanz, J., Fernandez, M. & Martín, M. Internalization of metabotropic glutamate receptor in C6 cells through clathrin-coated vesicles. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **99**, 54–66 (2002).
 59. Nagamatsu, S. *et al.* Rat C6 glioma cell growth is related to glucose transport and metabolism. *Biochem. J.* **319 (Pt 2)**, 477–482 (1996).
 60. Bobermin, L. D. *et al.* Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
 61. Tramontina, A. C. *et al.* High-Glucose and S100B Stimulate Glutamate Uptake in C6 Glioma Cells. *Neurochem. Res.* **37**, 1399–1408 (2012).
 62. Hassel, B., Sonnewald, U., Unsgård, G. & Fonnum, F. NMR spectroscopy of cultured astrocytes: effects of glutamine and the gliotoxin fluorocitrate. *J. Neurochem.* **62**, 2187–94 (1994).
 63. Hassel, B., Sonnewald, U., Unsgård, G. & Fonnum, F. NMR spectroscopy of

- cultured astrocytes: effects of glutamine and the gliotoxin fluorocitrate. *J. Neurochem.* **62**, 2187–2194 (1994).
64. Feoli, A. M. *et al.* Brain Glutathione Content and Glutamate Uptake Are Reduced in Rats Exposed to Pre- and Postnatal Protein Malnutrition. *J. Nutr.* **136**, 2357–2361 (2006).
65. Minet, R., Villie, F., Marcollet, M., Meynial-Denis, D. & Cynober, L. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clin. Chim. Acta* **268**, 121–132 (1997).
66. Browne, R. W. & Armstrong, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol. Biol.* **108**, 347–352 (1998).
67. Leite, M. C. *et al.* A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* **169**, 93–99 (2008).
68. Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346–356 (1977).
69. Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S. A. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* **26**, 523–530 (2003).
70. Liddelow, S. A. & Barres, B. A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* **46**, 957–967 (2017).
71. Shang, X.-L. *et al.* Fluorocitrate induced the alterations of memory-related proteins and tau hyperphosphorylation in SD rats. *Neurosci. Lett.* **584**, 230–235 (2015).
72. Wang, Y. *et al.* Inhibition of activated astrocyte ameliorates lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors. *J. Affect. Disord.* **242**, 52–59 (2019).

73. Zhang, X. *et al.* Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Ameliorates Learning and Memory Impairment Through Upregulating CRTG1 and Synaptophysin in Ischemic Stroke Rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* **39**, 1151–1163 (2019).
74. Wu, L. *et al.* Domino effect of IL-15 and CD8 T cell-mediated neuronal apoptosis in experimental traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* (2018). doi:10.1089/neu.2017.5607
75. Jurisic, V., Radenkovic, S. & Konjevic, G. The actual role of LDH as tumor marker, biochemical and clinical aspects. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* **867**, 115–224 (Springer New York LLC, 2015).
76. Grela, E., Kozłowska, J. & Grabowiecka, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica* **120**, 303–311 (2018).
77. Esposito, E. *et al.* Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J. Pineal Res.* **44**, 78–87 (2008).
78. Kim, Y. J., Hwang, S. Y., Oh, E. S., Oh, S. & Han, I. O. IL-1 β , an immediate early protein secreted by activated microglia, induces iNOS/NO in C6 astrocytoma cells through p38 MAPK and NF- κ B pathways. *J. Neurosci. Res.* **84**, 1037–1046 (2006).
79. Hirose, S. *et al.* Role of NMDA receptors in the increase of glucose metabolism in the rat brain induced by fluorocitrate. *Neurosci. Lett.* **415**, 259–263 (2007).
80. Nasser, Y. *et al.* Role of enteric glia in intestinal physiology: Effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **291**, G912-27 (2006).
81. Galland, F. *et al.* Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells.

- Neurochem. Int.* **131**, 104538 (2019).
82. Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10625–10629 (1994).
83. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 211–218 (2016).
84. Bouzier, A. K., Voisin, P., Goodwin, R., Canioni, P. & Merle, M. Glucose and lactate metabolism in C6 glioma cells: Evidence for the preferential utilization of lactate for cell oxidative metabolism. in *Developmental Neuroscience* **20**, 331–338 (1998).
85. Berg-Johnsen, J., Paulsen, R. E., Fonnum, F. & Langmoen, I. A. Changes in evoked potentials and amino acid content during fluorocitrate action studied in rat hippocampal cortex. *Exp. Brain Res.* **96**, 241–246 (1993).
86. Marie, S. K. N. & Shinjo, S. M. O. Metabolism and brain cancer. *Clinics* **66**, 33–43 (2011).
87. Leite, M. C., Galland, F., Rodrigues, L., Gonçalves, C.-A. & Gottfried, C. S100B secretion is mediated by Ca²⁺ from endoplasmic reticulum: a study using DMSO as a tool for intracellular Ca²⁺ mobilization. *Glia* **65** (2017).
88. L., R. *et al.* Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations. *Neurochem. Int.* **128**, 85–93 (2019).
89. Morland, C. *et al.* The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain. *Journal of Neuroscience Research* **93**, 1045–1055 (2015).
90. Vizuete, A. F. K. *et al.* GABAA Modulation of S100B Secretion in Acute

- Hippocampal Slices and Astrocyte Cultures. *Neurochem. Res.* **44**, 301–311 (2019).
91. Fonnum, F., Johnsen, A. & Hassel, B. Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* **21**, 106–113 (1997).
 92. Westergaard, N. *et al.* Uptake, Release, and Metabolism of Citrate in Neurons and Astrocytes in Primary Cultures. *J. Neurochem.* **62**, 1727–1733 (1994).
 93. Nardin, P. *et al.* S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of Ca²⁺ and K⁺. *Neurochem. Res.* **34**, 1603–1611 (2009).
 94. Gürsoy, M. & Levent Büyükuysal, R. Mechanism of S100b release from rat cortical slices determined under basal and stimulated conditions. *Neurochem. Res.* **35**, 429–436 (2010).
 95. Tort, A. B. L., Dietrich, M. O., Gonçalves, C. A., Souza, D. O. & Portela, L. V. C. Influence of anticoagulants on the measurement of S100B protein in blood. *Clin. Biochem.* **36**, 519–22 (2003).
 96. Bianchi, R., Giambanco, I. & Donato, R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1. Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α . *Neurobiol. Aging* **31**, 665–677 (2010).
 97. Heizmann, C. W., Fritz, G. & Schäfer, B. W. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **7**, (2002).
 98. Xu, J. *et al.* Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Glia* **64**, 1869–1878 (2016).