

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-graduação em Neurociências

**Efeito da proteína S100B sobre a captação de
glicose em células de glioma C6 e fatias
hipocâmpais de ratos**

Krista Minéia Wartchow

Orientador

Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Porto Alegre, fevereiro de 2015.

**Efeito da proteína S100B sobre a captação de
glicose em células de glioma C6 e fatias
hipocámpais de ratos**

Krista Minéia Wartchow

Das Utopias

(Mário Quintana)

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes seriam os caminhos

Sem a mágica presença das estrelas!

Dedicatória

*Dedico esta dissertação aos meus pais Hans e Marli que sempre me apoiaram meu irmão Christian, minha avó Edeltraud e meu namorado William.
Vocês são a minha vida! Amo vocês!*

Sumário

Parte I	6
RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Metabolismo energético no Sistema Nervoso Central	10
1.2. Células do SNC.....	11
1.3. Modulação do metabolismo de glicose	14
1.4. Proteína S100B	16
1.5. Modelos Experimentais.....	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
Parte II	20
Capítulo I.....	21
Insulin stimulates S100B secretion and these proteins antagonistically modulate brain glucose metabolism	
Parte III	52
3. DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	64

Parte I

RESUMO

O metabolismo cerebral é altamente dependente da glicose, que é derivada a partir da circulação sanguínea e metabolizada pelos astrócitos e outras células neuronais, através de várias vias. A captação da glicose no cérebro não envolve transportadores de glicose insulino-dependentes; no entanto, esse hormônio afeta o fluxo de glicose do cérebro. Alterações nos níveis de S100B (uma proteína derivada de astrócitos) no líquido cefalorraquidiano têm sido associados a alterações no metabolismo da glicose; no entanto, não há evidência que a insulina modula o metabolismo da glicose e a secreção de S100B. Investigamos então o efeito da S100B no metabolismo da glicose, medindo a incorporação de ³H-glicose em dois modelos, em células de glioma C6 e fatias hipocampais agudas, investigando o efeito da insulina sobre a secreção de S100B. Os nossos resultados mostram que: (a) a S100B em níveis fisiológicos diminui a captação de glicose, através da via do receptor multiligante RAGE e através da ativação da via de sinalização da proteína-quinase / ERK, e que (b) insulina estimulada a secreção de S100B via sinalização de PI3K. Os nossos resultados indicam a existência de uma relação insulina-S100B na modulação de glicose no tecido cerebral, o que pode melhorar a nossa compreensão sobre o metabolismo da glicose em várias condições, tais como a cetose, demência induzida por estreptozotocina e exposição farmacológica aos antipsicóticos, onde as mudanças de sinalização da insulina e extracelular celular de S100 foram relatados.

ABSTRACT

Brain metabolism is highly dependent on glucose, which is derived from the blood circulation and metabolized by the astrocytes and other neural cells via several pathways. Glucose uptake in the brain does not involve insulin-dependent glucose transporters; however, this hormone does affect the brain's glucose in flux. Changes in cerebrospinal fluid levels of S100B (an astrocyte-derived protein) have been associated with alterations in glucose metabolism; however, there is no evidence as to whether insulin modulates glucose metabolism and S100B secretion. Herein we investigated the effect of S100B on glucose metabolism, measuring ³H-glucose incorporation in two preparations, C6 glioma cells and acute hippocampal slices, and we also investigated the effect of insulin on S100B secretion. Our results showed that: (a) S100B at physiological levels decreases glucose uptake, through via the multiligand receptor RAGE and mitogen-activated protein kinase/ERK signaling, and that (b) insulin stimulated S100B secretion via PI3K signaling. Our findings indicate the existence of insulin-S100B modulated glucose utilization in the brain tissue, and may improved our understanding of glucose metabolism in several conditions such as ketosis, streptozotocin-induced dementia and pharmacological exposure to antipsychotics, where changes of insulin signaling and extracellular cellular of S100 have been reported.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC – sistema nervoso central

ATP – adenosina trifosfato

BHE – barreira hemato-encefálica

GLUT – transportador de glicose

GFAP - proteína ácida fibrilar glial

GS - glutamina sintetase

LDH – lactato desidrogenase

RI – receptor de insulina

EF-hand – hélice-alça -hélice

RAGE – receptor para produtos finais de glicação avançada

PKC – proteína cinase C

pM – picomolar

nM - nanomolar

mM – milimolar

AGEs – produtos de glicação avançada

MAPKs – cinases ativadas por mitógenos

IFN α – interferon α

IFN – interferon

STZ – estreptozotocina

AMPc – adenosina 3'5' monofosfato cíclica

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabolismo energético no Sistema Nervoso Central

O cérebro humano representa apenas 2% do peso corporal, no entanto 25% do aporte de glicose é consumido pelo mesmo (Howarth et al., 2012), sendo importante que o aporte de glicose a partir da corrente sanguínea se mantenha contínuo, de forma a atuar na manutenção do sistema nervoso central (SNC). Em algumas situações como jejum, exercício físico intenso e no desenvolvimento, o SNC faz uso de outras formas de energia, como os corpos cetônicos. O metabolismo da glicose produz energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) que é a fonte de energia para a sobrevivência celular, portanto o controle rígido do metabolismo energético é necessário para manutenção do SNC, e qualquer perturbação na sua regulação pode levar a diversos distúrbios cerebrais (Nehlig, 2004).

Neurônios são geralmente considerados as principais células do SNC que participam no metabolismo energético, no entanto, outras células, como as células gliais e células endoteliais vasculares, também desempenham um papel crítico na captação e distribuição de substratos energéticos no SNC. O metabolismo da glicose cerebral inclui dois processos principais: transporte de glicose e catabolismo oxidativo intracelular (Duelli and Kuschinsky, 2001).

O transporte fisiológico de glicose depende significativamente da participação de astrócitos, presentes na composição de barreira hematoencefálica (BHE) (Molofsky et al., 2012), e vários transportadores de glicose distribuídos no SNC (Duelli and Kuschinsky, 2001).

No metabolismo não oxidativo, a conversão de glicose a lactato também ocorre, e pode ser importante para uma resposta rápida à atividade sináptica. Além disso, outra fonte

energética para circunstâncias de necessidade rápida de energia é o glicogênio, que está armazenado no interior dos astrócitos (Pellerin, 2008a).

A homeostase do metabolismo energético é essencial para a manutenção do organismo, e a família de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) é responsável pela mediação destes processos. O transporte ocorre via difusão facilitada, ou seja, a favor do gradiente de concentração. Dentre as diferentes isoformas dos transportadores, no SNC são encontrados principalmente nos neurônios. O transportador de glicose neuronal, GLUT3, é associado a processos periféricos principalmente em corpos celulares que possuem uma alta capacidade energética. O GLUT1 é abundante nas células endoteliais, nos pés astrocíticos associados aos vasos sanguíneos e em pequenos processos astrocíticos localizados entre os elementos neuronais (Leinoet al., 1997). Células gliais C6 astrocíticas expressam principalmente GLUT1, em contraste com os tumores astrocíticos humanos que expressam predominantemente GLUT3 (Nagamatsu et al., 1996).

1.2. Células do SNC

O SNC é composto por diferentes tipos celulares, incluindo os neurônios, macroglia e microglia. Os neurônios foram por muito tempo considerados os elementos celulares responsáveis pelo processamento da informação, enquanto que as células gliais pertencentes à microglia, eram reconhecidas apenas pelo seu papel de suporte no SNC (Perea and Araque, 2005). Nas últimas décadas mostrou-se que as células gliais, destacando-se os astrócitos, não atuam apenas como um elemento de suporte, mas como um componente ativo em funções cerebrais essenciais (Van Eldik and Wainwright, 2003). Além disso, hoje se sabe que os astrócitos não somente estabelecem a arquitetura estrutural do

cérebro, mas também organizam e participam de suas vias de comunicação e plasticidade (Blasko et al., 2004).

1.2.1. Astrócitos

Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC, possuindo uma íntima relação com os neurônios. Possuem papel-chave no desenvolvimento e funções do cérebro, sinaptogênese, homeostase do meio extracelular e microcirculação cerebral, além de possuírem um importante papel no suporte metabólico neuronal (Belanger and Magistretti, 2009).

Além das funções já citadas, os astrócitos possuem outras funções essenciais no SNC, como a regulação e manutenção da barreira BHE, restringindo a entrada de fatores ou de moléculas (Sidoryk-Wegrzynowicz and Aschner, 2013), tamponamento do potássio, captação e conversão do glutamato em glutamina, defesa antioxidante, homeostase do cálcio, liberação de gliotransmissores, além de efeito na própria modulação sináptica (Perea and Araque, 2005).

Os astrócitos podem ser classificados em dois subtipos principais: astrócitos protoplasmáticos, encontrados em maior concentração na substância cinzenta, e astrócitos fibrosos, localizados principalmente na substância branca cerebral, que correspondem, respectivamente, aos tipo 1 e 2 em cultura (Kimelberg and Norenberg, 1989). Existem ainda astrócitos especializados, encontrados em estruturas específicas, como a glia de Bergmann no cerebelo e as células de Müller na retina (Porter and McCarthy, 1996). Dentre os marcadores astrocíticos podemos destacar três proteínas específicas: proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutamina sintetase (GS) e S100B (Kimelberg and Nedergaard, 2010). A GFAP é o

principal filamento intermediário de astrócitos maduros do SNC, e é considerada como um dos principais antígenos utilizados para a identificação e estudo do comportamento astrocítico (Eng et al., 2000).

No metabolismo energético os astrócitos estão inseridos na hipótese do transporte de lactato astrócito-neurônio, onde contribuem com a captação de glicose a partir da circulação sanguínea (Pellerin, 2008; Pellerin and Magistretti, 2004). A captação depende da ativação da bomba Na^+, K^+ -ATPase na superfície dos astrócitos, para que assim a glicose possa entrar na via glicolítica. Posteriormente, o lactato produzido é captado pelos neurônios, que sofrerá oxidação para formação de energia (Pellerin, 2008). O lactato é utilizado pelos neurônios como um substrato aeróbico sob circunstâncias precisas, como por exemplo, hipoglicemia (Pellerin et al., 2007).

Sabe-se que os astrócitos expressam enzimas glicolíticas em maior quantidade quando comparados às células neuronais (Lovatt et al., 2007), além de ocorrerem diferenças entre a expressão das isoformas da enzima lactato desidrogenase (LDH), que converte glicose em lactato, entre neurônios e astrócitos (Laughton et al., 2007).

O glicogênio astrocítico é a forma de estocagem de glicose no SNC. É mobilizado somente após alta estimulação e em concentrações de glicose muito abaixo do normal. Ou seja, os dois processos, tanto glicólise quanto glicogenólise em astrócitos podem ser complementares e, ocorrerem sucessivamente com o aumento da necessidade energética (Pellerin et al., 2007). Portanto, os astrócitos desempenham papéis importantes tanto no suporte energético quanto em condições de hipoglicemia por apresentarem estoques de glicogênio (Chen and Zhong, 2013).

1.3. Modulação do metabolismo de glicose

O metabolismo de glicose é um processo que possui várias etapas, sendo regulado por inúmeros fatores extra e intracelulares (Kuzuya, 1990), e incluindo principalmente dois processos: o transporte e metabolismo intracelular de glicose. A via de sinalização de insulina desempenha um papel fundamental na regulação do transporte transmembrana de glicose (Apelt et al., 1999), sendo este hormônio e o seu receptor (RI) os principais fatores para a modulação da glicólise e disponibilidade de energia para a homeostase, tanto no SNC quanto no sistema periférico (Banks et al., 2012).

A captação de glicose na periferia é dependente da presença da insulina secretada pelas células beta pancreáticas. Foi primeiramente identificada no início de 1920 como o principal hormônio hipoglicemiante, capaz de restaurar os níveis normais de glicose através seus efeitos sobre o metabolismo deste açúcar no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (Schulingkamp et al., 2000). A insulina estimula a captação de glicose pelo deslocamento do transportador de glicose GLUT4 do interior do citoplasma até a membrana das células musculares e dos adipócitos (Govers et al., 2004; Zaid et al., 2008).

A insulina possui a capacidade de atravessar a BHE em direção ao SNC (Banks et al., 1997), podendo atingir, desta maneira, várias áreas encefálicas, e interagir com os RI amplamente distribuídos pelos SNC (Unger et al., 1991). A passagem através da BHE se dá por meio de um mecanismo de transporte saturável, provavelmente facilitado por transportadores mediados por RI, que estão operacionais principalmente em estado fisiológico (basal) de níveis séricos de insulina (Baura et al., 1993; Filippi et al., 2013). A

insulina também pode ser sintetizada *de novo* no hipocampo, no córtex pré-frontal e no bulbo olfatório, sendo liberada por exocitose (Hoyer, 2004; Kuwabara et al., 2011).

Os RI são proteínas de membrana da família tirosina cinase, compostos por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, localizados principalmente no bulbo olfatório, hipotálamo e hipocampo (Havrankova et al., 1978). Estão presentes em concentração elevada nas células neuronais e em níveis mais baixos nas células gliais (Gerozissis, 2004), e a transdução de sinal pelo RI no SNC é semelhante à sinalização periférica (Filippi et al., 2013; Sharma et al., 2008).

Uma das vias de sinalização da insulina ocorre via ativação da PI3K, que está envolvida em muitas das ações da insulina no SNC, incluindo a modulação da plasticidade, o aprendizado e a memória. Além disso, a insulina apresenta ação neurotrófica, neuromoduladora e efeitos neuroendócrinos (Gerozissis, 2004).

Sugere-se fortemente que a sinalização de insulina no cérebro seja essencial para a função mitocondrial e para o metabolismo energético (Gerozissis, 2004), sendo a insulina essencial para a manutenção e regulação do balanço energético no cérebro.

Estudos mostram que alterações da via de sinalização da insulina estão envolvidas no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer, onde observou-se uma diminuição da expressão e da função de PI3K mediada por GLUTs no SNC, relação que pode levar a uma diminuição do metabolismo de glicose e com subsequente declínio na produção de ATP mitocondrial (Bosco et al., 2011).

1.4. Proteína S100B

A S100B é uma proteína ligante de cálcio expressa e secretada por astrócitos. Estruturalmente apresenta-se na forma de homodímeros constituídos de duas subunidades unidas por pontes de dissulfeto, é uma proteína que possui domínio do tipo EF-hand (hélice-alça -hélice) de 21 kDa com dois sítios ligantes de Ca^{2+} (Marenholz et al., 2004). Mesmo sendo secretada principalmente por astrócitos, sua concentração sérica não é oriunda exclusivamente proveniente desta fonte, visto que outras fontes periféricas, como o tecido adiposo, também são capazes de secretar esta proteína (Gonçalves et al., 2010).

No SNC, a S100B exerce efeitos autócrinos e parácrinos sobre outras células gliais e neurônios, desempenhando também papéis intra e extracelulares importantes (Donato, 2003; Donato et al., 2009, 2013). Essa proteína pode atravessar a BHE, tanto em concentrações basais quanto aumentadas (Marchi et al., 2004).

A proteína S100B exerce seus efeitos através da ligação ao receptor para produtos de glicação avançada (RAGE), receptor multi-ligante localizado em vários tipos celulares, incluindo as células do SNC (Donato et al., 2009). O RAGE mostrou-se ser o principal receptor responsável pela transdução de sinal intracelular a partir da S100B (Huttunen et al., 2000), e assim, através da ligação controla vários processos celulares através de inúmeras vias de sinalização (Xie et al., 2013).

Intracelularmente a S100B é capaz de se ligar a diversas proteínas-alvo, tais como proteína cinase C (PKC), fator anti-apoptótico Bcl-2 e proteína supressora tumoral p53 (Donato et al., 2009). Além disso, pode também regular a polimerização do citoesqueleto através da inibição da fosforilação da GFAP, atuando desta maneira na modulação da

plasticidade, proliferação celular dos astrócitos e no metabolismo energético (Van Eldik and Wainwright, 2003). A S100B pode atuar na regulação da atividade de enzimas, como a frutose-1,6 – bifosfato aldolase e a fosfoglicomutase, ambas pertencentes à via glicolítica (Donato, 2001, 2003; Landar et al., 1996; Zimmer and Van Eldik, 1986).

Sabe-se que extracelularmente a S100B está envolvida na comunicação neurônio-glia, possuindo propriedades neurotróficas ou neurotóxicas de acordo com sua concentração. Em níveis nanomolares, a S100B apresenta efeito pró- sobrevivência em neurônios e atua favorecendo o crescimento de neuritos (Donato et al., 2009), enquanto que em concentrações micromolares, exerce efeitos neurotóxicos estimulando a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (Van Eldik and Wainwright, 2003).

O efeito extracelular da S100B sobre o metabolismo energético ainda não é conhecido, portanto necessita de maiores investigações. Em um estudo realizado com pacientes saudáveis mostrou-se que há uma relação entre a insulina e níveis séricos da proteína S100B. Os pacientes do estudo em questão apresentaram redução dos níveis séricos de S100B após a realização do teste de tolerância à glicose. Desta forma, os níveis de S100B se apresentaram negativamente correlacionadas aos níveis de insulina, que se apresentam aumentados nestas condições (Steiner et al., 2014).

1.5. Modelos Experimentais

Entre os modelos disponíveis para estudo dos astrócitos, as células gliais C6 são amplamente utilizadas, principalmente por apresentarem propriedades semelhantes às das células gliais. As células de glioma C6 e os astrócitos apresentam parâmetros bioquímicos e

metabólicos em comum, incluindo a expressão da enzima glutamina sintetase (Bobermin et al., 2012), realização de captação de glutamato (Baber and Haghghat, 2010) e a expressão das proteínas GFAP e S100B (Esposito et al., 2008).

Fatias cerebrais agudas, principalmente fatias do hipocampo, têm sido utilizadas para avaliar parâmetros metabólicos neuronais e também funções astrocíticas, incluindo captação de glutamato (Thomazi et al., 2004) e secreção de S100B (Büyükuysal, 2005). As fatias hipocampais são consideradas um bom modelo para o estudo dos astrócitos na sua circuitaria, reduzindo as limitações inerentes à utilização de culturas gliais isoladas.

Alguns modelos animais de neurodegeneração mostraram redução dos níveis da S100B extracelular e uma diminuição na captação de glicose no SNC (Biasibetti et al., 2013; Tramontina et al., 2011), porém a ligação entre esses dois eventos não foi investigada. A fim de avaliar a possibilidade desta ligação, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da S100B exógena sobre a captação de glicose nas células gliais C6 e em fatias hipocampais agudas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da proteína S100B e da insulina sobre o metabolismo da glicose em células de glioma C6 e fatias hipocâmpais de ratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da proteína S100B sobre a captação de glicose.
- Avaliar as vias de sinalização envolvidas no efeito da S100B sobre a captação de glicose;
- Avaliar o efeito da insulina sobre a secreção da proteína S100B e sobre a captação de glicose.
- Avaliar a via de sinalização envolvida no efeito da insulina sobre a secreção da proteína S100B e sobre a captação de glicose.

Parte II

Capítulo I

Insulin stimulates S100B secretion and these proteins antagonistically modulate brain glucose metabolism

Artigo a ser submetido à revista Cell Signaling.

Insulin stimulates S100B secretion and these proteins antagonistically modulate brain glucose metabolism

Krista Minéia Wartchow³, Ana Carolina Tramontina^{2*}, Daniela F de Souza¹, Regina Biasibetti¹, Larissa Bobermin¹, Carlos Alberto Gonçalves^{1,3}.

¹ Biochemistry Post-graduation Program, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ² State University of Rio Grande do Sul (UERGS), Bento Gonçalves, Brazil; ³ Neuroscience Post-graduation Program, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

***Corresponding author:** Ana Carolina Tramontina

State University of Rio Grande do Sul – Uergs

Benjamin Constant, 229

Bento Gonçalves, RS, Brazil

95700-000

Fone: 55- 54- 3452 0389

E-mail:ana-tramontina@uergs.edu.br

Abstract

Brain metabolism is highly dependent on glucose, which is derived from the blood circulation and metabolized by the astrocytes and other neural cells via several pathways. Glucose uptake in the brain does not involve insulin-dependent glucose transporters; however, this hormone does affect the brain's glucose in flux. Changes in cerebrospinal fluid levels of S100B (an astrocyte-derived protein) have been associated with alterations in glucose metabolism; however, there is no evidence as to whether insulin modulates glucose metabolism and S100B secretion. Herein we investigated the effect of S100B on glucose metabolism, measuring ^3H -glucose incorporation in two preparations, C6 glioma cells and acute hippocampal slices, and we also investigated the effect of insulin on S100B secretion. Our results showed that: (a) S100B at physiological levels decreases glucose uptake, through via the multiligand receptor RAGE and mitogen-activated protein kinase/ERK signaling, and that (b) insulin stimulated S100B secretion via PI3K signaling. Our findings indicate the existence of insulin-S100B modulated glucose utilization in the brain tissue, and may improve our understanding of glucose metabolism in several conditions such as ketosis, streptozotocin-induced dementia and pharmacological exposure to antipsychotics, where changes of insulin signaling and extracellular cellular of S100 have been reported.

Key words: Astrocyte, Glucose metabolism, Insulin, MAPK, RAGE, S100B

Introduction

Astrocytes are the most abundant cells in the brain tissue, where they are involved in a number of activities, including maintenance of the brain blood barrier and provision of metabolic support to neurons (1,2). The astrocytes are a very heterogeneous cell population, but can be identified by a common marker; the glial fibrillary acidic protein (GFAP). Brain metabolism is highly dependent on glucose derived from the blood circulation, which is taken up by the astrocytes and involved in several metabolic energy pathways, such as neurotransmitter synthesis, glutathione, lipids, and two other energetic substrates, glycogen and lactate, which are transferred to the neurons upon energetic demand (3).

Although the main entry of glucose into the brain tissue occurs via glucose transporters 1 (in endothelial cells and astrocytes) and 3 (in neurons), in an insulin-independent manner, this hormone affects brain glucose metabolism via the activation of insulin receptors (IR). These receptors are distributed throughout the brain in neurons and glial cells (4–6), acting by PI3K pathway activation (7). Insulin signaling impairment in the brain tissue has been suggested to be involved in the cognitive alterations that occur in diabetes mellitus and Alzheimer's disease (8,9).

Another marker used to identify astrocytes is the S100B protein, although this protein has been also identified in oligodendrocytes and a few neurons (10). This protein is a calcium-binding protein of 21 kDa that binds and regulates many intracellular proteins (11–13), including GFAP (14) and two glycolytic enzymes, fructose-1,6-bisphosphate aldolase and phosphoglucomutase

(Landar et al., 1996; Zimmer and Van Eldik, 1986). Moreover, this protein is secreted by astrocytes and its extracellular neurotrophic activity has been described in vitro and in vivo (15,16). The extracellular activity of S100B is triggered by its binding to the multiligand receptor for advanced glycation end products (RAGE) (see ref.17), which, in turn, triggers a biochemical cascade involving the mitogen-activated protein kinases (MAPK); such as ERK1/2, p38 and JNK (12).

Changes in cerebrospinal fluid S100B levels have been associated with alterations in glucose metabolism (18,19). On other hand, S100B is also expressed and secreted by adipocytes (20). A pioneer work showed that insulin reduces S100B secretion in adipose tissue (21). More recently, in accordance with these findings, peripheral increments in glucose/insulin levels in healthy human subjects were reported to be accompanied by reductions in serum S100B levels. However, there is evidence that insulin directly modulates S100B or that extracellular S100B modulates glucose metabolism in the brain tissue (22).

Therefore, we investigated the effect of S100B on glucose metabolism, measuring ³H-glucose incorporation in two preparations, C6 glioma cells and acute hippocampal slices. In addition, we investigated the effect of insulin on the S100B secretion.

Material and Methods

Animals

For the preparation of hippocampal slices, male 30-day-old Wistar rats were obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil). The animals were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of 22 ± 1 °C) with free access to commercial chow and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication no. 80-23), revised in 1996, and following the regulations of the local animal housing authorities.

Material

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and other materials for cell culture were purchased from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA). D-[3-³H] glucose (20 Ci/mmol) was purchased from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), S100B protein, anti-S100B antibody (SH-B1), o-phenylenediamine (OPD), S100B protein, Anti-S100B antibody (clone SH-B) and Anti-GFAP (clone G-A-5) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO- USA). Anti- RAGE (clone N-16) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA-USA). Other reagents were purchased from local commercial suppliers (Sulquímica, Labsul or Biogen; Porto Alegre, Brazil).

C6 Astroglial Cell Culture

The C6 astroglial cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MA, USA) and cultured according to a previously

described procedure (23–25). Late passage cells (i.e. after at least 100 passages) were seeded in flasks and cultured in DMEM (pH 7.4) containing 5% FBS, 0.1% amphotericin B and 0.032% gentamicin. Cells were maintained at a temperature of 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air. At log phase, cells were detached from the culture flasks using 0.05% trypsin/ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) and seeded (5×10^3 cells/cm²) on 24-well plates. The cells were maintained under the same conditions, for three days or until reaching confluence.

Preparation and incubation of brain slices

Rats were decapitated and their hippocampi were quickly dissected out. Transverse sections (300 µm) of tissue were rapidly obtained using a McIlwain tissue chopper. One slice was placed into each well of a 24-well culture plate. Slices were incubated in oxygenated physiological medium containing, in mM, 120 NaCl, 2.0 KCl, 1.0 CaCl₂, 1.0 MgSO₄, 25.0 HEPES, 1.0 KH₂PO₄ and 10.0 glucose, pH 7.4, at room temperature. The medium was changed every 15 min with fresh medium. Following a 120-min equilibration period, slices were incubated in medium in the presence/absence of treatment conditions for 1 h at 30 °C.

Treatments

C6 astroglial cells and hippocampal slices were treated with different S100B for 15 min at concentrations of 0.01, 0.05 and 0.1 ng/ml, in DMEM without FBS or saline medium, for the glucose-uptake assay or with regular insulin for 1 hour at indicated concentrations (Humalin R, Lilly France), in order to evaluate the glucose uptake and S100B secretion, respectively. The cells and slices were

incubated with S100B, in the presence of anti-S100B, anti-RAGE or anti-GFAP antibodies in 1:50; 1:100 and 1:500 dilutions. The inhibitors, PD98059 (10 μ M, MEK inhibitor), SB203580 (10 μ M, p38 inhibitor), SP600125 (10 μ M, JNK inhibitor), or LY294002 (10 μ M, PI₃K inhibitor) were added 15 min before S100B or insulin exposure.

ELISA for S100B

The S100B concentration was determined in the culture medium and in the incubation medium of slices at 1 h. S100B levels were determined by ELISA, as described previously (Leite et al., 2008). Briefly, 50 μ L of sample plus 50 μ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate, previously coated with anti-S100B monoclonal antibody (SH-B1, from Sigma). Anti-S100 polyclonal antibody (from DAKO) was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

Glucose uptake assay

Glucose uptake was performed as previously described (26), with some modifications. Briefly, C6 astroglial cells were incubated at 35 °C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄·7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, and 5.55 glucose, adjusted to pH 7.2. The assay was started by the addition of 0.1 μ Ci/well D-[3-³H] glucose. The incubation was stopped after 15 min by removing the medium and rinsing the cells twice with ice-cold HBSS. The cells were then lysed in a 0.5M NaOH solution. Radioactivity was

measured using a scintillation counter. Glucose uptake was calculated by subtracting the non-specific uptake, obtained by the glucose transporter inhibitor, cytochalasin B (25 μ M), from the total uptake. This assay demonstrates glucose uptake as an indirect measurement of intracellular tritiated-glucose and derived-metabolites. Results were expressed as nmol/mg protein/min.

Protein Determination

Protein content was measured by Lowry's method with some modifications using bovine serum albumin as the standard (27).

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. Each experiment was performed in triplicate from at least three independent cultures. The data were subjected to one way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All analyses were performed using the Graphpad Prism software version 6 (La Jolla, CA, USA).

Results

Glucose uptake is reduced in C6 astroglial cells exposed to S100B

The addition of exogenous S100B (at 0.05 or 0.1 ng/ml) reduced the glucose uptake in C6 astroglial cells when compared to basal conditions (Fig. 1A) ($p = 0.0034$ e $f_{(3,40)} = 5.346$). In order to confirm the specificity of exogenous S100B and to exclude the possible interference of other compounds, we added the anti-S100B antibody (diluted 1:500; 1:100 or 1:50) to cells that were previously incubated with 0.1 ng/ml S100B. Glucose uptake returned to basal levels (Fig.

1B) ($p=0.0004$ e $f_{(4,19)}=9.691$), indicating that the reduction in glucose uptake was caused by S100B. Aiming to evaluate whether the effect of S100B occurs via RAGE, we added the anti-RAGE antibody (diluted at 1:500, 1:100 or 1:50), which abolished the effect of S100B (Fig. 1C) ($p=0.009$ e $f_{(4,22)}=4.421$). In order to evaluate whether the blocking effect of anti-S100B and anti-RAGE was a non-specific effect due to any antibody addition, we exposed 0.1 ng/mL S100B-treated C6 cells to anti-GFAP at the same dilutions (Fig. 1D) ($p=0.0001$ e $f_{(4,20)}=9.851$).

MAPK signaling mediates the S100B-induced reduction in glucose uptake in C6 astroglial

MAPK is a well-characterized pathway in RAGE signaling. Therefore, we evaluated whether this pathway is involved in the effect of S100B on glucose uptake, by adding MAPK inhibitors 15 minutes before S100B treatment. The PD98059 inhibitor, which blocks the upstream kinase of ERK1/2, returned glucose uptake to basal levels (Fig. 2A) ($p<0.0001$ e $f_{(3,39)}=9.741$). PD98059 per se was not able to alter glucose uptake. SP600125, a MAPK/JNK inhibitor (Fig. 2B) ($p=0.0004$ e $f_{(3,16)}=10.74$), or SB203580, a MAPK/p38 inhibitor (Fig. 2C) ($p<0.0001$ e $f_{(3,16)}=16.14$), did not alter the effect of S100B on glucose uptake. Unexpectedly, SP600125 (but not SB203580), alone, caused a decrease in glucose uptake.

Glucose uptake is also reduced in hippocampal slices exposed to S100B

When acute hippocampal slices were exposed to exogenous S100B protein (Fig. 3A) ($p=0.0152$ e $f_{(3,26)}=4.189$), a reduction in glucose uptake was also observed, similarly to effects obtained in isolated C6 glial cells. As in C6 glial

cells, the addition of anti-RAGE antibody (diluted at 1:500 and 1:100) blocked the effect of S100B on glucose uptake (Fig. 3B) ($p= 0.0055$ e $f_{(3,28)} = 5.207$).

ERK signaling is also involved in the S100B-induced reduction in glucose uptake in hippocampal slices

In hippocampal slices, we performed the same treatments with MAPK inhibitors in order to evaluate the pathways involved in the effect of S100B on glucose uptake. We observed that the reduction in glucose uptake induced by S100B was prevented by PD98059, which blocks ERK1/2 activation (Fig. 4A) ($p<0.0001$ e $f_{(3,23)} = 19.81$). Moreover, in contrast to results obtained in C6 cells, SP600125 and SB203580, inhibitors of Jnk and p38, respectively, also prevented the reduction in glucose uptake induced by S100B (Figures 4B) ($p=0.0004$ e $f_{(3,20)} = 10.74$) and (4C) ($p<0.0001$ e $f_{(3,18)} = 16.14$). In contrast to results in C6 cells, SP600125 alone increased the glucose uptake in hippocampal slices.

Glucose uptake is increased in C6 astroglial cells and hippocampal slices exposed to insulin

Aiming to confirm the effect of insulin on glucose metabolism in brain tissue and to evaluate its effect in our preparations, we exposed C6 astroglial cells and acute hippocampal slices to different concentrations of insulin (0.05-10 nM). C6 cells significantly increased glucose uptake at 10 nM (Fig 5A) ($p= 0.0017$ e $f_{(3,12)} = 9.526$) and this effect was abolished by incubation with LY294002, an inhibitor of the PI-3K pathway (Fig 5B) ($p= 0.0363$ e $f_{(3,12)} = 3.931$). The same results were obtained in hippocampal slices. Glucose uptake was stimulated by insulin even at lower concentrations (at 1 nM) (Fig 5C) ($p= 0.0027$ e $f_{(3,17)} =$

7.099) and this effect was blocked by incubation with LY294002 (Fig 5D) ($p=0.0094$ e $f_{(3,19)}=5.082$).

Insulin positively modulates S100B secretion in hippocampal slices

Insulin (from 0.05 to 10 nM) did not affect S100B secretion in C6 astroglial cells (Fig. 6A) ($p=0.8735$ e $f_{(3,41)}=0.2321$); however, PI3K pathway inhibition with LY294002 increased the secretion of S100B (Fig 6B) ($p<0.0001$ e $f_{(3,35)}=18.80$). In contrast, in hippocampal slices, insulin directly (at 10 nM) induced S100B secretion (Fig 6C) ($p=0.0027$ e $f_{(3,16)}=7.252$), but the PI3K inhibitor was not able to prevent this effect (Fig 6D) ($p=0.0147$ e $f_{(3,28)}=4.168$). Together these results suggest a positive modulation of insulin on S100B secretion.

Discussion

The brain's sensitivity to insulin, particularly concerning to glucose metabolism, is well characterized. Some of our previous studies have provided findings to suggest a connection between extracellular levels of S100B and cell glucose metabolism in brain tissue (19,28,29), but this association has not been characterized to date. Moreover, no association between insulin and extracellular S100B, i.e. S100B secretion, has been described. The findings of the present study indicate that extracellular S100B negatively modulates glucose metabolism in the brain tissue, at least in glial cells, in support of an association between S100B and glucose metabolism. Moreover, our data indicate that insulin upregulates S100B secretion. Furthermore, results suggest a possible physiological link between insulin and S100B in glucose metabolism in brain tissue.

We used two preparations in this study, C6 glioma cell and acute hippocampal slices. C6 glioma cells were employed as they are astroglial-like after 100 passages, expressing glutamine synthetase (23), and demonstrating glutamate uptake activity (30), and the expression of GFAP and S100B (31), but secreting lower quantities of S100B when compared to cultured astrocytes, thus facilitating studies using the exogenous addition of S100B (25). On the other hand, we used hippocampal slices, which are more complex cell preparations that resemble *in vivo* conditions. Hippocampal tissue contains functional and interactive neurons and astrocytes that secrete S100B, but also in lower quantities than in primary astrocytes in culture (32). Moreover, we used low concentrations of S100B in these experiments exogenous, which were much lower than mM toxic levels reported *in vitro*, allowing us to speculate regarding an extracellular physiological role of this protein in glucose metabolism.

S100B induced a decrease in glucose uptake, in C6 glial cells and hippocampal slices, and this effect was mediated by RAGE. Moreover, in both preparations, this effect involved ERK, a classical pathway involved in RAGE activation by S100B (12,33). Another MAPK, p38, seems to also be involved in this S100B-induced effect, as demonstrated by results obtained in acute hippocampal slices.

We should draw attention to an aspect of our experimental conditions, which does not represent a limitation, but may limit an exact conclusion; C6 cells and hippocampal slices were incubated with D-[3-³H] glucose, which is uptaken and metabolized. However, herein, we use glucose metabolism as synonymous of glucose uptake. The S100B effect involves glucose uptake, but at this moment, we cannot say whether it directly involves glucose transport and/or glucose

consumption in its various metabolic fates in glial cells. Nevertheless the final effect of S100B on glucose metabolism is clear.

Insulin, at 1 and/or 10 nM, was able to increase glucose metabolism in C6 glial cells and acute hippocampal slices, and this effect involved PI-3K signaling. Insulin (at 10 nM) was able to induce an increase in S100B secretion in hippocampal slices, but not in C6 glial cells. However, inhibition of PI-3K increased S100B secretion in C6 glial cells, suggesting that insulin signaling maybe increase S100B secretion. This link could help to explain decreases in the cerebrospinal fluid S100B levels under conditions of impaired insulin signaling, such as STZ-induced dementia (28,34) or reduced insulin signaling such as in the ketogenic diet (35).

Other observations could also be related to this link. For example, antipsychotics appear to decrease insulin sensitivity (36), as well as S100B secretion (37,38). Moreover, antidepressants, such as fluoxetine, which increase S100B secretion (39) seem to increase insulin sensitivity (40). These observations do not clarify the dilemma of which event occurs first, but indicate the possibility of glial S100B secretion modulation by insulin.

In addition, recent data from adipocytes suggest that the super expression of RAGE (the receptor for S100B) reduces insulin sensitivity (41), indicating a possible cross-talk between insulin and S100B. Ongoing experiments in our lab using RAGE silencing will help to clarify this possibility in brain tissue. However, independently of this other possibility, we conceive a link between insulin and S100B in the modulation of brain glucose metabolism (see Fig 7). Insulin stimulates brain glucose metabolism, while S100B does the opposite. However,

insulin also stimulates S100B, which would work as a brake or negative feedback for the action of insulin. This brake could have different activity in neuron and glial cells, due to the different amounts of RAGE, in physiological and pathological conditions. For example, increased RAGE has been reported in diabetes mellitus and Alzheimer's disease (42). Such an increase could result in a decrease in glucose metabolism via the activation of S100B. It is possible that S100B secretion, in this case, is induced by cytokines for example (24), because insulin signaling is impaired. Moreover, the beta-amyloid peptide (rather than S100B) may activate RAGE in Alzheimer's disease.

This insulin-S100B axis of regulation in the brain is different from that of the adipose tissue, where insulin decreases S100B secretion (21). Accordingly, increases in glucose/insulin levels in healthy human subjects were recently reported to be accompanied by a reduction in serum S100B levels (22). It is not known whether extracellular S100B in adipose tissue also decreases glucose uptake, but RAGE overexpression in adipocytes is associated with the suppression of glucose transporter type 4 (dependent on insulin) and attenuates insulin-stimulated glucose uptake (41). At this moment, it can only be speculated that, in a glucose-rich environment, the insulin-S100B axis drives glucose to adipocytes and saves astrocytes from massive flux. On the other hand, under fasting conditions, this brake would be turned off in the brain tissue (19).

In summary, data from C6 glial cells and acute hippocampal slices indicate that: (i) S100B, at physiological levels, decreases glucose metabolism via RAGE/ERK signaling, and (ii) insulin stimulates S100B secretion via PI-3K signaling. Such associations allow us to conceive an insulin-S100B mediated

modulation of glucose utilization, which furthers our understanding of glucose metabolism in several conditions of physiological (e.g. ketosis), pathological (e.g. Alzheimer's disease) and pharmacological exposure (e.g. antipsychotics) to insulin.

References

1. Belanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009 Sep;11(3):281–95.
2. Pellerin L, Magistretti PJ. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry*. 2004 Feb;10(1):53–62.
3. Pellerin L. Brain energetics (thought needs food). *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 Nov;11(6):701–5.
4. Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther*. 2012 Oct;136(1):82–93.
5. Gerozissis K. Brain insulin and feeding: a bi-directional communication. *Eur J Pharmacol*. 2004 Apr 19;490(1-3):59–70.
6. Unger JW, Moss AM, Livingston JN. Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. *Neuroscience*. 1991;42(3):853–61.
7. Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res*. 2012;2012:384017.
8. Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol*. 2013 Sep;108:21–43.
9. De la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012 Jan;9(1):35–66.

10. Steiner J, Bernstein H-G, Bogerts B, Gos T, Richter-Landsberg C, Wunderlich MT, et al. S100B is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: Influence of serum and glucose deprivation. *Neuroscience*. 2008 Jun 23;154(2):496–503.
11. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 2003 Apr 15;60(6):540–51.
12. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1793(6):1008–2
13. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013 Jan;13(1):24–57.
14. Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, et al. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res*. 2004 Apr;29(4):735–40.
15. Gonçalves C-A, Leite MC, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*. 2008 Jul;41(10-11):755–63.
16. Kleindienst A, Hesse F, Bullock MR, Buchfelder M. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog Brain Res*. 2007;161:317–25.
17. Rojas A, Delgado-López F, González I, Pérez-Castro R, Romero J, Rojas I. The receptor for advanced glycation end-products: a complex signaling scenario for a promiscuous receptor. *Cell Signal*. 2013 Mar;25(3):609–14.
18. Biasibetti R, Tramontina AC, Costa AP, Dutra MF, Quincozes-Santos A, Nardin P, et al. Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces

acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behav Brain Res.* 2013 Jan 1;236(1):186–93.

19. Vizuete AF, de Souza DF, Guerra MC, Batassini C, Dutra MF, Bernardi C, et al. Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. *Life Sci.* 2013 May 20;92(17-19):923–8.

20. Gonçalves CA, Leite MC, Guerra MC. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:790431.

21. Suzuki F, Kato K. Inhibition of adipose S-100 protein release by insulin. *Biochim Biophys Acta.* 1985 May 30;845(2):311–6.

22. Steiner J, Bernstein H-G, Schiltz K, Haase T, Meyer-Lotz G, Dobrowolny H, et al. Decrease of serum S100B during an oral glucose tolerance test correlates inversely with the insulin response. *Psychoneuroendocrinology.* 2014 Jan;39:33–8.

23. Bobermin LD, Quincozes-Santos A, Guerra MC, Leite MC, Souza DO, Gonçalves C-A, et al. Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. *Plos One.* 2012;7(12):e52164.

24. De Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, et al. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol.* 2009 Jan 3;206(1-2):52–7.

25. Tramontina AC, Nardin P, Quincozes-Santos A, Tortorelli L, Wartchow KM, Andrezza AC, et al. High-glucose and S100B stimulate glutamate uptake in C6 glioma cells. *Neurochem Res.* 2012 Jul;37(7):1399–408.

26. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 25;91(22):10625–9.
27. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977 Dec;83(2):346–56.
28. Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, Quilfeldt JA, et al. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis*. 2009;17(1):193–202.
29. Tramontina AC, Wartchow KM, Rodrigues L, Biasibetti R, Quincozes-Santos A, Bobermin L, et al. The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2011 Nov;118(11):1641–9.
30. Baber Z, Haghghat N. Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. *Metab Brain Dis*. 2010 Dec;25(4):413–8.
31. Esposito E, Iacono A, Muià C, Crisafulli C, Mattace Raso G, Bramanti P, et al. Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J Pineal Res*. 2008 Jan;44(1):78–87.
32. Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, et al. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res*. 2009 Aug 15;87(11):2439–46.
33. Gonçalves CA, Gottfried C, Dunkley PR. The use of permeabilized cells to assay protein phosphorylation and catecholamine release. *Neurochem Res*. 2000 Jun;25(6):885–94.

34. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):217–33
35. Ziegler DR, Oliveira DL, Pires C, Ribeiro L, Leite M, Mendez A, et al. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res.* 2004 Dec;50(4):375–9.
36. Deng C. Effects of antipsychotic medications on appetite, weight, and insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013 Sep;42(3):545–63.
37. De Souza DF, Wartchow K, Hansen F, Lunardi P, Guerra MC, Nardin P, et al. Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013 Jun;43:14–22.
38. Steiner J, Walter M, Guest P, Myint AM, Schiltz K, Panteli B, et al. Elevated S100B levels in schizophrenia are associated with insulin resistance. *Mol Psychiatry.* 2010 Jan;15(1):3–4.
39. Tramontina AC, Tramontina F, Bobermin LD, Zanotto C, Souza DF, Leite MC, et al. Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008 Aug 1;32(6):1580–3.
40. McIntyre RS, Soczynska JK, Konarski JZ, Kennedy SH. The effect of antidepressants on glucose homeostasis and insulin sensitivity: synthesis and mechanisms. *Expert Opin Drug Saf.* 2006 Jan;5(1):157–68.
41. Monden M, Koyama H, Otsuka Y, Morioka T, Mori K, Shoji T, et al. Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: involvement of Toll-like receptor 2. *Diabetes.* 2013 Feb;62(2):478–89.
42. Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW. The S100B/RAGE Axis in Alzheimer's Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:539581.

Figure legends

Figure 1. Evaluation of glucose uptake in C6 glioma cells exposed to S100B. After confluence, the medium of C6 glioma cells were replaced by HBSS containing 0.1 $\mu\text{Ci/well}$ D-[3-³H] glucose and incubated for 15 min in the presence of S100B at different concentrations (A). C6 glioma cells were incubated for 15 min in the presence of 0.1 ng/mL S100B and in the presence of different anti-S100B antibody dilutions (B) or anti-RAGE (C) or anti-GFAP (D). Data are shown as perceptual means \pm SE of 6 independent experiments performed in triplicate. The line represents control value (100%). *Significantly different from basal by one-way ANOVA followed by Tukey's test for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$.

Figure 2. Effect of MAPK inhibitors on glucose uptake in C6 glioma cells exposed to S100B. After confluence, the mediums of the C6 glioma cells were replaced with HBSS containing 0.1 $\mu\text{Ci/well}$ D-[3-³H] glucose and incubated for 15 min in the presence of 0.1 ng/ml S100B and in the absence or presence of 10 μM PD98059 (A) or 10 μM SP600125 (B) or 10 μM SB203580 (C). Data are shown as perceptual means \pm SE of 6 independent experiments performed in triplicate. The line represents control value (100%). ** Significantly different from basal by one-way ANOVA followed by Tukey's test for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$.

Figure 3. Evaluation of glucose uptake in hippocampal slices exposed to S100B. (A) Hippocampal slices were treated for one hour with different S100B concentrations. After the treatment, the slices were incubated with 0.1 $\mu\text{Ci/well}$ D-[3-³H] glucose for 30 min. (B) Hippocampal slices were treated for one hour in the presence of S100B and in the presence of different concentrations of anti-

RAGE antibody and then incubated with 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ D-[3- ^3H] glucose for 30 min. Data are shown as perceptual means \pm SE of 6 independent experiments performed in triplicate. The line represents control value (100%). * Significantly different from basal by one-way ANOVA followed by Tukey's test for $p < 0.05$.

Figure 4. Effect of MAPK inhibitors on glucose uptake in hippocampal slices exposed to S100B. Hippocampal slices were treated for one hour with different S100B concentrations. After the treatment, the slices were incubated for 30 min with 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ D-[3- ^3H] glucose in the presence of 10 μM PD98059 (A) or 10 μM SP600125 (B) or 10 μM SB203580 (C). Data are shown as perceptual means \pm SE of 6 independent experiments performed in triplicate. The line represents control value (100%). *** Significantly different from basal by one-way ANOVA followed by Tukey's test for $p < 0.001$.

Figure 5. Evaluation of glucose uptake in the presence of exogenous insulin and PI3K inhibitor. (A) After confluence, the C6 cells were treated with different insulin concentrations for 1 hour. (B) After confluence, the C6 cells were treated in the presence of 10 μM insulin and 10 μM LY294002, a PI3K inhibitor for 1 hour. (C) Hippocampal slices were treated with different insulin concentrations for 1 hour. (D) Hippocampal slices were treated in the absence and presence of 10 μM insulin and in the presence of 10 μM LY294002. Slices were then incubated with 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ D-[3- ^3H] glucose for 30 min in the presence of treatments. Data are shown as perceptual means \pm SE of 6 independent experiments performed in triplicate. The line represents control value (100%). * Significantly different from basal by one-way ANOVA followed by Tukey's test for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$.

Figure 6. Evaluation of S100B secretion in the presence of exogenous insulin and PI3K inhibitor. (A) After confluence, the medium of the C6 cells was replaced by FBS-free medium with different insulin concentrations for 1 hour. (B) After confluence, cell medium was replaced by FBS-free medium in the absence and presence of 10 μ M insulin and in the absence and presence of 10 μ M LY294002, a PI3K inhibitor for 1 hour. (C) Hippocampal slices were treated with different insulin concentrations for 1 hour. (D) Hippocampal slices were treated in the absence and presence of 10 μ M insulin and in the absence and presence of 10 μ M LY294002, a PI3K inhibitor for 1 hour. The S100B-secreted content was measured by ELISA Data are shown as perceptual means \pm SE of 6 independent experiments performed in triplicate. The line represents control value (100%). * Significantly different from basal by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$.

Figure 7. Mechanism of action of Insulin and S100B on glial glucose metabolism. Insulin stimulates S100B secretion from glial cells, as well as glucose metabolism. Both actions are inhibited by the addition of LY294002 (LY), a PI3K inhibitor. Extracellular S100B, in turn, inhibits glucose uptake and/or metabolism in glial cells and this effect is blocked by the PD98059 inhibitor (PD), which blocks the upstream kinase of ERK1/2, and anti-RAGE antibody.

Figure 1.

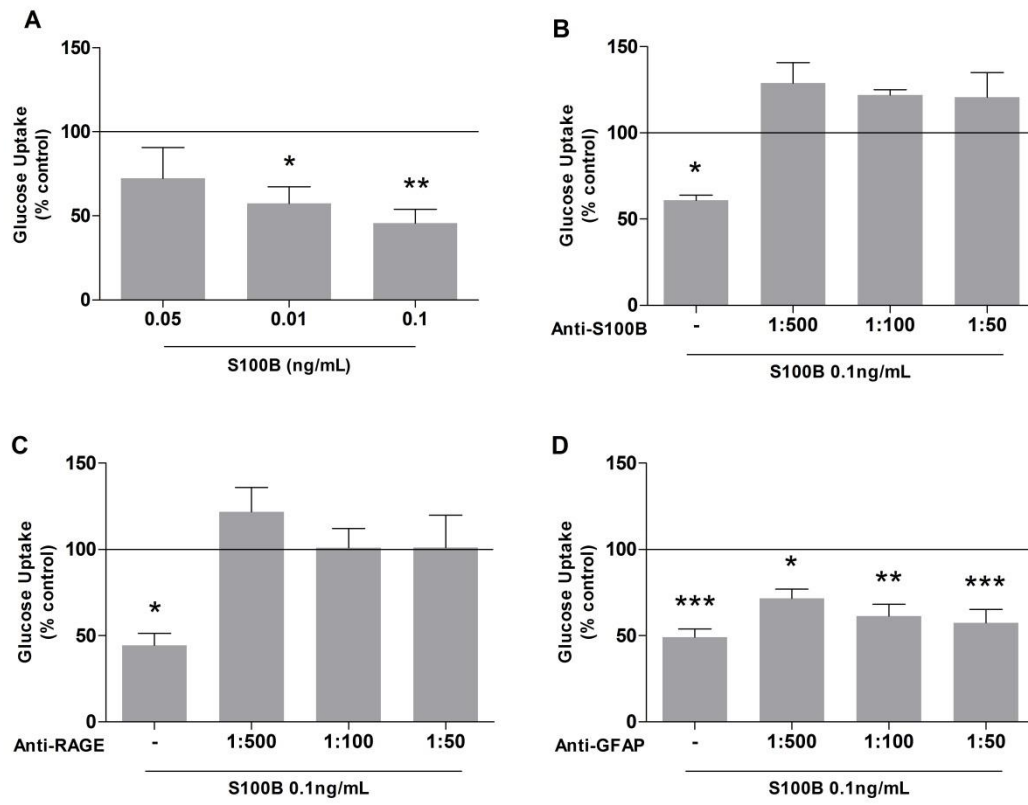


Figure 2.

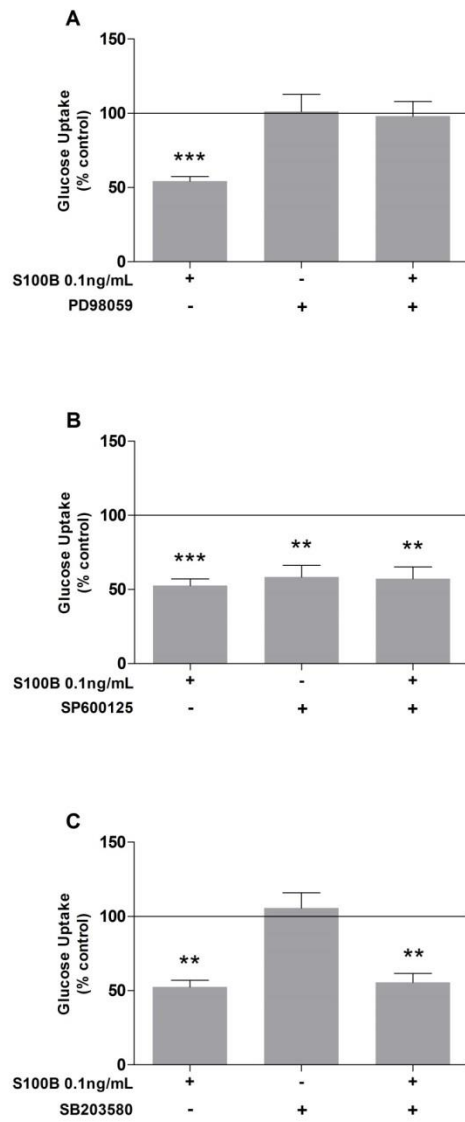


Figure 3.

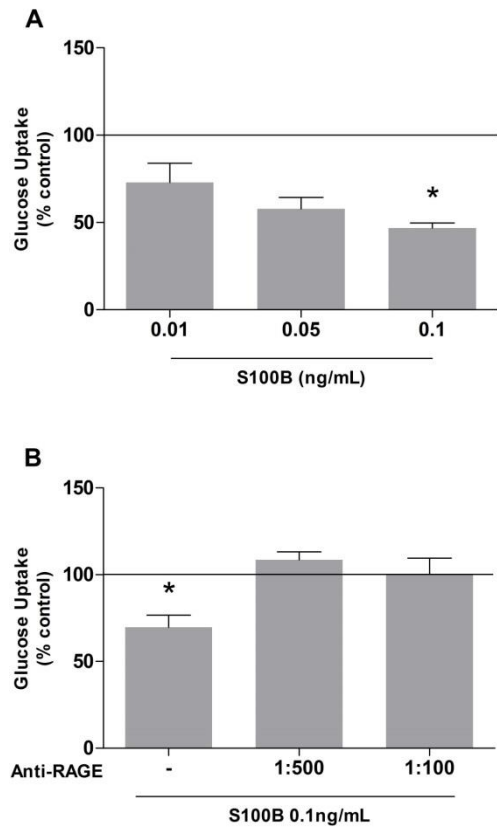


Figure 4.

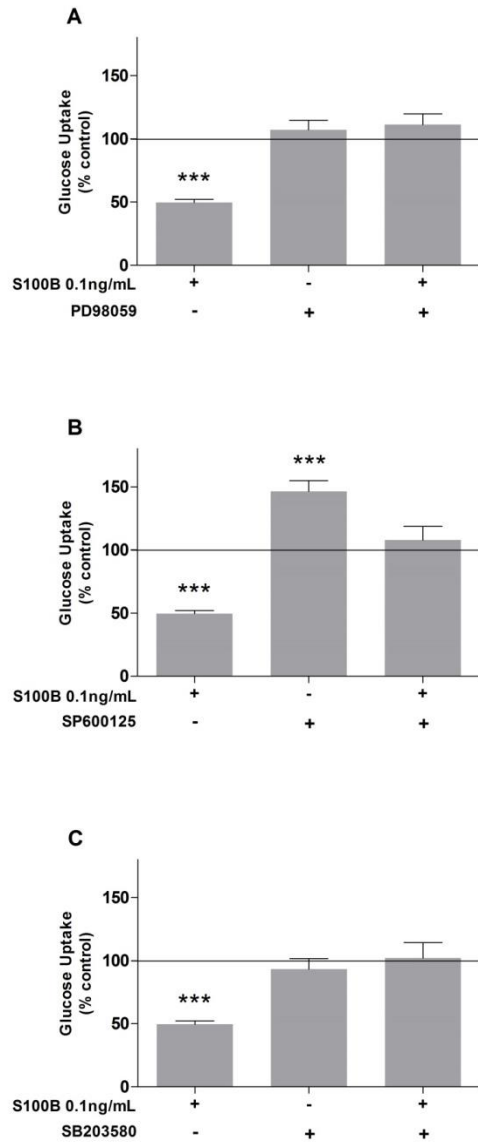


Figure 5.

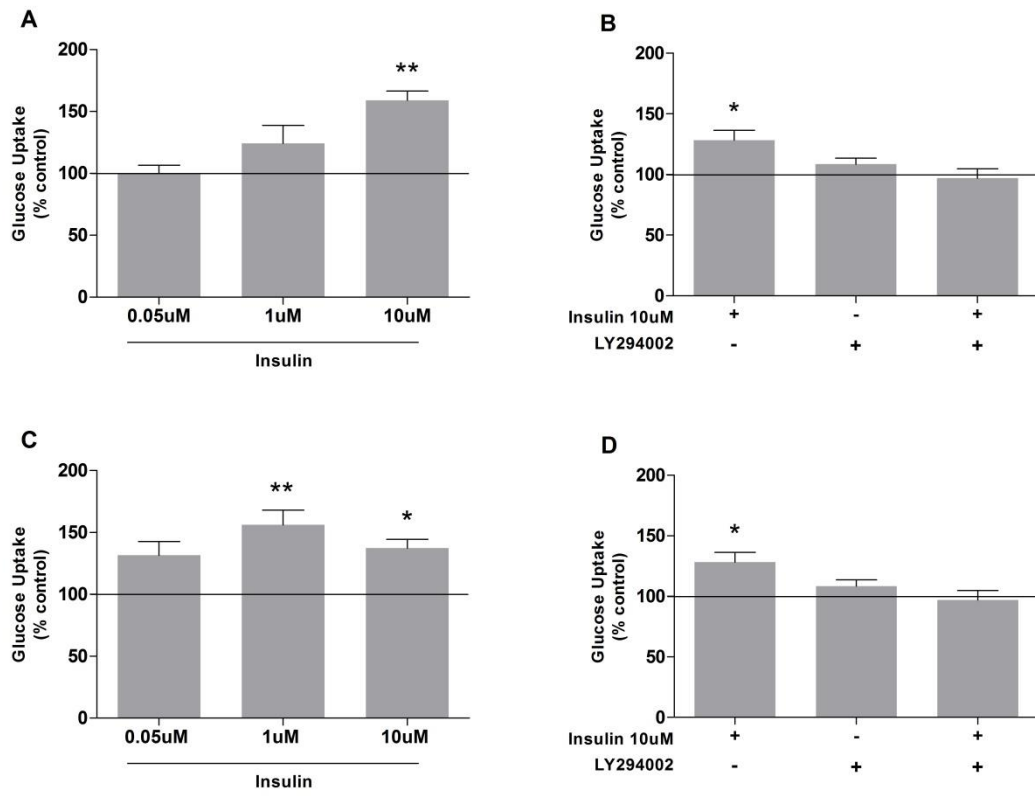


Figure 6.

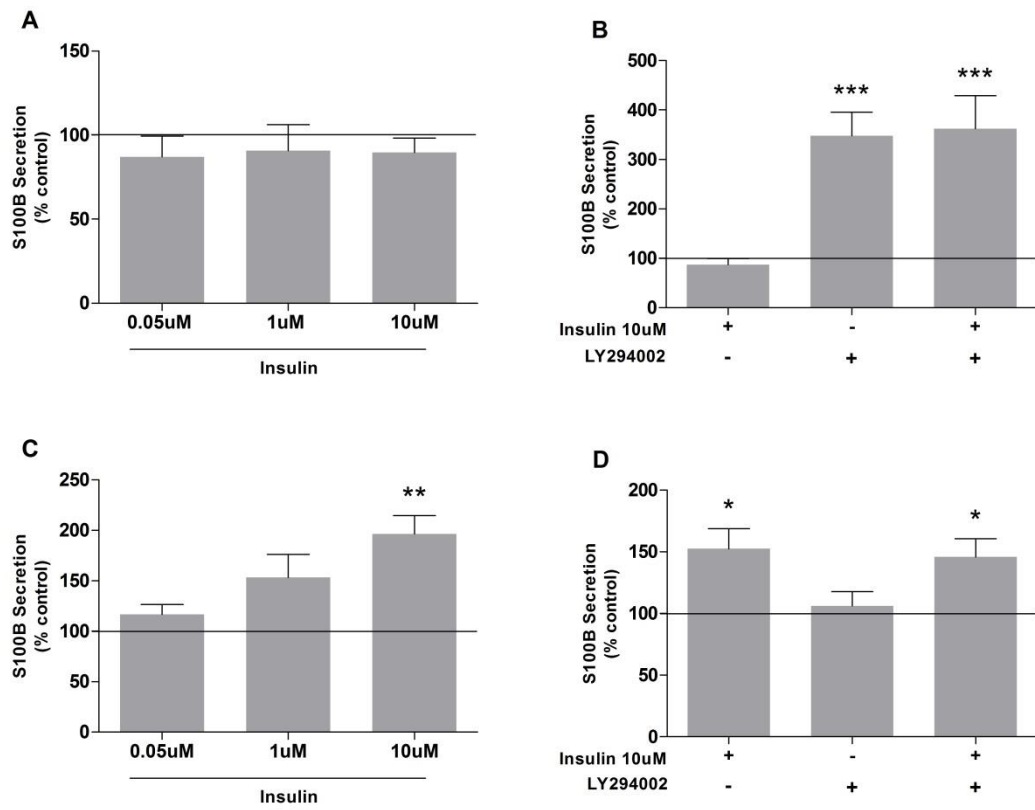
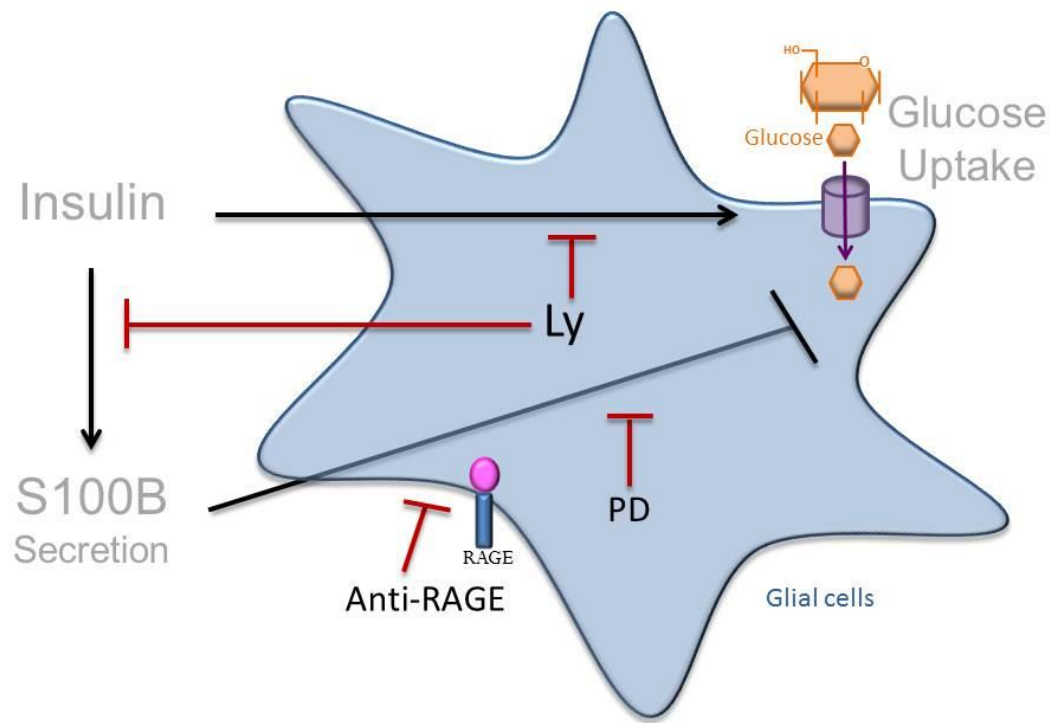


Figure 7.



Parte III

3. DISCUSSÃO

O tecido cerebral utiliza principalmente como fonte energética a glicose, que através do metabolismo oxidativo é convertido a ATP para sobrevivência celular. O controle rígido do metabolismo energético é essencial para a manutenção do SNC (Nehlig, 2004), e várias são as maneiras para realizar este controle. Já está bem caracterizada que há uma sensibilidade do cérebro a insulina, particularmente em relação ao metabolismo da glicose.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa levantaram algumas questões sobre uma possível relação entre os níveis extracelulares de S100B e o metabolismo da glicose celular no tecido cerebral (Rodrigues et al., 2009; Tramontina et al., 2011; Vizuite et al., 2013), porém essa ligação ainda não havia sido estudada. Além disso, é desconhecido se existe uma conexão entre a insulina e a proteína S100B extracelular.

O presente trabalho mostra que a S100B extracelular, em concentrações fisiológicas, modula negativamente o metabolismo da glicose no tecido cerebral, causando uma redução na captação de glicose em células gliais, de acordo com a hipótese anteriormente levantada, de que existiria uma relação entre a S100B e o metabolismo da glicose. Além disso, os nossos dados indicam que a insulina estimula a secreção de S100B, mostrando assim mais uma ligação. Portanto, iremos discutir uma possível relação fisiológica entre a insulina e a S100B no metabolismo da glicose no tecido cerebral.

Foram utilizados dois modelos neste estudo: células astrogliais C6 e fatias hipocâmpais agudas. Ambos os modelos secretam quantidades inferiores da proteína S100B quando comparados com a cultura primária de astrócitos, tornando assim mais

fácil o estudo utilizando a adição exógena de S100B (Leite et al., 2009; Tramontina et al., 2012). Além disso, neste trabalho foram avaliados níveis exógenos de S100B na ordem de (picomolar) pM, ou seja, distantes de concentrações tóxicas, na ordem de (milimolar) mM, permitindo-nos assim especular sobre um papel fisiológico extracelular desta proteína no metabolismo da glicose.

Foi observado neste trabalho que a S100B induziu uma diminuição na captação de glicose nas células astrogliais C6 e nas fatias de hipocampo, e que este efeito foi mediado pelo receptor RAGE. Não é claro se esta redução é devido a uma diminuição no consumo de glicose pelas células, ou porque ocorre um bloqueio do transportador de glicose. Em ambos os pressupostos, a concentração de glicose extracelular se apresenta aumentada.

A S100B pode agir por ligação com o receptor RAGE, que mostrou ser o receptor responsável pela transdução de sinal intracelular de S100B (Huttunen et al., 2000). RAGE é composto de um domínio de imunoglobulina de tipo V e dois domínios do tipo C de imunoglobulina (C1 e C2) (Schmidt et al., 1992). VC1 (complexo V) mostrou possuir ligação aos produtos de glicação avançada (AGEs) e para a proteína S100B (Dattilo et al., 2007). Para avaliar se o efeito da S100B sobre a captação de glicose foi mediado por ligação ao RAGE, bloqueou-se o receptor com um anticorpo anti-RAGE, que é específico para a região C-terminal do complexo V, região de ligação da S100B. Observou-se que com este bloqueio, foi capaz de prevenir os efeitos causados pela ação da S100B, com a captação de glicose retornando aos níveis basais, o que mostra que o efeito da S100B sobre a captação de glicose foi realmente mediado via RAGE.

A S100B pode modular o receptor RAGE por duas vias, dependendo da sua concentração: concentrações nanomolares ativam Ras / Mek / ERK-1/2 / NF-kb, causando uma regulação positiva do fator anti-apoptótico Bcl-2 de modo a proteger os neurônios, enquanto que em concentrações micromolares ativam MEK-ERK 1/2 com excesso de produção de espécies reativas de oxigênio levando à neurotoxicidade (Huttunen et al., 2000). Muitos sinais extracelulares estimulam uma cascata de sinalização intracelular específica que leva à ativação de proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs). A ERK 1/2 é uma cinase clássica que modula a cascata de MAPKKs, e desempenham papéis fundamentais na proliferação celular, diferenciação, migração e expressão gênica (Roux and Blenis, 2004). ERK 1/2 parece ser essencial na sobrevivência neuronal, plasticidade e regeneração de muitos tipos celulares do SNC (Miloso et al., 2008). Tipicamente, os receptores da superfície celular, tais como as tirosina-cinases e RAGE transmitem sinais para ativar a cascata de Raf / MEK / ERK. Wang e colaboradores mostraram que o tratamento com o interferon α (IFN α), especialmente com IFN α 2b em células C6 de glioma, causa uma diminuição do consumo de glicose e uma diminuição na expressão de GLUT1. Além disso, sabe-se que a fosforilação de membros da família de MAPK (JNK, a ERK1/2 e p38/MAPK) está envolvida na proliferação celular induzida por IFN e apoptose. Este estudo também mostrou que a ativação de JNK e de ERK1/2 em astrócitos tratados com IFN estão relacionadas com a redução do consumo de glicose (Wang et al., 2012).

Outro achado que corrobora com a suposição de que GLUTs e a cascata de MAPK estão ligadas, é a ativação de ERK1/2 por angiotensina, que leva à inibição da captação de glicose em células musculares (Izawa et al., 2005).

A partir disto, foram avaliadas as possíveis vias de sinalização possivelmente envolvidas na redução da captação de glicose pela ação de S100B exógena. Com a utilização de PD98059, inibidor de MEK/ERK1/2, mostrou-se que, em ambos os modelos utilizados, houve uma inibição do efeito causado pela S100B, e que, portanto este efeito envolveu a ERK, uma via clássica de ativação de RAGE por S100B (Donato et al., 2009; Gonçalves et al., 2000). Outras MAPKs, como a JNK/p38 também parecem estar envolvidas, com base nos resultados obtidos em fatias hipocâmpais agudas, porém, os mecanismos que ligam RAGE / ERK1/2 com os GLUTs ainda permanecem inconclusivos.

Neste momento de discussão, é importante ressaltar um aspecto de nossas condições experimentais que nos impede de obter resultados claramente conclusivos. As células C6 e as fatias de hipocampo foram incubadas com D-glicose [$3\text{-}^3\text{H}$], que é tanto captada quanto metabolizada pela célula, o que nos levou utilizar o termo “metabolismo da glicose” como sinônimo de captação de glicose. O efeito da S100B envolve a captação de glicose, porém neste momento, não podemos dizer se envolve diretamente o transporte e/ou consumo de glicose nos seus diversos destinos metabólicos nas células da glia. No entanto, o efeito final da S100B, causando redução na captação de glicose é claro.

As ações da insulina são mediadas pela ligação ao RI, receptor tirosina cinase amplamente distribuídos pelo SNC (Ramalingam and Kim, 2014). Ao contrário de outros receptores tirosina-cinases, a maioria das funções do receptor de insulina requer moléculas acessórias conhecidas como substratos do receptor. Duas principais vias de sinalização celular são ativadas pela ligação da insulina, a via da PI3K/Akt e a da

Ras/MAPK. Estas cascatas regulam diversos processos celulares, tais como a expressão gênica, síntese de proteínas, tráfego de vesículas, que resultam na regulação do metabolismo de glicose, no crescimento e diferenciação celular (Nemoto et al., 2010; Schulingkamp et al., 2000).

Quando avaliada a ação da insulina sobre a captação de glicose, foi observado que a insulina nas concentrações de 1 e/ou 10 nM foi capaz de aumentar o metabolismo de glicose nas células gliais C6 e nas fatias hipocâmpais. O efeito citado anteriormente claramente envolve a via de sinalização da PI-3K. Isto foi observado a partir da utilização de inibidor da via em questão, o que causou um bloqueio do efeito da insulina sobre o parâmetro observado.

Alguns trabalhos corroboram com este achado. Zhao e colaboradores observaram sobreposições de insulina, RI, e de transportadores de glicose (GLUT 1 e GLUT4), em diversas regiões cerebrais, principalmente hipocampo e no plexo coróide (Zhao et al., 1999). Além disso, alterações nos níveis circulantes de insulina foram descritos como moduladores da expressão de GLUT4 cerebelar (Vannucci et al., 1998), e um trabalho de 2004 descreve que a hiperinsulinemia leva a alterações na utilização da glicose no cérebro de roedores (Craft and Watson, 2004).

A confirmação de que a insulina medeia o metabolismo da glicose cerebral veio com o trabalho de Bingham e colaboradores (Bingham et al., 2002), que observaram que os níveis de insulina em jejum estimulam o metabolismo da glicose no córtex cerebral humano de forma direta (como nos tecidos periféricos) ou indireta (através da estimulação da insulina e posterior ativação neuronal). Estes autores também sugeriram que se o recrutamento de GLUTs para a membrana plasmática e o

subsequente aumento na captação de glicose se deviam ao efeito direto da insulina, o que possivelmente envolveria parcialmente o GLUT1 glial sensível à insulina, uma vez que o principal transportador de glicose neuronal (GLUT3) é insensível à insulina.

Uma via alternativa da insulina para fornecer energia para os neurônios envolve a inibição da captação de norepinefrina neuronal, com consequente ativação de receptores β -adrenérgicos gliais e liberação de glicose a partir de estoques de glicogênio astrocítico (McCall, 2004). Como resultado, o glicogênio mobilizado pode ser convertido à glicose, a qual é então transportada para o fluído extracelular via GLUT1 estimulado por insulina, constituindo assim uma fonte adicional de energia para os neurônios (Ghosh et al., 2005). Essas evidências sugerem que qualquer interferência no *cross-talk* entre insulina e o metabolismo da glicose no SNC pode prejudicar a síntese de ATP e levar à apoptose neuronal (Russell et al., 2002). Além disso, a ativação de R1s e consequentemente da via PI-3K/Akt pela ação da insulina, preveniu a diminuição da expressão da enzima hexocinase-II da via glicolítica, estimulando, assim, a glicólise em cultura neuronal de rato (Duarte et al., 2006). Isto reforça a ideia de que o cérebro é tanto suscetível à ação da insulina quanto sensível à glicose (Stockhorst et al., 2004).

No presente estudo, a insulina na concentração de 10 nM foi capaz de induzir um aumento na secreção da proteína S100B em fatias de hipocampo através da via PI-3K, mas o mesmo não foi observado em células gliais C6. Foi observado, entretanto, um efeito *per se* do inibidor da via PI-3K, causando um aumento na secreção da proteína S100B o que sugere que a sinalização da insulina talvez aumente a secreção de S100B. Este link entre a insulina e S100B, pode ajudar a explicar as diminuições nos

níveis de S100B no líquido encontradas em condições de sinalização deficiente de insulina, como na demência induzida por estreptozotocina (STZ) (Rodrigues et al., 2009; Salkovic-Petrisic and Hoyer, 2007) ou como na sinalização da insulina reduzida vista na dieta cetogênica (Ziegler et al., 2004).

Outras observações também vêm de encontro com essa correlação. Por exemplo, os antipsicóticos parecem diminuir a sensibilidade à insulina (ver Deng, 2013 para uma revisão), bem como a secreção de S100B (de Souza et al., 2013; Steiner et al., 2010), enquanto que em pacientes com esquizofrenia foi observado um aumento de S100B no soro em vários estudos (Lara et al., 2001; Rothermundt et al., 2004; Schroeter and Steiner, 2009). Além disso, o antidepressivo fluoxetina que é um inibidor seletivo da receptação de serotonina, aumenta a secreção de S100B em cultura de astrócitos e fatias hipocâmpais agudas (Tramontina et al., 2008) e parece aumentar a sensibilidade à insulina, alteração esta observada em uma investigação pré-clínica e clínica com antidepressivos em relação ao metabolismo da glicose (McIntyre et al., 2006). Esses dados reforçam a possibilidade de ligação entre os eventos, como um *feedback* negativo, onde a secreção de S100B surge para restabelecer a homeostase do metabolismo da glicose. Está claro que estas observações não esclarecem o dilema – o que vem em primeiro lugar -, mas eles estão a favor da possibilidade da modulação da secreção de S100B pela insulina.

No sistema periférico os adipócitos, como os astrócitos no SNC, apresentam intenso metabolismo da glicose. No estado alimentado, a glicose é convertida a ácidos graxos e triacilgliceróis (lipogênese). Por outro lado, os estoques de triacilgliceróis são mobilizados e degradados novamente a ácidos graxos e glicerol (lipólise) no estado de

jejum (Reshef et al., 2003). A S100B também é encontrada igualmente entre as várias células de tecidos não neurais, como adipócitos (Michetti et al., 1983), condrócitos (Stefansson et al., 1982) e células de melanoma (Cocchia et al., 1981). A secreção de S100B por adipócitos possui uma regulação positiva em resposta aos hormônios glucagon e as catecolaminas, provavelmente desencadeada por uma via mediada por monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), como a que ocorre em astrócitos (Pinto et al., 2000). A insulina, que atenua a via do AMPC em adipócitos, causa uma diminuição na secreção de S100B (Suzuki and Kato, 1985). A S100B pode inibir a fosfoglucomutase e estimular a aldolase, estes efeitos juntos conduzem a um aumento na atividade da via glicolítica em adipócitos (Landar et al., 1996; Zimmer and Van Eldik, 1986).

Além disso, dados recentes sugerem que os adipócitos com super-expressão de RAGE, que é o receptor pelo qual a S100B exerce seus efeitos intracelulares, apresentam redução na sensibilidade à insulina (Monden et al., 2013). Isso abre outra possibilidade de *cross-talk* entre a insulina e a S100B. Experimentos em andamento em nosso laboratório com silenciamento do receptor RAGE irão ajudar a esclarecer essa possibilidade no tecido cerebral. No entanto, independentemente dessa outra possibilidade, concebemos uma ligação entre a insulina e a S100B para modular o metabolismo da glicose cerebral. Assim, até agora um papel direto do efeito intracelular da S100B sobre o metabolismo da glicose nos adipócitos continua a ser uma especulação (ver Figura 1).

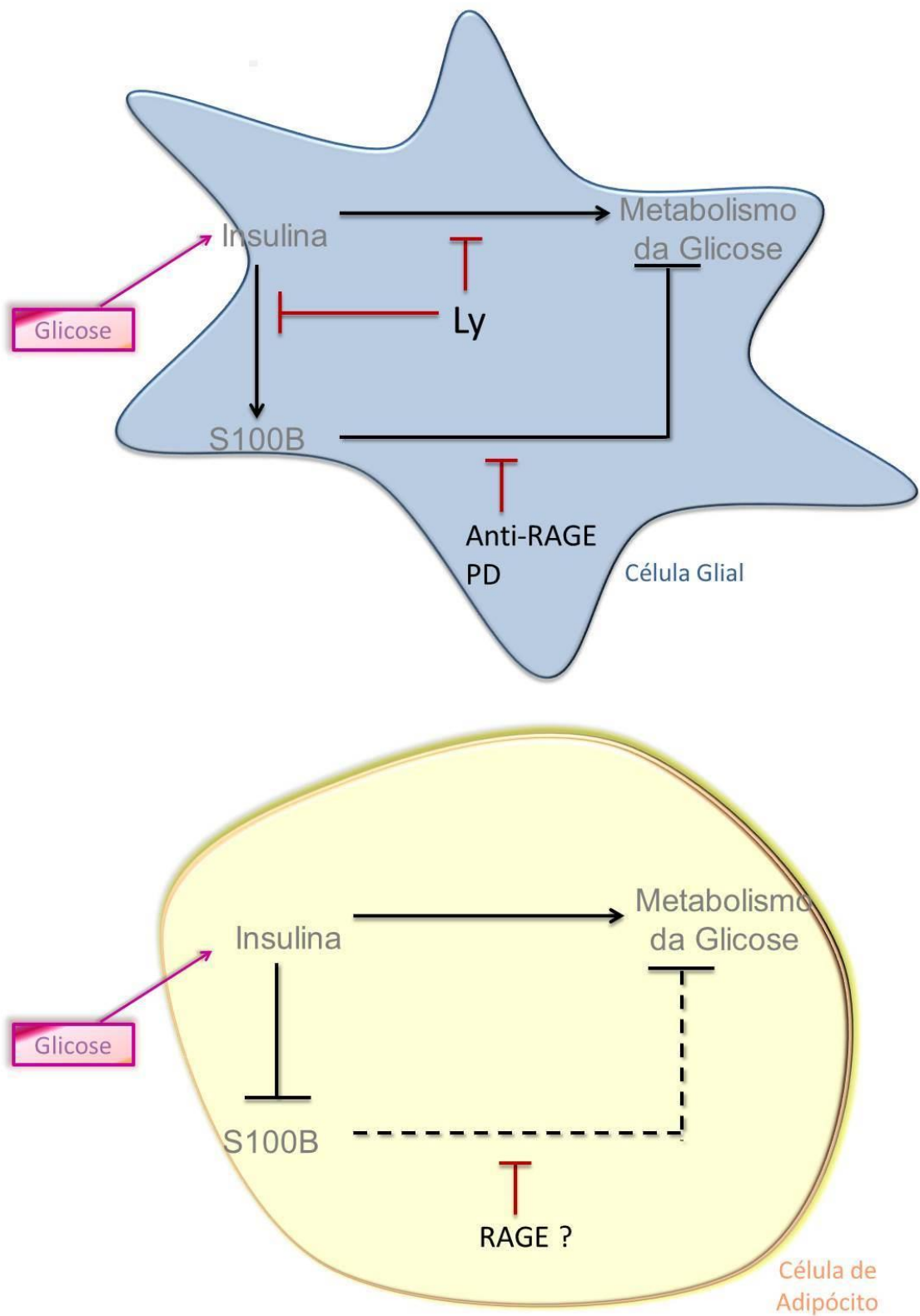


Fig. 1: Mecanismo de ação da S100B/ insulina no metabolismo da glicose glial e no tecido adiposo. A insulina estimulada pelo aumento de glicose aumenta a secreção de S100B em células gliais e

também melhora a captação e o metabolismo de glicose. Ambas as ações são inibidas por adição de LY, um inibidor de PI3K. A S100B exógena, por sua vez, inibe a captação de glicose nas células da glia, como um *feedback* negativo, sendo que este efeito é bloqueado pela adição de PD, um inibidor ERK1/2, e pelo anticorpo anti-RAGE. Em comparação, no tecido adiposo a insulina atua negativamente sobre a secreção da S100B, que por sua vez, pode estar bloqueando o metabolismo da glicose, enquanto que a insulina o aumenta. Ou seja, a insulina aumenta o armazenamento de glicose nos adipócitos, enquanto que a S100B aparentemente atua diminuindo o metabolismo de glicose, sendo as ações inversas.

A insulina estimula o metabolismo da glicose cerebral, enquanto a S100B faz o oposto. No entanto, a secreção de S100B estimulada pela insulina, funciona como um freio ou *feedback* negativo para a ação da própria insulina. Este freio pode ter atividades diferentes nos neurônios e células gliais devido à quantidade diferente do receptor RAGE, em condições fisiológicas e patológicas. Por exemplo, tem sido relatado um aumento de RAGE em diabetes mellitus e na doença de Alzheimer (Leclerc et al., 2010). Tal aumento poderia, por ativação de S100B, resultar numa diminuição do metabolismo da glicose. É possível que a secreção de S100B, neste caso, seja induzida por citocinas, por exemplo (de Souza et al., 2009), porque a sinalização de insulina está prejudicada. Além disso, possivelmente, o peptídeo beta-amilóide (em vez de S100B) na doença de Alzheimer pode estar ativando RAGE, já que o mesmo também é um ligante do receptor.

Este eixo insulina-S100B de regulação é diferente no cérebro e no tecido adiposo, onde ocorre diminuição de secreção de insulina S100B (Suzuki and Kato, 1985). Recentemente foi relatado que o aumento nos níveis de glicose/insulina em seres humanos saudáveis é acompanhado pela redução nos níveis séricos de S100B (Steiner et al., 2014). É desconhecido se a S100B extracelular no tecido adiposo

também diminui a absorção de glicose, mas a super expressão de RAGE em adipócitos está associada à supressão do transportador de glicose tipo 4 (dependente de insulina), e atenua a captação de glicose estimulada por insulina (Monden et al., 2013). Neste momento é possível especular que em um ambiente rico em glicose, o eixo insulina-S100B aciona os adipócitos para armazenarem a glicose, e protege dessa maneira os astrócitos de um fluxo em massa. Por outro lado, em uma condição de jejum, este “freio” seria desligado no tecido cerebral (Vizuete et al., 2013).

Em resumo, estes dados obtidos em preparadps de células de glioma C6 e fatias hipocampais agudas indicam que: (i) S100B, em níveis fisiológicos, por meio de sinalização RAGE/ERK, diminui o metabolismo da glicose, e (ii) a insulina estimula a secreção de S100B via sinalização por PI-3K. Tais conexões nos permitem conceber uma modulação insulina-S100B de utilização da glicose, o que contribui para ampliar o entendimento sobre o metabolismo da glicose em várias condições: fisiológico (por exemplo, cetose), patológica (doença de Alzheimer, por exemplo) e exposição farmacológica (por exemplo, antipsicóticos).

REFERÊNCIAS

- Apelt, J., Mehlhorn, G., and Schliebs, R. (1999). Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J. Neurosci. Res.* *57*, 693–705.
- Baber, Z., and Haghghat, N. (2010). Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. *Metab. Brain Dis.* *25*, 413–418.
- Banks, W.A., Jaspan, J.B., and Kastin, A.J. (1997). Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* *18*, 1257–1262.
- Baura, G.D., Foster, D.M., Porte, D., Jr, Kahn, S.E., Bergman, R.N., Cobelli, C., and Schwartz, M.W. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J. Clin. Invest.* *92*, 1824–1830.
- Belanger, M., and Magistretti, P.J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin. Neurosci.* *11*, 281–295.
- Biasibetti, R., Tramontina, A.C., Costa, A.P., Dutra, M.F., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Bernardi, C.L., Wartchow, K.M., Lunardi, P.S., and Gonçalves, C.-A. (2013). Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behav. Brain Res.* *236*, 186–193.
- Bingham, E.M., Hopkins, D., Smith, D., Pernet, A., Hallett, W., Reed, L., Marsden, P.K., and Amiel, S.A. (2002). The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes* *51*, 3384–3390.
- Blasko, I., Stampfer-Kountchev, M., Robatscher, P., Veerhuis, R., Eikelenboom, P., and Grubeck-Loebenstien, B. (2004). How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell* *3*, 169–176.
- Bobermin, L.D., Quincozes-Santos, A., Guerra, M.C., Leite, M.C., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., and Gottfried, C. (2012). Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. *Plos One* *7*, e52164.
- Bosco, D., Fava, A., Plastino, M., Montalcini, T., and Pujia, A. (2011). Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 1807–1821.
- Chen, Z., and Zhong, C. (2013). Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog. Neurobiol.* *108*, 21–43.

- Cocchia, D., Michetti, F., and Donato, R. (1981). Immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 294, 85–87.
- Craft, S., and Watson, G.S. (2004). Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.* 3, 169–178.
- Dattilo, B.M., Fritz, G., Leclerc, E., Kooij, C.W.V., Heizmann, C.W., and Chazin, W.J. (2007). The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 6957–6970.
- Deng, C. (2013). Effects of antipsychotic medications on appetite, weight, and insulin resistance. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 42, 545–563.
- Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637–668.
- Donato, R. (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 60, 540–551.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1008–1022.
- Donato, R., Cannon, B.R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D.J., and Geczy, C.L. (2013). Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 13, 24–57.
- Duarte, A.I., Proença, T., Oliveira, C.R., Santos, M.S., and Rego, A.C. (2006). Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes* 55, 2863–2870.
- Duelli, R., and Kuschinsky, W. (2001). Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 16, 71–76.
- Van Eldik, L.J., and Wainwright, M.S. (2003). The Janus face of glial-derived S100B: Beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* 21, 97–108.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., and Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439–1451.
- Esposito, E., Iacono, A., Muià, C., Crisafulli, C., Mattace Raso, G., Bramanti, P., Meli, R., and Cuzzocrea, S. (2008). Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J. Pineal Res.* 44, 78–87.
- Filippi, B.M., Abraham, M.A., Yue, J.T.Y., and Lam, T.K.T. (2013). Insulin and glucagon signaling in the central nervous system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 14, 365–375.
- Gerozissis, K. (2004). Brain insulin and feeding: a bi-directional communication. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 59–70.

Ghosh, A., Cheung, Y.Y., Mansfield, B.C., and Chou, J.Y. (2005). Brain contains a functional glucose-6-phosphatase complex capable of endogenous glucose production. *J. Biol. Chem.* *280*, 11114–11119.

Gonçalves, C.A., Gottfried, C., and Dunkley, P.R. (2000). The use of permeabilized cells to assay protein phosphorylation and catecholamine release. *Neurochem. Res.* *25*, 885–894.

Gonçalves, C.A., Leite, M.C., and Guerra, M.C. (2010). Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* *2010*, 790431.

Govers, R., Coster, A.C.F., and James, D.E. (2004). Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 6456–6466.

Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J., and Brownstein, M. (1978). Identification of insulin in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 5737–5741.

Howarth, C., Gleeson, P., and Attwell, D. (2012). Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *32*, 1222–1232.

Hoyer, S. (2004). Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur. J. Pharmacol.* *490*, 115–125.

Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., and Rauvala, H. (2000). 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.

Izawa, Y., Yoshizumi, M., Fujita, Y., Ali, N., Kanematsu, Y., Ishizawa, K., Tsuchiya, K., Obata, T., Ebina, Y., Tomita, S., et al. (2005). ERK1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucose uptake in vascular smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* *308*, 291–299.

Kimelberg, H.K., and Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *7*, 338–353.

Kimelberg, H.K., and Norenberg, M.D. (1989). Astrocytes. *Sci. Am.* *260*, 66–72, 74, 76.

Kuwabara, T., Kagalwala, M.N., Onuma, Y., Ito, Y., Warashina, M., Terashima, K., Sanosaka, T., Nakashima, K., Gage, F.H., and Asashima, M. (2011). Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *Embo Mol. Med.* *3*, 742–754.

Kuzuya, T. (1990). [Outline of glucose metabolism and its regulations]. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* *48 Suppl*, 51–59.

- Landar, A., Caddell, G., Chessher, J., and Zimmer, D.B. (1996). Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium* 20, 279–285.
- Lara, D.R., Gama, C.S., Belmonte-de-Abreu, P., Portela, L.V., Gonçalves, C.A., Fonseca, M., Hauck, S., and Souza, D.O. (2001). Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J. Psychiatr. Res.* 35, 11–14.
- Laughton, J.D., Bittar, P., Charnay, Y., Pellerin, L., Kovari, E., Magistretti, P.J., and Bouras, C. (2007). Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase. *Bmc Neurosci.* 8, 35.
- Leclerc, E., Sturchler, E., and Vetter, S.W. (2010). The S100B/RAGE Axis in Alzheimer's Disease. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010, 539581.
- Leino, R.L., Gerhart, D.Z., van Bueren, A.M., McCall, A.L., and Drewes, L.R. (1997). Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 49, 617–626.
- Leite, M.C., Galland, F., de Souza, D.F., Guerra, M.C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C., and Gonçalves, C.-A. (2009). Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J. Neurosci. Res.* 87, 2439–2446.
- Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., He, W., Lin, J.H.-C., Han, X., Takano, T., Wang, S., Sim, F.J., et al. (2007). The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 12255–12266.
- Marenholz, I., Heizmann, C.W., and Fritz, G. (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1111–1122.
- McCall, A.L. (2004). Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 147–158.
- McIntyre, R.S., Soczynska, J.K., Konarski, J.Z., and Kennedy, S.H. (2006). The effect of antidepressants on glucose homeostasis and insulin sensitivity: synthesis and mechanisms. *Expert Opin. Drug Saf.* 5, 157–168.
- Michetti, F., Dell'Anna, E., Tiberio, G., and Cocchia, D. (1983). Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res.* 262, 352–356.
- Miloso, M., Scuteri, A., Foudah, D., and Tredici, G. (2008). MAPKs as mediators of cell fate determination: an approach to neurodegenerative diseases. *Curr. Med. Chem.* 15, 538–548.

Molofsky, A.V., Krencik, R., Krenick, R., Ullian, E.M., Ullian, E., Tsai, H., Deneen, B., Richardson, W.D., Barres, B.A., and Rowitch, D.H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26, 891–907.

Monden, M., Koyama, H., Otsuka, Y., Morioka, T., Mori, K., Shoji, T., Mima, Y., Motoyama, K., Fukumoto, S., Shioi, A., et al. (2013). Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: involvement of Toll-like receptor 2. *Diabetes* 62, 478–489.

Nagamatsu, S., Nakamichi, Y., Inoue, N., Inoue, M., Nishino, H., and Sawa, H. (1996). Rat C6 glioma cell growth is related to glucose transport and metabolism. *Biochem. J.* 319 (Pt 2), 477–482.

Nehlig, A. (2004). Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 265–275.

Nemoto, T., Satoh, S., Maruta, T., Kanai, T., Yoshikawa, N., Miyazaki, S., Yanagita, T., and Wada, A. (2010). Homologous posttranscriptional regulation of insulin-like growth factor-I receptor level via glycogen synthase kinase-3beta and mammalian target of rapamycin in adrenal chromaffin cells: effect on tau phosphorylation. *Neuropharmacology* 58, 1097–1108.

Pellerin, L. (2008). Brain energetics (thought needs food). *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 11, 701–705.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2004). Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 10, 53–62.

Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55, 1251–1262.

Perea, G., and Araque, A. (2005). Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38, 375–382.

Pinto, S.S., Gottfried, C., Mendez, A., Gonçalves, D., Karl, J., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S., and Rodnight, R. (2000). Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *Febs Lett.* 486, 203–207.

Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 5073–5081.

Ramalingam, M., and Kim, S.-J. (2014). Mechanisms of action of brain insulin against neurodegenerative diseases. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* 121, 611–626.

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M., and Hanson, R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278, 30413–30416.

Rodrigues, L., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Quilfeldt, J.A., Achaval, M., and Gonçalves, C.-A. (2009). Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J. Alzheimers Dis. Jd* 17, 193–202.

Rothermundt, M., Falkai, P., Ponath, G., Abel, S., Bürkle, H., Diedrich, M., Hetzel, G., Peters, M., Siegmund, A., Pedersen, A., et al. (2004). Glial cell dysfunction in schizophrenia indicated by increased S100B in the CSF. *Mol. Psychiatry* 9, 897–899.

Roux, P.P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. Mmbr* 68, 320–344.

Russell, J.W., Golovoy, D., Vincent, A.M., Mahendru, P., Olzmann, J.A., Mentzer, A., and Feldman, E.L. (2002). High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1738–1748.

Salkovic-Petrisic, M., and Hoyer, S. (2007). Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J. Neural Transm. Suppl.* 217–233.

Schmidt, A.M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Esposito, C., Hegarty, H., Hurley, W., and Clauss, M. (1992). Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* 267, 14987–14997.

Schroeter, M.L., and Steiner, J. (2009). Elevated serum levels of the glial marker protein S100B are not specific for schizophrenia or mood disorders. *Mol. Psychiatry* 14, 235–237.

Schulingkamp, R.J., Pagano, T.C., Hung, D., and Raffa, R.B. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 855–872.

Sharma, M.D., Garber, A.J., and Farmer, J.A. (2008). Role of insulin signaling in maintaining energy homeostasis. *Endocr. Pr. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* 14, 373–380.

Sidoryk-Wegrzynowicz, M., and Aschner, M. (2013). Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. *Bmc Pharmacol. Toxicol.* 14, 23.

De Souza, D.F., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L.S., Rigo, M.M., Gottfried, C., Leal, R.B., and Gonçalves, C.-A. (2009). S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J. Neuroimmunol.* 206, 52–57.

De Souza, D.F., Wartchow, K., Hansen, F., Lunardi, P., Guerra, M.C., Nardin, P., and Gonçalves, C.-A. (2013). Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 43, 14–22.

Stefansson, K., Wollmann, R.L., Moore, B.W., and Arnason, B.G. (1982). S-100 protein in human chondrocytes. *Nature* 295, 63–64.

Steiner, J., Myint, A.M., Schiltz, K., Westphal, S., Bernstein, H.-G., Walter, M., Schroeter, M.L., Schwarz, M.J., and Bogerts, B. (2010). S100B Serum Levels in Schizophrenia Are Presumably Related to Visceral Obesity and Insulin Resistance. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010, 480707.

Steiner, J., Bernstein, H.-G., Schiltz, K., Haase, T., Meyer-Lotz, G., Dobrowolny, H., Müller, U.J., Martins-de-Souza, D., Borucki, K., Schroeter, M.L., et al. (2014). Decrease of serum S100B during an oral glucose tolerance test correlates inversely with the insulin response. *Psychoneuroendocrinology* 39, 33–38.

Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H.-J., and Scherbaum, W.A. (2004). Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol. Behav.* 83, 47–54.

Suzuki, F., and Kato, K. (1985). Inhibition of adipose S-100 protein release by insulin. *Biochim. Biophys. Acta* 845, 311–316.

Thomazi, A.P., Godinho, G.F.R.S., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E.S., Moriguchi, E., Souza, D.O., and Wofchuk, S.T. (2004). Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing Dev.* 125, 475–481.

Tramontina, A.C., Tramontina, F., Bobermin, L.D., Zanotto, C., Souza, D.F., Leite, M.C., Nardin, P., Gottfried, C., and Gonçalves, C.-A. (2008). Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 1580–1583.

Tramontina, A.C., Wartchow, K.M., Rodrigues, L., Biasibetti, R., Quincozes-Santos, A., Bobermin, L., Tramontina, F., and Gonçalves, C.-A. (2011). The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 118, 1641–1649.

Tramontina, A.C., Nardin, P., Quincozes-Santos, A., Tortorelli, L., Wartchow, K.M., Andreazza, A.C., Braganhol, E., de Souza, D.O.G., and Gonçalves, C.-A. (2012). High-glucose and S100B stimulate glutamate uptake in C6 glioma cells. *Neurochem. Res.* 37, 1399–1408.

Unger, J.W., Moss, A.M., and Livingston, J.N. (1991). Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. *Neuroscience* 42, 853–861.

Vannucci, S.J., Koehler-Stec, E.M., Li, K., Reynolds, T.H., Clark, R., and Simpson, I.A. (1998). GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res.* 797, 1–11.

Vizuete, A.F., de Souza, D.F., Guerra, M.C., Batassini, C., Dutra, M.F., Bernardi, C., Costa, A.P., and Gonçalves, C.-A. (2013). Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. *Life Sci.* 92, 923–928.

Wang, T., Takikawa, Y., Sawara, K., Yoshida, Y., and Suzuki, K. (2012). Negative regulation of human astrocytes by interferon (IFN) α in relation to growth inhibition and impaired glucose utilization. *Neurochem. Res.* 37, 1898–1905.

Zaid, H., Antonescu, C.N., Randhawa, V.K., and Klip, A. (2008). Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem. J.* 413, 201–215.

Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M.J., and Alkon, D.L. (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.* 274, 34893–34902.

Zimmer, D.B., and Van Eldik, L.J. (1986). Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* 261, 11424–11428.