

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANNA CLARA MACHADO COLUCCI

**O RECEPTOR DE LACTATO GPR81: UMA REVISÃO SOBRE SEU POTENCIAL  
TERAPÊUTICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL COM FOCO NO  
TRATAMENTO DA ISQUEMIA CEREBRAL**

Porto Alegre

2021

Anna Clara Machado Colucci

**Título:** O receptor de lactato GPR81: uma revisão sobre seu potencial terapêutico no sistema nervoso central com foco no tratamento da isquemia cerebral

Periódico Modelo: *Frontiers in Physiology*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga  
Coorientadora: Me. Isadora D'Ávila Tassinari

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Colucci, Anna Clara Machado

O receptor de lactato GPR81: uma revisão sobre seu potencial terapêutico no sistema nervoso central com foco no tratamento da isquemia cerebral / Anna Clara Machado Colucci.-- 2021.

62 f.

Orientador: Luciano Stürmer de Fraga.

Coorientadora: Isadora D'Ávila Tassinari.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. GPR81. 2. HCAR1. 3. L-lactato. 4. Neuroproteção.  
5. Isquemia Cerebral. I. de Fraga, Luciano Stürmer, orient. II. Tassinari, Isadora D'Ávila, coorient.  
III. Título.

Anna Clara Machado Colucci

**O receptor de lactato GPR81: uma revisão sobre seu potencial terapêutico no sistema nervoso central com foco no tratamento da isquemia cerebral**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharela em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga

Coorientadora: Me. Isadora D'Ávila Tassinari

**Aprovada em:** Porto Alegre, 18 / 11 / 2021

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga – Orientador

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profa. Dra. Eloísa da Silveira Loss

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dra. Letícia Rodrigues

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Me. Isadora D'Ávila Tassinari – Coorientadora

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Marluce e Leonardo, e à minha irmã Carol por todo o incentivo e apoio em tudo que eu faço, e por me proporcionarem sempre o possível e o impossível pra que eu possa estudar e correr atrás de todos os meus sonhos. Vocês são meus exemplos e minha força. Nada teria sido possível sem vocês. A toda a minha família estendida, aos meus tios e primos, e especialmente à Vó Simoni, por sempre torcer (e rezar!) por mim, comemorar e valorizar cada etapa, por menor que seja, que eu concluo.

Todo meu agradecimento e admiração aos meus orientadores, Prof. Luciano de Fraga e Isadora Tassinari, por toda a confiança, apoio e paciência nessa etapa, e por fazerem eu me encantar cada vez mais pela pesquisa e pela ciência. Vocês dois são, com certeza, os melhores orientadores que eu poderia querer.

Agradeço, também, a todos do grupo de pesquisa do NeuroMet por toda a parceria, amizade, ensinamentos e, principalmente, pela disposição a ajudar e pegar junto em tudo sempre. Esse caminho fica muito mais fácil e leve com a união do nosso grupo. Eu aprendo muito com cada um de vocês e fico muito feliz de saber que seguiremos juntos nas próximas etapas.

Agradeço a todos os meus colegas e professores do InsCer, especialmente à Prof. Celia e grupo, por todo o aprendizado nesse período – levemente conturbado – de estágio, mas também pelo companheirismo e incentivo em tudo. Vocês foram fundamentais nessa etapa. Levo o LaNeurotox e cada um de vocês no meu coração e espero que nossos caminhos ainda se cruzem nessa vida de pesquisa.

A todos os meus amigos que sempre acreditam em mim (muitas vezes mais do que eu mesma), que estão comigo durante todos os momentos mais caóticos e sempre vibram tanto com cada conquista minha. Não cabem todos vocês aqui, mas eu acredito que vocês sabem quem são. Minha gratidão por tudo, vocês são meu porto seguro.

Por fim, agradeço às agências de fomento pelo apoio financeiro concedido aos projetos em que me envolvi durante a graduação na UFRGS. E que sigamos resistindo e valorizando a oportunidade de ter ensino e pesquisa gratuitos de excelência na Universidade.

## RESUMO

O GPR81 é um receptor de membrana acoplado à proteína G que tem como ligante endógeno o L-lactato. Sua ativação causa a inibição da adenilato ciclase e a consequente redução das concentrações intracelulares de AMPc, podendo, assim, modular diversas cascatas de sinalização subsequentes, sobre as quais o entendimento no sistema nervoso central ainda é incipiente. O lactato, seu ligante, já se demonstrou um promissor neuroprotetor em diversas condições que envolvam uma privação de glicose e oxigênio, como na isquemia cerebral, atuando como um substrato metabólico alternativo, apesar de os mecanismos subjacentes não serem descritos na maioria dos estudos. Com a descoberta da presença e ampla distribuição do receptor GPR81/HCAR1 no encéfalo, surgiu a possibilidade de esse efeito ser também devido à sinalização, adicionalmente à função do lactato como substrato energético, desempenhando um importante papel anti-inflamatório, auxiliando no reparo tecidual, modulando a angiogênese, reduzindo a excitotoxicidade e, em última instância, atenuando a morte celular, podendo resultar em uma redução da lesão encefálica e dos déficits neurológicos associados. O presente trabalho foi elaborado na forma de uma revisão narrativa extensiva, para a qual foi realizada uma busca ativa nas principais bases de dados, especialmente no PubMed, priorizando os resultados mais recentes e relevantes, e busca sumarizar a história do estudo desse receptor e de seu ligante, com o intuito de propor o GPR81/HCAR1 como um alvo-terapêutico potencial para doenças que acometem o sistema nervoso central, especialmente para a isquemia cerebral, uma vez que sua fisiopatologia envolve diversos processos que são modulados, ao menos parcialmente, pelo receptor.

**Palavras chave:** GPR81. HCAR1. Lactato. Neuroproteção. Isquemia cerebral.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclase

AMPC: monofosfato cíclico de adenosina

ANLS: lançadeira de lactato astrócito-neurônio

APC: célula apresentadora de antígeno

ATP: trifosfato de adenosina

AVE: acidente vascular encefálico

BHE: barreira hematoencefálica

Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio

CHBA: ácido 3-cloro-5-hidroxibenzoico

CO<sub>2</sub>: gás carbônico

CSF: fluido cefalorraquidiano

DHBA: ácido 3,5-dihidroxibenzoico

EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios

EC<sub>50</sub>: concentração de eficiência

EL: alça extracelular do receptor

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

EROS: espécies reativas de oxigênio

GDP: guanosina difosfato

GTP: guanosina trifosfato

GLUT: transportador de glicose

GPCR: receptor acoplado à proteína G

GPR81: receptor acoplado à proteína G 81

GRK: cinase de receptores acoplados à proteína G

H<sup>+</sup>: íon hidrogênio

HCAR1/HCA1: receptor 1 de ácido tricarbóxico

HFD: dieta rica em gordura

HI: hipóxia-isquemia

ICH: hemorragia intracraniana

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL: alça intracelular do receptor

IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$   
KO: animais nocaute  
LDH: lactato desidrogenase  
MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno  
MCT: transportador de monocarboxilatos  
mRNA: RNA mensageiro  
Na<sup>+</sup>: íon sódio  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase: bomba de sódio e potássio  
NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado  
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido  
NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa B  
NLRP3: proteína que contém domínio NOD- like  
NMDA: receptor N-metil-D-aspartato  
O<sub>2</sub>: gás oxigênio  
OGD: privação de glicose e oxigênio  
oGPCR: receptor-órfão acoplado à proteína G  
PI3K: fosfatidilinositol 3-cinase  
PKA: proteína cinase A  
PKC: proteína cinase C  
PLC: fosfolipase C  
PTX: toxina pertussis  
SNC: sistema nervoso central  
TAB: tecido adiposo branco  
TAM: tecido adiposo marrom  
TBI: traumatismo cranioencefálico  
Th: células T auxiliares  
TM: domínio transmembrana  
tMCAO: oclusão transitória da artéria cerebral média  
Treg: células T reguladoras  
VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular  
WT: animais selvagens, ou wild-type  
zGPR81: receptor análogo ao GPR81 em peixes-zebra



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	10
REFERÊNCIAS .....	12
ARTIGO: "História e função do receptor de lactato GPR81 no encéfalo: um possível alvo-terapêutico para o tratamento da isquemia cerebral?" .....	
Resumo .....	15
Abstract .....	16
1 Introdução .....	17
2 História e caracterização do GPR81 .....	18
3 O ligante L-lactato .....	19
3.1 Afinidade do GPR81 pelo L-lactato .....	19
3.2 Lactato como substrato metabólico .....	21
3.3 Lactato como molécula sinalizadora .....	24
4 Caracterização molecular do GPR81 .....	25
5 Cascata intracelular de ativação do GPR81 .....	27
6 GPR81 na periferia .....	28
7 GPR81 no SNC .....	30
8 GPR81 e vias de sobrevivência e morte celular .....	33
9 GPR81 e o inflamassoma .....	34
10 GPR81 e angiogênese .....	35
11 L-lactato como agente neuroprotetor na isquemia cerebral: ação metabólica, sinalizadora ou dupla função? .....	36
12 Conclusões e perspectivas .....	40
13 Referências .....	42
Legendas das Figuras .....	55
Figura 1 .....	57
Figura 2 .....	58
Figura 3 .....	59
Figura 4 .....	60
Figura 5 .....	61
Figura 6 .....	62

## INTRODUÇÃO

O GPR81 (do inglês *G-protein coupled receptor 81*) é um receptor de membrana acoplado à proteína G (GPCR), cujo ligante endógeno é o L-lactato (Cai et al., 2008; Liu et al., 2009). O receptor foi originalmente estudado no tecido adiposo, onde é mais expresso (Ge et al., 2008), mas a importância da sua ativação foi sendo progressivamente demonstrada em diversos tecidos periféricos, nos quais o GPR81 desempenha um papel de sensor metabólico (Liu et al., 2009) e exerce ação anti-inflamatória (Hoque et al., 2014; Ranganathan et al., 2018). A descoberta do receptor no encéfalo introduziu a possibilidade de o lactato atuar como uma molécula sinalizadora neural, adicionalmente ao seu conhecido papel como substrato metabólico (Lauritzen et al., 2014).

As funções do lactato são bastante intrigantes, especialmente no encéfalo. Em contextos patológicos, a produção endógena de lactato aumenta, o que é considerado como um indicador de mau prognóstico clínico (Shalak & Perlman, 2004). Por outro lado, a administração exógena de lactato já se mostrou neuroprotetora em diversas condições, principalmente em casos de isquemia cerebral (Castillo et al., 2015; Kennedy et al., 2020), mas também em situações de lesões traumáticas cerebrais (Rice et al., 2002; Holloway et al., 2007; Ichai et al., 2009, 2013; Bouzat and Oddo, 2014; Duhaut et al., 2021) e hemorragia cerebral (Zhou et al., 2018), tanto em modelos animais quanto na clínica.

Ademais, o lactato é o substrato preferencial de neurônios em momentos de ativação cerebral ou privação de glicose e oxigênio (para revisão, ver Magistretti & Allaman, 2018). O lactato também parece estar associado à regulação da atividade basal encefálica e, até mesmo, a funções superiores e complexas do sistema nervoso, atuando na modulação da atividade neuronal (Ainscow et al., 2002; Gilbert et al., 2006; Shimizu et al., 2007; Bozzo et al., 2013; Herrera-López & Galván, 2018; Abrantes et al., 2019), na plasticidade sináptica e consolidação de memórias (Suzuki et al., 2011; Yang et al., 2014) e na regulação do fluxo sanguíneo encefálico (Gordon et al., 2008; Zhou et al., 2018).

O efeito neuroprotetor do lactato foi inicialmente atribuído a esse papel de substrato energético. De fato, parecem existir no organismo mecanismos de cooperação que permitem que células com maior capacidade redutora se utilizem da via glicolítica para converter a glicose captada em lactato e exportá-lo para as células oxidativas, que reoxidam esse lactato e usam o piruvato formado para a produção de ATP (trifosfato de adenosina) nas mitocôndrias. No encéfalo, esse mecanismo de cooperação é conhecido como lançadeira de lactato entre astrócitos e neurônios, ou ANLS (do inglês *astrocyte-neuron lactate shuttle*) e foi proposto

pelos pesquisadores Pellerin e Magistretti (Pellerin & Magistretti, 1994). Alguns dos efeitos protetores do lactato, porém, não podem ser explicados exclusivamente pelo seu papel como substrato energético. Com a descoberta da expressão, ativação e ampla distribuição do GPR81 no encéfalo, o lactato também passou a ser considerado como um transmissor de volume, e estudos visando a entender seu papel neuroprotetor começaram a ter um enfoque na elucidação das vias de sinalização ativadas pelo receptor. A partir de então, foi verificado o envolvimento do GPR81 na modulação de vias de sobrevivência e de morte celular (Li et al., 2014; Jin Lee et al., 2016; Morland et al., 2017; Wu et al., 2018; Lambertus et al., 2021) inflamação (Hoque et al., 2014; Ranganathan et al., 2018), angiogênese e vascularização (Gordon et al., 2008; Morland et al., 2017; Zhou et al., 2018; Sun et al., 2019), além da regulação do metabolismo cerebral. Apesar disso, o entendimento dos mecanismos associados a esses processos regulados pelo GPR81 ainda é incipiente.

Em vista do acima exposto, a presente revisão da literatura propõe uma possível aplicação terapêutica da modulação da atividade do GPR81 em doenças cuja fisiopatologia envolva a interrupção ou a redução do fluxo sanguíneo ao encéfalo, condição conhecida como isquemia encefálica (Ginsberg, 1997). No desenvolvimento e na progressão da lesão decorrente desse tipo de insulto, diversos processos estão implicados, dentre os quais podem-se destacar a excitotoxicidade, a neuroinflamação e o estresse oxidativo (para revisão, ver White et al., 2000). Trabalhos recentes já demonstraram os efeitos benéficos da modulação do receptor na redução da lesão isquêmica e na atenuação dos déficits neurológicos associados (Castillo et al., 2015; Shen et al., 2015; Kennedy et al., 2020; Buscemi et al., 2021). Assim, fica evidente a necessidade de mais estudos que visem a esclarecer a participação do receptor nas cascatas envolvidas nesses processos. Obviamente, um melhor entendimento desses mecanismos ainda é essencial para a definição de estratégias clínicas, mas o conhecimento atual coloca o receptor GPR81 como um potencial alvo-terapêutico a ser explorado no tratamento da isquemia encefálica, o qual pode se somar ao importante papel que o lactato exerce como substrato metabólico nessas condições.

O presente trabalho foi escrito na forma de artigo científico, de acordo com as normas do periódico “Frontiers in Physiology”. O artigo científico produzido foi preparado em língua portuguesa e será apresentado a seguir, logo após a lista de referências desta introdução.

## REFERÊNCIAS

- Abrantes, H. de C., Briquet, M., Schmuziger, C., Restivo, L., Puyal, J., Rosenberg, N., et al. (2019). The lactate receptor HCAR1 modulates neuronal network activity through the activation of  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$  subunits. *J. Neurosci.* 39, 4422–4433. doi:10.1523/JNEUROSCI.2092-18.2019.
- Ainscow, E. K., Mirshamsi, S., Tang, T., Ashford, M. L. J., and Rutter, G. A. (2002). Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: Evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *J. Physiol.* 544, 429–445. doi:10.1113/jphysiol.2002.022434.
- Bouzat, P., and Oddo, M. (2014). Lactate and the injured brain: Friend or foe? *Curr. Opin. Crit. Care* 20, 133–140. doi:10.1097/MCC.0000000000000072.
- Bozzo, L., Puyal, J., and Chatton, J. Y. (2013). Lactate Modulates the Activity of Primary Cortical Neurons through a Receptor-Mediated Pathway. *PLoS One* 8, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0071721.
- Buscemi, L., Blochet, C., Magistretti, P. J., and Hirt, L. (2021). Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1 and Neuroprotection in a Mouse Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion. *Front. Physiol.* 12. doi:10.3389/fphys.2021.689239.
- Cai, T. Q., Ren, N., Jin, L., Cheng, K., Kash, S., Chen, R., et al. (2008). Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 987–991. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.088.
- Castillo, X., Rosafio, K., Wyss, M. T., Drandarov, K., Buck, A., Pellerin, L., et al. (2015). A probable dual mode of action for both L- and D-lactate neuroprotection in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1561–1569. doi:10.1038/jcbfm.2015.115.
- Duhaut, D. E., Heurteaux, C., Gandin, C., Ichai, C., and Quintard, H. (2021). The Antiedematous Effect of Exogenous Lactate Therapy in Traumatic Brain Injury: A Physiological and Mechanistic Approach. *Neurocrit. Care*. doi:10.1007/s12028-021-01219-y.
- Ge, H., Weiszmann, J., Reagan, J. D., Gupte, J., Baribault, H., Gyuris, T., et al. (2008). Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *J. Lipid Res.* 49, 797–803. doi:10.1194/jlr.M700513-JLR200.
- Gilbert, E., Tang, J. M., Ludvig, N., and Bergold, P. J. (2006). Elevated lactate suppresses neuronal firing in vivo and inhibits glucose metabolism in hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 1117, 213–223. doi:10.1016/j.brainres.2006.07.107.
- Ginsberg, M. D. (1997). The New Language of Cerebral Ischemia. *American Journal of Neuroradiology* 18, 1435–1445. PMID: 9296184
- Gordon, G. R. J., Choi, H. B., Rungta, R. L., Ellis-Davies, G. C. R., and MacVicar, B. A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745–750. doi:10.1038/nature07525.
- Herrera-López, G., and Galván, E. J. (2018). Modulation of hippocampal excitability via the hydroxycarboxylic acid receptor 1. *Hippocampus* 28, 557–567. doi:10.1002/hipo.22958.
- Holloway, R., Zhou, Z., Harvey, H. B., Levasseur, J. E., Rice, A. C., Sun, D., et al. (2007).

- Effect of lactate therapy upon cognitive deficits after traumatic brain injury in the rat. *Acta Neurochir. (Wien)*. 149, 919–927. doi:10.1007/s00701-007-1241-y.
- Hoque, R., Farooq, A., Ghani, A., Gorelick, F., and Mehal, W. Z. (2014). Lactate reduces liver and pancreatic injury in toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via gpr81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology* 146, 1763–1774. doi:10.1053/j.gastro.2014.03.014.
- Ichai, C., Armando, G., Orban, J. C., Berthier, F., Rami, L., Samat-Long, C., et al. (2009). Sodium lactate versus mannitol in the treatment of intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain-injured patients. *Intensive Care Med.* 35, 471–479. doi:10.1007/s00134-008-1283-5.
- Ichai, C., Payen, J. F., Orban, J. C., Quintard, H., Roth, H., Legrand, R., et al. (2013). Half-molar sodium lactate infusion to prevent intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain injured patients: A randomized controlled trial. *Intensive Care Med.* 39, 1413–1422. doi:10.1007/s00134-013-2978-9.
- Kennedy, L. H., Glesaaen, E. R., Palibrk, V., Pannone, M., Wang, W., Al-Jabri, A. H. J., et al. (2020). Lactate receptor HCAR1 regulates neurogenesis and microglia activation after neonatal hypoxia-ischemia. *bioRxiv*. doi:10.1101/2020.12.02.408070.
- Lambertus, M., Øverberg, L. T., Andersson, K. A., Hjelden, M. S., Hadzic, A., Haugen, Ø. P., et al. (2021). L-lactate induces neurogenesis in the mouse ventricular-subventricular zone via the lactate receptor HCA1. *Acta Physiol.* 231, 0–2. doi:10.1111/apha.13587.
- Lauritzen, K. H., Morland, C., Puchades, M., Holm-Hansen, S., Hagelin, E. M., Lauritzen, F., et al. (2014). Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cereb. Cortex* 24, 2784–2795. doi:10.1093/cercor/bht136.
- Lee, Y. J., Shin, K. J., Park, S. A., Park, K. S., Park, S., Heo, K., et al. (2016). G-protein-coupled receptor 81 promotes a malignant phenotype in breast cancer through angiogenic factor secretion. *Oncotarget* 7, 70898–70911. doi:10.18632/oncotarget.12286.
- Li, G., Wang, H. Q., Wang, L. H., Chen, R. P., and Liu, J. P. (2014). Distinct pathways of ERK1/2 activation by hydroxy-carboxylic acid receptor-1. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0093041.
- Liu, C., Wu, J., Zhu, J., Kuei, C., Yu, J., Shelton, J., et al. (2009). Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J. Biol. Chem.* 284, 2811–2822. doi:10.1074/jbc.M806409200.
- Magistretti, P. J., and Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 235–249. doi:10.1038/nrn.2018.19.
- Morland, C., Andersson, K. A., Haugen, Ø. P., Hadzic, A., Kleppa, L., Gille, A., et al. (2017). Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nat. Commun.* 8, 1–9. doi:10.1038/ncomms15557.
- Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625–10629. doi:10.1073/pnas.91.22.10625.
- Ranganathan, P., Shanmugam, A., Swafford, D., Suryawanshi, A., Bhattacharjee, P., Hussein, M. S., et al. (2018). GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *J. Immunol.*, j1700604.

doi:10.4049/jimmunol.1700604.

- Rice, A. C., Zsoldos, R., Chen, T., Wilson, M. S., Alessandri, B., Hamm, R. J., et al. (2002). Lactate administration attenuates cognitive deficits following traumatic brain injury. *Brain Res.* 928, 156–159. doi:10.1016/S0006-8993(01)03299-1.
- Shalak, L., and Perlman, J. M. (2004). Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum. Dev.* 80, 125–141. doi:10.1016/j.earlhumdev.2004.06.003.
- Shen, Z., Jiang, L., Yuan, Y., Deng, T., Zheng, Y. R., Zhao, Y. Y., et al. (2015). Inhibition of G Protein-Coupled Receptor 81 (GPR81) Protects Against Ischemic Brain Injury. *CNS Neurosci. Ther.* 21, 271–279. doi:10.1111/cns.12362.
- Shimizu, H., Watanabe, E., Hiyama, T. Y., Nagakura, A., Fujikawa, A., Okado, H., et al. (2007). Glial Nax Channels Control Lactate Signaling to Neurons for Brain [Na<sup>+</sup>] Sensing. *Neuron* 54, 59–72. doi:10.1016/j.neuron.2007.03.014.
- Sun, Z., Han, Y., Song, S., Chen, T., Han, Y., and Liu, Y. (2019). Activation of GPR81 by lactate inhibits oscillatory shear stress-induced endothelial inflammation by activating the expression of KLF2. *IUBMB Life* 71, 2010–2019. doi:10.1002/iub.2151.
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., et al. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810–823. doi:10.1016/j.cell.2011.02.018.
- White, B. C., Sullivan, J. M., DeGracia, D. J., O’Neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., et al. (2000). *Brain ischemia and reperfusion: Molecular mechanisms of neuronal injury.* doi:10.1016/S0022-510X(00)00386-5.
- Wu, Y., Wang, M., Zhang, K., Li, Y., Xu, M., Tang, S., et al. (2018). Lactate enhanced the effect of parathyroid hormone on osteoblast differentiation via GPR81-PKC-Akt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 737–743. doi:10.1016/j.bbrc.2018.06.069.
- Yang, F., Wang, Z., Wei, X., Han, H., Meng, X., Zhang, Y., et al. (2014). NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 660–667. doi:10.1038/jcbfm.2013.242.
- Zhou, J., Liu, T., Guo, H., Cui, H., Li, P., Feng, D., et al. (2018). Lactate potentiates angiogenesis and neurogenesis in experimental intracerebral hemorrhage. *Exp. Mol. Med.* 50. doi:10.1038/s12276-018-0113-2.

# **História e função do receptor de lactato GPR81 no encéfalo: um possível alvo-terapêutico para o tratamento da isquemia cerebral?**

## ***History and function of the lactate receptor GPR81 in the brain: a putative therapeutic target for the treatment of cerebral ischemia?***

**Anna Clara Machado Colucci<sup>1</sup>, Isadora D'Ávila Tassinari<sup>1,2</sup>, Luciano Stürmer de Fraga<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Grupo de Pesquisa em Neurobiologia e Metabolismo, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

### **Correspondence**

Dr. Luciano S. de Fraga

e-mail: lucianof@ufrgs.br

**Palavras-chave:** GPR81, HCAR1, L-lactato, sistema nervoso central, neuroproteção, isquemia cerebral

**Keywords:** GPR81, HCAR1, L-lactate, brain, neuroprotection, cerebral ischemia

## Resumo

O receptor GPR81 é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) que foi descoberto em 2001, mas sua ligação específica ao lactato como ligante endógeno em condições fisiológicas só foi demonstrada 7 anos depois. Recentemente, a expressão e distribuição do GPR81 no encéfalo foram confirmadas. A partir de então, passou a ser sugerido que, além do papel como substrato energético, o lactato atue como um transmissor de volume no encéfalo. O GPR81 ativa diversas vias de sinalização *downstream*, geralmente iniciando com a inibição da adenilato ciclase pela proteína Gi e a subsequente redução das concentrações intracelulares de AMPc. O GPR81 parece atuar como um sensor metabólico e integrar o metabolismo energético, a atividade sináptica e o fluxo sanguíneo encefálico. Estudos recentes têm mostrado, progressivamente, o potencial do lactato como um agente neuroprotetor, especialmente em condições isquêmicas, nas quais o suprimento de oxigênio e glicose são inadequados. A ativação do GPR81 mostrou resultados promissores no que diz respeito à neuroproteção, e parece modular vários processos envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças do sistema nervoso central. Nessa revisão, iremos sumarizar a história do estudo do receptor GPR81, começando com a descrição da descoberta de sua ligação ao lactato, e discutindo os achados relativos à sua expressão e distribuição, às cascatas de transdução de sinal ativadas, ao seu papel neuroprotetor e, finalmente, proporemos o GPR81 como um possível alvo-terapêutico para o tratamento da isquemia cerebral.

## Abstract

GPR81 is a G-protein coupled receptor (GPCR) which was discovered in 2001, but only deorphanized 7 years later, when its affinity for lactate as an endogenous ligand was demonstrated under physiological conditions. More recently, GPR81 expression and distribution in the brain were also confirmed, and since then, function of lactate as a volume transmitter in the brain has been suggested. Altogether, these findings shed light on a new function of lactate acting as a signaling molecule in the central nervous system, in addition to its well-known role as a metabolic fuel for neurons. GPR81 activates several downstream pathways, starting with the G<sub>i</sub>-mediated downregulation of adenylyl cyclase and subsequent decrease in cAMP levels. GPR81 seems to act as metabolic sensor, coupling energy metabolism, synaptic activity and blood flow. Recent studies have also suggested the potential role of lactate as a neuroprotective agent, especially in cerebral ischemic conditions, in which oxygen and glucose supply is inadequate. This protection is usually attributed to its role as a metabolic substrate, but the underlying mechanisms need further investigation and could be related to signaling via GPR81. The activation of the receptor showed promising results regarding neuroprotection, and modulates many processes involved in the pathophysiology of several CNS diseases. In this review, we will summarize the history of GPR81, starting with its deorphanization, and discussing findings on its expression and distribution, signal transduction cascades, and its neuroprotective role. Lastly, we shall propose GPR81 as a potential target for the treatment of cerebral ischemia.



## 1 Introdução

O GPR81 (do inglês *G-protein coupled receptor 81*) é um receptor de membrana acoplado à proteína G (GPCR) do tipo  $G_i$  que, quando ativado, causa a inibição da adenilato ciclase (AC), reduzindo a concentração intracelular de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) (Liu et al., 2009). Esse receptor foi descoberto em 2001 (Lee et al., 2001) e foi considerado como um receptor-órfão até 2008, quando foi descrita a sua ligação específica ao lactato (Cai et al., 2008). O GPR81 foi estudado especialmente no tecido adiposo branco, onde é mais expresso (Ge et al., 2008), atuando como um sensor metabólico e inibindo a lipólise (Liu et al., 2009); porém, o receptor também é encontrado em outros tecidos em menores concentrações – inclusive no encéfalo, onde está amplamente distribuído e parece ter um papel essencial, desde na modulação da atividade neuronal até na regulação do metabolismo e fluxo sanguíneo cerebral, bem como na interação do parênquima cerebral com o sangue e com o fluido cefalorraquidiano (Lauritzen et al., 2014).

O L-lactato, o ligante endógeno do GPR81, é uma molécula orgânica cujo papel no sistema nervoso central (SNC) é bastante discutido. O lactato foi considerado como um resíduo metabólico por mais de 200 anos, até a descrição, em 1986, do mecanismo da lançadeira de lactato em células musculares esqueléticas (Brooks, 1986). Menos de dez anos depois, um mecanismo semelhante foi observado no SNC. A hipótese da lançadeira de lactato entre astrócitos e neurônios (ANLS, do inglês, *astrocyte-neuron lactate shuttle*) foi descrita em 1994 (Pellerin & Magistretti, 1994) e pressupõe que os astrócitos captam a glicose circulante, a convertem em lactato e transferem esse lactato para os neurônios, que o utilizam como o substrato metabólico preferencial em situações de privação de glicose, oxigênio, ou de atividade sináptica intensa (Schurr et al., 1999).

Em condições isquêmicas, a produção de lactato aumenta no encéfalo (Harada et al., 1992) e a administração sistêmica de lactato já demonstrou diversos efeitos benéficos na redução da lesão cerebral em modelos *in vivo* em animais adultos (Berthet et al., 2009; 2012; Rinholm et al., 2011; Horn & Klein, 2013; Castillo et al., 2015; Morland et al., 2017; Buscemi et al., 2020; Kennedy et al., 2020) e neonatos (Tassinari et al., 2020; Roumes et al., 2021) e em modelos *ex vivo* utilizando fatias cerebrais (Schurr et al., 1999; Castillo et al., 2015). Nos modelos animais, a administração de lactato também produziu melhora nos desfechos comportamentais avaliados (Buscemi et al., 2020; Tassinari et al., 2020; Roumes et al., 2021). A neuroproteção descrita nesses estudos foi atribuída principalmente à função do lactato como substrato metabólico, mas sem um detalhamento claro sobre o mecanismo de ação subjacente. Entretanto, com a descoberta da expressão e funcionalidade do receptor GPR81 no SNC (Bozzo et al., 2013; Lauritzen et al.,

2014), surge a hipótese de que os efeitos protetores do lactato possam estar associados ao seu papel como sinalizador via ativação do receptor GPR81.

A isquemia cerebral decorre de uma redução ou interrupção, podendo ser transitória ou permanente, do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, do suprimento de glicose e oxigênio ao tecido encefálico, causando depleção do ATP (trifosfato de adenosina) tecidual. A fisiopatologia da lesão encefálica resultante de um episódio isquêmico envolve muitas etapas, desde o momento do evento isquêmico propriamente dito, até a fase de reperfusão do tecido. Esses eventos são conhecidos em conjunto como cascata isquêmica (Brouns & de Deyn, 2009). A falha energética inicial causa despolarização dos neurônios pelo comprometimento da bomba de sódio e potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase; Katsura et al., 1994), causando uma liberação exacerbada de glutamato e comprometendo a sua recaptação, o que culmina na excitotoxicidade (Johnston, 2001), aumentando o influxo de cálcio e, em última instância, ativando vias de morte celular (Mayor & Tymianski, 2018). Após a reperfusão do tecido, ocorre uma alta produção de EROS (espécies reativas de oxigênio), juntamente com uma sobrecarga do sistema antioxidante, resultando em estresse oxidativo. Esse processo ativa vias de morte celular por apoptose, contribuindo com o aumento da extensão da lesão (Ferriero, 2001). O processo inflamatório desencadeado também contribui para a formação e para a progressão da lesão cerebral (White et al., 2000). A Figura 1 ilustra os principais mecanismos da fisiopatologia da isquemia.

Vários dos processos descritos acima parecem ser modulados pelo receptor GPR81 - cuja ativação, de fato, já mostrou efeitos neuroprotetores em modelos animais de isquemia cerebral (Castillo et al., 2015; Kennedy et al., 2020). Assim, o GPR81 se configura como um possível alvo-terapêutico no tratamento de condições isquêmicas cerebrais. Entretanto, mais estudos são necessários para entendermos melhor os mecanismos pelos quais a ativação do GPR81 leva à neuroproteção.

A presente revisão sumariza o conhecimento construído sobre o receptor GPR81 desde sua descoberta, tendo um enfoque no papel sinalizador do lactato e fornecendo uma perspectiva do potencial uso terapêutico do lactato como agente neuroprotetor em condições isquêmicas cerebrais.

## **2 História e caracterização do GPR81**

Os GPCRs compõem a maior superfamília conhecida de proteínas integrais de membrana (Cvick et al., 2016). No sequenciamento do genoma humano, foram identificados cerca de 720 genes que codificam essas proteínas (Lander et al., 2001). Os GPCRs apresentam 7 domínios alfa-hélice transmembrana, com um domínio extracelular (com 3 alças, EL-1, 2 e 3), que responde ao seu ligante, e um intracelular (também com 3 alças, IL-1, 2 e 3), que interage com a proteína G;

essa proteína, quando ativada, pode migrar para o citosol e ativar enzimas ou canais iônicos, disparando as cascatas de sinalização subsequentes (para revisão, ver Gilman, 1987).

Muitos GPCRs ainda não tiveram seu ligante identificado e, portanto, são considerados como “receptores-órfãos” (Wise et al., 2004). O receptor GPR81 foi descrito por Lee *et al.* (Lee et al., 2001) e originalmente classificado como membro da subfamília de receptores-órfãos acoplados à proteína G (oGPCR). Sua localização, bastante expressiva no tecido adiposo (Ge et al., 2008), bem como o papel do receptor com que compartilha maior homologia, o GPR109a (Wise et al., 2004) – cuja função está associada à regulação dos níveis de ácidos graxos circulantes (Soga et al., 2003; Tunaru et al., 2003; Taggart et al., 2005) – sugeriam um potencial envolvimento do GPR81 no metabolismo energético. Essa hipótese foi reforçada uma vez que a seletividade do receptor por L-lactato como ligante endógeno foi demonstrada (Cai et al., 2008; Liu et al., 2009). A partir de então, o GPR81 passou a fazer parte da família de receptores de ácido carboxílico (HCAR, do inglês *hydroxycarboxylic acid receptor*), sendo também chamado de HCA1 ou HCAR1 (Offermanns et al., 2011), e sua função como sensor metabólico começou a ser explorada. O L-lactato se confirmou como um ligante ortostérico do GPR81 quando se demonstrou que induz a internalização do receptor, um fenômeno sabidamente associado a esse tipo de ligante (Liu et al., 2009; Kuei et al., 2011).

O GPR81 também pode ser encontrado em menores concentrações em outros tecidos, incluindo o cerebral, onde está amplamente distribuído e também é ativado pelo L-lactato (Lauritzen et al., 2014). Apesar da presença do GPR81 ter sido comprovada no encéfalo, os mecanismos subsequentes à sua ativação pelo lactato ainda são pouco conhecidos, de forma que o receptor pode atuar através de diversas cascatas de sinalização intracelular *downstream*, participando de vias associadas a distintos processos fisiológicos – ou até mesmo patológicos.

### **3 O ligante L-lactato**

#### **3.1 Afinidade do GPR81 pelo L-lactato**

Dos dois estereoisômeros do lactato, apenas o L-lactato é produzido naturalmente e participa significativamente das reações metabólicas no organismo de mamíferos, estando presente no plasma e nos tecidos de forma abundante (Hasegawa et al., 2003). O D-lactato é produzido principalmente pela microbiota, sendo detectável em concentrações consideráveis apenas no sistema digestório. No plasma, é encontrado em quantidades de ~1% em relação àquelas do seu isômero L – elevações nas concentrações plasmáticas de D-lactato são raras e denotam casos de disfunções intestinais ou diabetes (Larsen, 2017; Pohanka, 2020). Dessa forma, uma vez que o D-lactato não é encontrado em concentrações suficientes para ativar o GPR81 em

condições fisiológicas, a característica de ligante endógeno do receptor restringe-se ao L-lactato. Altas concentrações de D-lactato inibem o transporte de L-lactato através das membranas e o transporte de piruvato para a mitocôndria (Ros et al., 2001; Gibbs et al., 2008), de forma que esse composto pode ser considerado neurotóxico.

A  $EC_{50}$  (ou concentração de eficiência, medida que corresponde à concentração de um composto que induz metade do efeito máximo do receptor) do GPR81 para o L-lactato é relativamente alta, de 1,3-5 mM, quando comparado a outros receptores semelhantes, para os quais o valor costuma estar na escala de nanomolar (Cai et al., 2008; Liu et al., 2009). Apesar da baixa afinidade, as concentrações fisiológicas de L-lactato em humanos são altas, dinâmicas e cobrem esse intervalo. No plasma, variam de 0,5-2 mM em repouso, podendo atingir entre 10-20 mM de forma transiente em condições de exercício físico intenso (Withers et al., 1991) ou até mesmo por longos períodos após um evento isquêmico, por exemplo (Liu et al., 2009; Mosienko et al., 2015). No encéfalo, as concentrações de L-lactato encontradas no fluido extracelular ficam na faixa de 2-5 mM (Langemann et al., 2001; Abi-Saab et al., 2002). Assim, corrobora-se a ideia de que, em humanos, o receptor seja ativado pelo L-lactato endógeno, tanto na periferia quanto no SNC.

Outros compostos semelhantes também podem atuar como agonistas do GPR81, mas nenhum desses possíveis ligantes existe *in vivo* em concentrações que atinjam a  $EC_{50}$  do receptor (Liu et al., 2009). O agonista mais conhecido do GPR81 é o ácido 3,5-dihidroxibenzoico (3,5-DHBA ou apenas DHBA), um polifenol presente em baixas concentrações em diversos produtos alimentícios naturais, que ativa o receptor com uma  $EC_{50}$  bem mais baixa, de aproximadamente 150  $\mu$ M (Liu et al., 2012). Dessa forma, o DHBA se configura como uma ferramenta importante em estudos pré-clínicos sobre a ativação do GPR81 (Liu et al., 2012; Li et al., 2014; Herrera-López and Galván, 2018; Buscemi et al., 2021) e permite avaliar a funcionalidade do receptor *in vivo* em contextos onde seria necessário administrar concentrações excessivas de L-lactato para atingir a  $EC_{50}$ . Também são agonistas reconhecidos do receptor o ácido 3-cloro-5-hidroxibenzoico (3-Cl-HBA ou CHBA), com  $EC_{50}$  de 22  $\mu$ M (Dvorak et al., 2012), e o “composto 2” (4-metil-N-(5-(2-(4-metilpiperazin-1-il) ciclohexanocarboxamida), com  $EC_{50}$  de aproximadamente 50 nM (Sakurai et al., 2014).

O D-lactato também se mostrou um agonista eficaz do GPR81, com uma  $EC_{50}$  semelhante àquela do L-lactato; adicionalmente, a metabolização e transporte do D-lactato para o meio intracelular são pouco eficientes, especialmente no encéfalo (Ling et al., 2012). Dessa forma, a comparação entre a eficácia dos dois estereoisômeros na ativação do receptor pode ser utilizada em estudos que visem a avaliar a diferenciação entre os efeitos sinalizadores (decorrentes da

ligação do lactato ao receptor) e metabólicos (que dependem do transporte e da presença de maquinaria para a oxidação) do lactato (Mosienko et al., 2018).

Apesar da ligação do L-lactato ao GPR81 ser bastante viável fisiologicamente, alguns fatores dificultam a realização de estudos farmacológicos com esse receptor: as altas concentrações endógenas de L-lactato, que podem interagir com aquelas administradas de forma exógena; a baixa afinidade do GPR81 ao seu ligante, somada ao fato de que concentrações acima de 30 mM parecem exercer funções não relacionadas à ativação ortostérica do receptor; e a rápida metabolização do L-lactato nos tecidos (Liu et al., 2012). Assim, a descoberta ou a produção sintética de agonistas que ativem o receptor em concentrações mais baixas seria de grande valia para uso experimental, evitando possíveis vieses na análise da ativação do GPR81.

### 3.2 Lactato como substrato metabólico

Desde sua descoberta no século 18 por Carl Wilhelm Scheele (Ferguson et al., 2018), o lactato foi considerado como um resíduo metabólico, uma molécula produzida pelo metabolismo celular que deveria ser rapidamente excretada. Na década de 1980, todavia, Brooks (Brooks, 1986) descreveu o sistema da “lançadeira de lactato” em fibras musculares esqueléticas. Quando essas células realizam trabalho (especialmente as anaeróbicas, do tipo IIb), o lactato é produzido em grandes quantidades, mas não é liberado na circulação: atua como fonte energética para as próprias fibras musculares vizinhas (especialmente para as oxidativas, do tipo I), sendo oxidado e liberado como CO<sub>2</sub> no sangue venoso (Brooks, 1986; 2018). Dessa forma, pode-se considerar que a “lançadeira de lactato” atua na integração do metabolismo, pois o produto dos processos anabólicos é direcionado para prover substrato energético aos processos catabólicos daqueles tecidos ativos com respiração celular mais intensa.

No que diz respeito ao SNC, se acreditava que a produção de lactato era uma consequência indesejada de condições de baixa perfusão tecidual e reduzido teor de oxigênio, ou de desequilíbrio entre as taxas glicolítica e oxidativa (Siesjö, 1978). Em condições fisiológicas, a utilização do lactato como substrato, de fato, corresponde a apenas ~10% das necessidades energéticas. Entretanto, em situações nas quais as concentrações plasmáticas estão aumentadas, como durante o exercício intenso, essa contribuição pode ultrapassar os 50% (Boumezbeur et al., 2010). O encéfalo passa de um produtor de lactato, em repouso, para um consumidor, quando as concentrações plasmáticas aumentam (van Hall, 2009). Essa hipótese foi corroborada quando foi observada a presença dos transportadores de monocarboxilatos (MCTs, do inglês, *monocarboxylate transporter*), como o lactato, na barreira hematoencefálica (BHE) (Pellerin et al., 1998; Moreira et al., 2009).

O famoso e elegante trabalho desenvolvido pelos pesquisadores Luc Pellerin e Pierre Magistretti na Universidade de Lausanne, na Suíça (Pellerin & Magistretti, 1994), sugeriu a existência, no SNC, de um mecanismo semelhante àquele descrito por Brooks no tecido muscular, que também integra as fontes de produção às de utilização de lactato: a lançadeira de lactato entre astrócitos e neurônios (ANLS), ou desvio lactato-glicose entre astrócitos e neurônios. A partir desse estudo, o lactato passou também a ser considerado como um potente substrato metabólico para os neurônios.

O desvio lactato-glicose permite que células com alta capacidade redutora, que apresentam elevada razão  $\text{NADH:NAD}^+$ , como os astrócitos, sustentem metabolicamente as células oxidativas, com menor razão  $\text{NADH:NAD}^+$ , como os neurônios. Esse processo é mediado pelos MCTs (Pellerin et al., 1998), que permitem o transporte (e a transferência) de lactato através de membranas celulares de astrócitos e neurônios.

Os pés astrocíticos cobrem mais de 90% dos capilares não-fenestrados do encéfalo (Jukkola & Gu, 2015), de forma que o astrócito é a primeira célula que contata os vasos sanguíneos do parênquima cerebral. Através dos transportadores do tipo GLUT1, o astrócito capta a glicose da corrente sanguínea e a estoca na forma de glicogênio, podendo, em caso de necessidade, mobilizar rapidamente essas reservas (para revisão, ver Brown, 2004). Os astrócitos também emitem processos celulares que circundam as sinapses (Peters & Feldman, 1976), especialmente as glutamatérgicas, pois estas correspondem a 80% do total de sinapses do encéfalo (Ainscow et al., 2002). Os astrócitos participam dessas sinapses monitorando, recaptando e reciclando o excesso de glutamato liberado, de forma a evitar a excitotoxicidade provocada pelo acúmulo do principal neurotransmissor excitatório no meio extracelular (McLennan, 1976).

A interação entre metabolismo energético e neuroquímica é a base do funcionamento da ANLS: o glutamato presente na fenda sináptica induz, nos astrócitos, um metabolismo preferencialmente glicolítico, estimulando a captação de glicose e a metabolização da mesma em piruvato, que será reduzido a lactato (Pellerin & Magistretti, 1994). Isso ocorre porque a ativação dos transportadores de glutamato (EAATs, do inglês, *excitatory amino acid transporters*) está associada a um cotransporte de  $\text{Na}^+$ . O aumento de sódio intracelular, por sua vez, ativa a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. O ATP necessário para esse processo é, então, fornecido justamente pela via glicolítica (para revisão, ver Bélanger et al., 2011).

A redução do piruvato a lactato é catalisada pela isoforma 5 da enzima lactato desidrogenase (LDH5, presente nos astrócitos), que consome NADH, um equivalente redutor abundante nos astrócitos, e libera  $\text{NAD}^+$ . Assim, esse mecanismo também assegura a regeneração do  $\text{NAD}^+$ , importante para a manutenção do funcionamento da via glicolítica. O lactato produzido no citoplasma dos astrócitos é, então, exportado para meio extracelular através do MCT4, que

responde às altas concentrações de lactato intracelulares (Gandhi et al., 2009; Bergersen, 2015). Os neurônios, por sua vez, têm um metabolismo predominantemente oxidativo; nessas células, a isoforma MCT2, de alta afinidade, é responsável pela captação do lactato liberado no meio extracelular pelos astrócitos. O lactato captado será reoxidado a piruvato através da ação da enzima LDH1, podendo, então, ser utilizado como substrato energético para a produção neuronal de ATP (Schurr et al., 1999; Bélanger et al., 2011; Magistretti & Allaman, 2018). Esse mecanismo está ilustrado na Figura 2.

A cooperação metabólica entre astrócitos e neurônios parece ser essencial durante a ativação cerebral, e o lactato torna-se o substrato preferencial dos neurônios nessa situação, mesmo em condições de suprimento adequado de O<sub>2</sub>, (para revisão, ver Dienel & Cruz, 2004). A ANLS pode, então, funcionar como um “atalho”, oportunizando aos neurônios a possibilidade de poupar as duas moléculas de ATP que seriam utilizadas nas etapas iniciais – ou fase de investimento – da glicólise (Magistretti & Allaman, 2018). Assim, a produção e exportação de lactato pelos astrócitos e a subsequente captação deste pelos neurônios pode garantir um suprimento de substrato energético para sustentar situações de atividade sináptica aumentada em neurônios adjacentes, especialmente em contextos desfavoráveis, capazes de levar à lesão ou morte neuronal, como em condições isquêmicas.

Em contextos que envolvem maior demanda de ATP nos neurônios, como em intensa atividade sináptica, os astrócitos sofrem uma mudança metabólica, em um mecanismo semelhante ao efeito *crabtree*, passando a realizar a glicólise - que tem como produto final o lactato - e, dessa forma, permitem que todo o oxigênio disponível seja utilizado pelos neurônios na fosforilação oxidativa (Fernández-Moncada et al., 2018). No caso de haver uma quantidade limitada de O<sub>2</sub> e de glicose, como ocorre na isquemia, essa colaboração se faz ainda mais importante, pois os astrócitos não somente suprem a demanda por substrato energético dos neurônios, mas também poupam o oxigênio necessário para a oxidação desse substrato (Fernández-Moncada et al., 2018).

A utilização do lactato como substrato energético cerebral tem contribuições diferentes durante o neurodesenvolvimento. Nos primeiros dias de vida, os padrões metabólicos do SNC variam rapidamente (Pellerin et al., 1998) e a presença de diferentes isoformas de MCTs no encéfalo de camundongos neonatos está diretamente relacionada com a preferência metabólica por cada substrato (para revisão, ver Tassinari & de Fraga, 2022). Durante o período de amamentação, o lactato e os corpos cetônicos são os substratos preferenciais do tecido nervoso e seus transportadores estão bastante expressos na barreira hematoencefálica; após o desmame, essa expressão é reduzida (Pierre & Pellerin, 2005) Porém, no parênquima cerebral, curiosamente, os MCTs permanecem presentes, o que sugere que o lactato ainda seja utilizado, mas, nesse caso, seja produzido no próprio tecido cerebral, e não mais oriundo da periferia (Pellerin et al., 1998).

Dessa forma, a administração de lactato pode ser uma estratégia especialmente eficaz em eventos isquêmicos perinatais, como na hipóxia-isquemia (HI) neonatal.

A presença das ferramentas celulares necessárias para a oxidação de lactato nos neurônios e de transportadores que permitem o fluxo cerebral dessa molécula sustentam a ideia de que os astrócitos garantem o aporte energético necessário para sustentar o intenso gasto metabólico neuronal.

### 3.3 Lactato como molécula sinalizadora

Ainda que a ANLS seja um mecanismo importante para suprir o consumo metabólico aumentado de neurônios em momentos de ativação cerebral, é a glicose, e não o lactato, que parece ser o substrato preferencial para a manutenção do metabolismo encefálico basal no sistema nervoso adulto (para revisão, ver Dienel, 2012). Apesar disso, o lactato é encontrado em altas concentrações no fluido extracelular do parênquima cerebral (Boumezbeur et al., 2010), o que sugere que este possa ter outras funções, possivelmente atuando como sinalizador.

Mesmo antes da descoberta do receptor GPR81, evidências já apontavam para efeitos moduladores do lactato que pareciam independentes de seu papel como substrato metabólico: o lactato se demonstrou importante no processo de formação de memórias (Suzuki et al., 2011), na expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica (Yang et al., 2014a) e na modulação da frequência de disparos de potenciais de ação (Song et al., 2001; Ainscow et al., 2002; Gilbert et al., 2006; Shimizu et al., 2007), além de estimular a vasodilatação cerebral (Gordon et al., 2008), descoberta que sugeriu a possibilidade de o mesmo atuar como um sinalizador essencial do metabolismo encefálico, ligando a ativação neuronal ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral.

Algumas funções metabólicas neuronais críticas necessitam da glicose e não podem ser totalmente supridas pelo lactato (Dienel, 2012). Na presença de glicose – como se espera que seja a situação em condições fisiológicas – os neurônios utilizam principalmente a energia proveniente da fosforilação oxidativa, não dependendo de fontes alternativas de energia para o processamento de informações (Hall et al., 2012). Além disso, existe um mecanismo através do qual os astrócitos reduzem a captação de glicose quando estimulados, ativando um *feedback* negativo que inibe a hexocinase astrocitária, disponibilizando a glicose para os neurônios. Assim, alguns pesquisadores defendem que os neurônios não dependeriam totalmente do lactato liberado pelos astrócitos, mas sim da glicose “poupada” por essas células (Dinuzzo et al., 2010). Além disso, os próprios neurônios parecem ter capacidade de produzir L-lactato (Dienel, 2012), que também pode entrar no encéfalo a partir da corrente sanguínea (uma vez que seus transportadores estão expressivamente presentes na BHE; Pellerin et al., 1998; Moreira et al., 2009) em condições nas quais as concentrações plasmáticas de lactato encontrem-se elevadas (Dalsgaard et al., 2004).



Portanto, fica claro que ainda existem diversas controvérsias sobre o papel da ANLS (Dienel, 2012), no metabolismo e transporte do lactato. Muitas dessas controvérsias devem-se a dificuldades metodológicas que não permitem confirmar a existência da ANLS, especialmente *in vivo*. A partir disso, surge novamente a hipótese de que o acúmulo de lactato no espaço extracelular do SNC tenha importância em processos de sinalização celular, complementares à sua ação como substrato energético.

De fato, desde a década de 1960, já se conhecem efeitos significativos do lactato como molécula sinalizadora (Björntorp, 1965). Com a descoberta da sua ligação ao GPR81, acredita-se que essa função seja desempenhada principalmente via esse receptor, cuja ativação pode estar envolvida em diversos processos patológicos e fisiológicos.

Como descrito anteriormente (ver item 3.2), o L-lactato não é excitado, mas sim transportado de forma passiva para o exterior das células através dos MCTs, a favor do seu gradiente de concentração. Portanto, é a taxa de produção, e não de liberação, de lactato que regula a sua atuação como molécula sinalizadora; além disso, as concentrações de lactato que ativam o receptor GPR81 precisam ser atingidas de forma mais ampla, por todo o espaço extracelular, e não de forma localizada, como ocorre na neurotransmissão clássica (Mosienko et al., 2015). A Figura 3 resume os processos liberação e atuação do lactato como molécula sinalizadora no SNC.

Todas essas características levantaram a hipótese do lactato desempenhar uma função de transmissor de volume dentro do encéfalo (Bergersen & Gjedde, 2012). O conceito de transmissão de volume descreve uma forma de comunicação celular através do fluido extracelular e do líquido cefalorraquidiano (CSF, do inglês, *cerebrospinal fluid*). Nesse caso, os sinais fluem da fonte à célula-alvo sem a necessidade de nenhum tipo de conexão entre elas, permitindo a sinalização por grandes distâncias, de forma que a molécula sinalizadora pode exercer seus efeitos neuromodulatórios sobre uma ampla gama de neurônios (Agnati et al., 2010; Fuxe et al., 2013).

A ação do receptor GPR81 na redução do AMPc pode regular diversos processos celulares, e o fato de o lactato atravessar passivamente as membranas e atuar como um transmissor de volume confere uma vantagem: através desse mecanismo, o lactato é capaz de unificar as respostas neurais tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, permitindo uma regulação extensiva do SNC.

#### **4 Caracterização molecular do GPR81**

O conhecimento da estrutura molecular de um receptor é essencial para que se possam desenhar possíveis agonistas do mesmo. Atualmente, a maioria dos estudos de modelagem de GPCRs de classe A, como é o caso do GPR81, se baseia na sua semelhança estrutural com a

rodopsina e nos seus 7 domínios transmembrana (7TM; Benned-Jensen & Rosenkilde, 2010). Os domínios que costumam receber maior enfoque são TM3 a TM7, uma vez que já se mostraram envolvidos na ligação dos GPCRs aos seus ligantes (Balmforth et al., 1997; Groblewski et al., 1997; Tunaru et al., 2005).

O receptor GPR81 apresenta vários domínios altamente conservados entre os receptores de mamíferos, com mais de 80% de identidade entre as sequências, e todos respondem ao L-lactato (Liu et al., 2009). Compartilha maior homologia com o receptor GPR109a, mas não responde aos seus agonistas, niacina e  $\beta$ -hidroxibutirato (Liu et al., 2009). As interações entre o par GPR109a-niacina/hidroxibutirato, porém, podem auxiliar na compreensão da ligação entre o GPR81 e o L-lactato, justamente pelo fato de que tanto o receptor quanto os ligantes são bastante semelhantes estruturalmente.

Até o presente momento, a estrutura cristalográfica do receptor não foi descrita ou depositada em bases de dados. Apenas modelagens prevendo a estrutura tridimensional a partir da sua sequência de aminoácidos estão disponíveis (acesso pelo link <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8C131>). O desenvolvimento de estudos testando experimentalmente esta estrutura seria importante para uma compreensão mais precisa das interações entre o GPR81 e seus ligantes endógenos ou exógenos.

Ahmed (Ahmed, 2011) demonstrou a presença de um resíduo de arginina em um domínio transmembrana do GPR81 que favorece a ligação a ácidos carboxílicos, enquanto Liu *et al.* (Liu et al., 2009) demonstraram que os resíduos Arg99, Tyr233, Arg240 e Thr267 dos domínios TM3, TM6 e TM7, respectivamente, são essenciais para a ligação com o L-lactato (interagindo diretamente com o ligante no sítio ativo). Os resíduos de Arg99 e Arg240 interagem com o grupo carboxila, à semelhança do que se observa na ligação da niacina ao GPR109a.

Em peixes-zebra, foram identificados dois receptores, zGPR81-1 e zGPR81-2, análogos ao GPR81 de mamíferos. Os receptores dos diferentes grupos filogenéticos não apresentam conservação estrutural considerável, mas compartilham a capacidade de ligação ao lactato e a mesma funcionalidade (Kuei et al., 2011). Dessa forma, a comparação entre esses receptores permite inferir quais os resíduos críticos para a manutenção da função do receptor e da interação com o seu ligante, uma vez que esses devem ter se mantido inalterados. O receptor GPR109a de mamíferos, altamente homólogo ao GPR81 e que responde à niacina (Wise et al., 2004), também é útil no entendimento dos resíduos críticos para a seletividade do GPR81 pelo lactato: a niacina difere do lactato essencialmente na posição de um grupamento hidroxila da cadeia lateral (Kuei et al., 2011); dessa forma, os resíduos discordantes nos sítios desses dois receptores devem promover essa seletividade.

Partindo dessas premissas, foram selecionados motivos conservados em todos os receptores análogos do GPR81, mas não em GPR109a e, através de mutações direcionadas, foram demonstrados quais os resíduos críticos para a manutenção de função e da capacidade de interação com o ligante. O modelo sugerido se refere ao motivo proteico C165-E166-S167-F168 da alça extracelular 2 (ECL2, do inglês, *extracelular loop 2*) como essencial à interação com o L-lactato; Glu166, juntamente com Arg71, do domínio transmembrana 2 (TM2), interage com o grupamento alfa-hidroxila do ligante, através de pontes de hidrogênio; Phe168 é um resíduo aromático e hidrofóbico, que pode aumentar a rigidez da região de ligação, afetando a interação. Seis resíduos conservados de cisteína (Cys6, 7, 88, 157, 165 e 252) do domínio extracelular podem formar três pontes de hidrogênio entre si, que modificam a conformação do receptor, compactando-o. A elucidação desses fatores auxilia na compreensão de como um ligante pequeno interage com resíduos tão distantes na estrutura primária e, também, do motivo pelo qual o sítio de ligação é seletivo a moléculas pequenas (Kuei et al., 2011).

## 5 Cascata intracelular de ativação do GPR81

Os GPCRs são receptores de membrana que conferem à célula uma estratégia evolutiva vital para a manutenção da homeostase: permitem perceber o ambiente extracelular e responder às suas alterações, decodificando uma ampla gama de sinais, desde neurotransmissores e hormônios até moléculas odoríferas ou mesmo a energia luminosa (Bockaert & Pin, 1999; Calebiro & Koszegi, 2019). É evidente, portanto, que os GPCRs participam ativamente de diversos processos fisiológicos e patológicos, relacionados aos sistemas sensoriais, ao metabolismo e às mais diversas formas de comunicação celular. Assim, se configuram como importantes alvos farmacológicos.

Quando ativados por seus ligantes - o L-lactato, para o GPR81 -, os GPCRs respondem com mudanças conformacionais, interagindo com a proteína G acoplada. Essa interação é a base da transdução de sinal dos GPCRs; por isso, a descoberta e elucidação da função das proteínas G na transdução de sinal rendeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1994 aos pesquisadores Alfred Gilman e Martin Rodbell. A proteína G atua como um amplificador de sinal: converte o sinal extracelular, o primeiro mensageiro, em um sinal que possa ser decifrado intracelularmente, através de um segundo mensageiro que pode ser produzido em quantidades muito maiores e modular diversas vias de sinalização (para revisão, ver Lefkowitz, 1994).

As proteínas G são heterotrimeros compostos pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Quando estimuladas pelo receptor, a mudança conformacional que este sofre induz a abertura do sítio ligante de nucleotídeo da proteína G (Hagberg et al., 2004) na subunidade  $\alpha$ . Isso causa uma alternância do estado de ligação a uma molécula de guanosina difosfato (GDP), que se desliga,

sendo substituída por uma de guanosina trifosfato (GTP; o que acontece naturalmente, pois o GTP está presente em concentrações muito maiores no citoplasma). Essa ligação ao GTP faz com que a subunidade  $\alpha$  se desacople das demais. Então, tanto o monômero  $\alpha$  quanto, menos frequentemente, o dímero  $\beta\gamma$  podem atuar sobre efetores - enzimas ou canais iônicos - que, por sua vez, podem ativar ou inibir os segundos mensageiros (para revisão, ver Tuteja, 2009). Por fim, quando ocorre a hidrólise do GTP a GDP, o heterotrímero se reassocia e o ciclo de ativação é finalizado (de Vries et al., 2000; Ross & Wilkie, 2000). Para que isso ocorra rapidamente e de forma regulada, a dessensibilização do receptor pode ser mediada por fosforilação pelas cinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs, do inglês *G protein-coupled receptor kinases*) seguida da ligação de  $\beta$ -arrestina. Esse mecanismo pode, até mesmo, promover a endocitose e retirada do receptor da membrana, o qual pode ser desfosforilado e reciclado (para revisão, ver Lefkowitz & Shenoy, 2005).

No caso do GPR81, acredita-se que a proteína G acoplada faça parte da subfamília  $G_i/o$ : a subunidade  $G_{i\alpha}$  atuaria inibindo a AC e, conseqüentemente, reduzindo a produção do segundo mensageiro AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; Liu et al., 2009; Ahmed et al., 2010). A Figura 4 ilustra a ativação do receptor e a subsequente estimulação da proteína G, resultando no desacoplamento das subunidades. Essa hipótese foi corroborada por ensaios *in vitro* com células que expressam o GPR81: o aumento da ligação de  $^{35}S$ -GTP $\gamma$ S é dependente do aumento das concentrações de L-lactato, culminando na redução da produção de AMPc (Cai et al., 2008); além disso, a toxina pertussis (PTX), inibidora da  $G_{i\alpha}$ , inibiu o efeito da ativação do GPR81 pelo lactato (Cai et al., 2008; Bozzo et al., 2013). O dímero  $G_{i\beta\gamma}$ , por sua vez, também atua na transdução de sinal, ativando a fosfolipase C (PLC), o que tem papel importante na sua interação com outros GPCRs (Abrantes et al., 2019), fenômeno comum em receptores dessa classe (Werry et al., 2003).

A redução da concentração de AMPc intracelular, por fim, modula diversas vias intracelulares essenciais para o metabolismo e sobrevivência celular, e também aquelas promotoras de processos patológicos e de morte celular. Dessa forma, a modulação do receptor GPR81 pode potencializar funções fisiológicas ou atenuar vias associadas à fisiopatologia de diversas doenças.

## 6 GPR81 na periferia

O GPR81 é principalmente expresso no tecido adiposo branco (TAB; Ge et al., 2008; Jenning et al., 2009), no qual foi verificada a sua seletividade pelo L-lactato (Cai et al., 2008). Também no TAB foi descrito o mecanismo por trás de uma função do lactato já conhecida há muitas décadas: a inibição da lipólise e da oxidação de ácidos graxos, com o intuito de promover a estocagem de metabólitos ricos em energia (Boyd et al. 2009; Gold et al., 1963; Björntorp,

1965; Achten & Jeukendrup, 2004). Liu *et al.* (Liu et al., 2009) demonstraram, tanto *in vitro* como *in vivo*, que isso ocorre justamente pela ativação do receptor GPR81 em resposta a aumentos endógenos de L-lactato após um alto aporte metabólico, como logo após uma refeição: o lactato promove, via GPR81, a regulação negativa da AC, resultando na inibição da síntese de AMPc, um mediador-chave no controle da lipólise e da glicólise. Cai *et al.* (Cai et al., 2008) corroboraram, em modelos animais e em estudos *ex vivo*, a ideia de que esse receptor tenha papel importante na resposta metabólica em condições de déficit energético e de oxigênio, como durante o exercício físico intenso.

O papel antilipolítico do lactato-GPR81 é complementar ao de outros pares de ligante-receptor também encontrados no tecido adiposo, como o  $\beta$ -hidroxibutirato-GPR109a (Taggart et al., 2005) e o propionato-GPR41 (Brown et al., 2003) na supressão da lipólise pela inibição da AC. Dessa forma, com todos esses efeitos observados, o GPR81 se configuraria também como um alvo terapêutico importante para o tratamento de dislipidemias, com menos efeitos colaterais que a niacina (agonista dos receptores GPR109a e GPR109b), que causa reações cutâneas (Ge et al., 2008).

Após uma refeição, há uma grande captação de glicose pelo TAB em resposta à concentração aumentada de insulina; grande parte dessa glicose é convertida em lactato – o que demonstra um “*shift*” metabólico, no qual o metabolismo se torna primariamente anaeróbico, em razão das condições hipóxicas às quais o tecido é exposto (Rooney & Trayhurn, 2011). O GPR81 responde primariamente a essa alta concentração de lactato liberada localmente, mais do que ao lactato fornecido via circulação (Ahmed et al., 2010), o que sugere um papel de sinalização autócrina e parácrina nesse contexto.

Já foi demonstrado que o receptor GPR81 está regulado negativamente em modelos animais de obesidade, tanto induzida por dietas ricas em gordura (HFD do inglês *high fat diet*; (Wanders et al., 2012; Yao et al., 2020), quanto associadas à diabetes tipo 2 (ob/ob - modelo caracterizado por alta inflamação; Feingold et al., 2011). O GPR81 também se mostrou essencial para o “*browning*” do TAB, processo que confere ao tecido características do tecido adiposo marrom (TAM), passando a apresentar uma maior capacidade de termogênese adaptativa. A ativação farmacológica do receptor, em animais obesos, preveniu a acumulação de gordura e melhorou o metabolismo lipídico (Yao et al., 2020).

Na periferia, o GPR81 também é expresso em baixas concentrações em outros tecidos, como o músculo esquelético, tecidos linfoides secundários, rim, fígado e pâncreas (Ge et al., 2008; Liu et al., 2009; Ahmed et al., 2010), além de células imunes, como macrófagos (Hoque et al., 2014), outras células apresentadoras de antígeno (APCs) e células imunes do intestino (Ranganathan et al., 2018).

Nesse contexto, outro papel bastante importante do receptor GPR81 é a sinalização anti-inflamatória. Através da ativação desse receptor e da sua interação com a arrestina  $\beta$ -2 (ARRB2), já reportada para diversos outros GPCRs (DeFea, 2008), o lactato foi capaz de modular negativamente o processo inflamatório, reduzindo a lesão inflamatória pancreática e hepática *in vivo* e *in vitro*. O mecanismo subjacente foi associado à redução da ativação do inflamassoma NLRP3 (do inglês, *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein*) nos macrófagos circulantes e residentes desses órgãos, além da consequente redução na produção de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ; Hoque et al., 2014). Uma vez que o pâncreas e o fígado são particularmente afetados em condições inflamatórias e que a IL-1 $\beta$  é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes em diversas patologias, o lactato poderia se configurar como um potencial agente terapêutico anti-inflamatório, o que já foi demonstrado em estudos clínicos, nos quais o lactato teve ação na redução da inflamação sistêmica em casos de pancreatite aguda (Wu et al., 2011; Buxbaum et al., 2014; de-Madaria et al., 2018).

Em um modelo animal de colite, também se observou que o GPR81 presente nas APCs (em especial nas células dendríticas e macrófagos) teve papel essencial na manutenção da homeostase imune intestinal em resposta ao lactato que está presente em altas concentrações no lúmen intestinal. Os animais tratados com lactato demonstraram uma redução na severidade da manifestação da doença, com menor perda de peso, menor dano tecidual e maior expressão de citocinas anti-inflamatórias em relação às pró-inflamatórias, funções que foram dependentes da ativação do receptor GPR81 (Ranganathan et al., 2018).

Ambos os estudos demonstram que o GPR81 tem papel importante na modulação da resposta imune inata, através das células apresentadoras de antígeno, que, por sua vez, atuam no direcionamento do fenótipo regulatório das células T (Treg) em detrimento da diferenciação em fenótipos que expressam citocinas pró-inflamatórias (Th1/Th17; Hoque et al., 2014; Ranganathan et al., 2018). O possível papel anti-inflamatório da ativação do GPR81 é outro mecanismo que torna esse receptor um potencial alvo-terapêutico para o tratamento de diversas doenças do SNC, uma vez que o envolvimento da resposta inflamatória é frequente na fisiopatologia das mesmas.

## 7 GPR81 no SNC

A localização da proteína do GPR81 no SNC foi demonstrada pela primeira vez em camundongos, através da técnica de imuno-histoquímica (Lauritzen et al., 2014). No encéfalo, a maior expressão foi verificada na barreira hematoencefálica, principalmente nas membranas plasmáticas de células endoteliais vasculares, nos compartimentos luminal e abluminal dos vasos e, em menor grau, nas membranas dos pés astrocitários perivasculares. No parênquima neural, a maior expressão do GPR81 foi observada em neurônios, especialmente nas células de Purkinje do

cerebelo, nos neurônios piramidais e no hilo do giro denteado do hipocampo e no neocórtex; e, em menor quantidade, nos astrócitos - mas ainda assim, o receptor é encontrado nessas células de maneira ampla (Ma et al., 2020). Essa distribuição foi confirmada com a quantificação da expressão do mRNA (RNA mensageiro) do receptor, que demonstrou uma maior expressão no cerebelo e hipocampo, em quantidades semelhantes, seguidos pelo neocórtex, com uma expressão 60% menor. Em relação à localização subcelular, o GPR81 estava altamente concentrado em membranas pré- e, especialmente, pós-sinápticas de sinapses excitatórias no hipocampo e no cerebelo, bem como em organelas vesiculares intracelulares, o que indica o tráfego do receptor a partir da e para a superfície celular. Em culturas primárias de neurônios de camundongos, a presença do GPR81 também foi comprovada por imuno-histoquímica e *Western blotting* (Bozzo et al., 2013).

Portanto, pode-se concluir que a expressão gênica do GPR81 está presente em diversos tecidos além do adiposo, estando o receptor amplamente distribuído no encéfalo: no córtex, no hipocampo e no cerebelo (para maiores informações, acessar as bases *The Allen Institute for Brain Science*, <http://www.brain-map.org>; *GENSTAT*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genstat>; *St. Jude Children's Research Hospital*, <http://www.stjudebgem.org>). O mRNA do receptor também foi encontrado no hipotálamo de camundongos (Ge et al., 2008). Em humanos, a expressão do mRNA do GPR81 foi observada no hipotálamo, mas não nos lobos temporal, frontal e occipital do córtex, nem no hipocampo, núcleo *accumbens* ou núcleo caudado (Lee et al., 2001).

Comparativamente, a expressão do mRNA do GPR81 foi cerca de 140 vezes menor no SNC em relação ao TAB, confirmando uma maior expressão no tecido adiposo, em termos gerais. Por outro lado, dentro do SNC, há variações na expressão entre diferentes regiões, estando o receptor mais concentrado em locais e compartimentos celulares específicos (Lauritzen et al., 2014), o que pode influenciar – e também ajudar a compreender – a função sinalizadora do lactato.

Recentemente, também foi verificada a presença do receptor no plexo coroide, região do sistema ventricular responsável pela produção do líquido (ou CSF), e na parte dorsal do terceiro ventrículo, especialmente nos limites entre o CSF e o parênquima cerebral ou o sangue. Essa localização se assemelha àquela dos MCTs, sugerindo um papel do GPR81 como sensor das concentrações de lactato liberadas no CSF. O fato de o receptor estar localizado de maneira expressiva em fibroblastos e em células endoteliais nessa região levanta a hipótese da indução de uma liberação de fatores de crescimento, como fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IFG, do inglês, *insulin-like growth factor*) ou fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*) no CSF, em resposta ao lactato (Hadzic et al., 2020). Esse mecanismo poderia coordenar a angiogênese e a neurogênese nas regiões adjacentes.

A funcionalidade do receptor GPR81 no encéfalo foi confirmada pela capacidade do L-lactato e do agonista DHBA de reduzir, de forma dose-dependente, a geração de AMPc pela AC estimulada por forskolina (ativador da AC), à semelhança do que se observa na periferia (Lauritzen et al., 2014).

Através da ativação do GPR81, o lactato se mostrou um modulador negativo da frequência de transientes de cálcio intracelulares em cultura primária de neurônios corticais de murinos, o que se correlacionou diretamente com a frequência de disparos de potenciais de ação; a confirmação de que esse papel se deve à ação dependente do receptor se deu pela observação de uma resposta semelhante produzida pelo estereoisômero D-lactato e pelo agonista específico DHBA (uma vez que ambos ativam o receptor, mas não são eficientemente metabolizados) e da inativação pela PTX. O mesmo não se repetiu com a utilização de outros substratos energéticos (piruvato e glicose), de forma que é provável que essa ação seja independente do papel metabólico do lactato (Bozzo et al., 2013). Esse efeito inibitório pode ser importante para prevenir, de forma parácrina, uma ativação neuronal excessiva em situações nas quais essa hiperativação pode ser deletéria, como na epilepsia. Os resultados vão de encontro aos achados relativos à localização do receptor, que se concentrava no compartimento somatodendrítico, especialmente nas membranas pré- e pós-sinápticas das sinapses excitatórias (Lauritzen et al., 2014). A ativação do GPR81 também é capaz de modular a excitabilidade intrínseca: quando em baixas concentrações, o lactato aumenta o tempo de recuperação pós-inativação dos canais de sódio em células piramidais do hipocampo de ratos; em altas concentrações, aumenta a frequência de disparos, de forma independente do seu efeito metabólico (Herrera-López & Galván, 2018).

Alinhados com esses resultados, estudos *in vitro* visando a desvendar os mecanismos pelos quais o GPR81 modula a atividade sináptica observaram a ocorrência de mudanças nas propriedades intrínsecas da membrana, associando a redução na excitabilidade a mecanismos pré-sinápticos (Abrantes et al., 2019). Em culturas primárias de neurônios corticais de camundongos, foi observado um aumento de cerca de duas vezes na atividade neuronal basal em camundongos nocaute (KO, do inglês, *knockout*) para o GPR81, novamente indicando o papel do receptor na inibição tônica da ativação neuronal. Além disso, foi confirmado que a modulação da atividade sináptica envolve os mesmos efetores *downstream* do receptor GPR81 já descritos no TAB. Utilizando-se de estratégias farmacológicas *in vitro* que modulam a atividade da AC, positiva (forskolina) ou negativamente (SQ22536), e da proteína cinase A (PKA, do inglês *protein kinase A*), um dos principais alvos do sistema AC-AMPc, foi corroborado o efeito da subunidade  $G_{i\alpha}$  na inativação da AC e redução do AMPc também em neurônios. Ademais, foi demonstrado o envolvimento do dímero  $G_{\beta\gamma}$  do receptor na ativação da fosfolipase C (PLC) e na interação com outros receptores (Abrantes et al., 2019).



É importante salientar os resultados de um estudo *in vitro* no *locus coeruleus*, que demonstrou uma atividade modulatória do L-lactato sobre a excitabilidade dos neurônios noradrenérgicos, aumentando a liberação de NE (norepinefrina), de forma semelhante à atividade evocada pelo glutamato. Isso foi mediado pela ativação da via da AC-AMPC-PKA. Esse efeito é contrário aos observados em resposta à ativação do GPR81 nas demais regiões do encéfalo (e na periferia), sugerindo a possibilidade da existência de um outro receptor de membrana, possivelmente também um GPCR, ainda desconhecido, com função oposta à do GPR81 e aparente  $EC_{50}$  em torno de  $680\mu\text{M}$  (Tang et al., 2014). Esse mesmo estudo comprovou, utilizando a técnica de optogenética em fatias cerebrais, a liberação de lactato pelos astrócitos do *locus coeruleus*.

Todas as evidências descritas até aqui apontam para uma ação sinalizadora bastante ampla do lactato mediada pelo GPR81 no encéfalo: por um mecanismo de *feedback* negativo, reduz a glicólise, atenuando a acidificação e promovendo a preservação da glicose para utilização neuronal; modula a atividade sináptica, impedindo a hiperexcitabilidade; controla a interação do parênquima cerebral com o CSF e o sangue; dentre diversos outros papéis a serem investigados a partir das vias às quais está associado. Assim, o GPR81 se configura como um alvo-terapêutico importante para doenças cuja fisiopatologia envolva disfunções nesses processos.

## 8 GPR81 e vias de sobrevivência e morte celular

Nem todos os efetores *downstream* da ativação do GPR81 são conhecidos. Por exemplo, uma via que parece ser importante e diretamente modulada pela ativação do receptor é a via das cinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2, do inglês, *extracellular receptor kinase 1/2*), uma cinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), mas os intermediários são pouco conhecidos. De fato, a maioria dos GPCRs sinalizam através de cascatas de MAPKs, associadas ao controle do metabolismo, regulando a proliferação, crescimento e diferenciação celular, além do processo de apoptose (Schwindinger & Robishaw, 2001; Sun et al., 2002; Ahn et al., 2009; Lorenz et al., 2009). A subunidade  $G_{i\alpha}$  parece envolvida na ativação de ERK1/2 através da inibição da AC, reduzindo os níveis de AMPC e a atividade da PKA. O dímero  $G_{\beta\gamma}$ , por sua vez, parece ativar a ERK1/2 principalmente pelo aumento da Akt através da ativação da fosfolipase C (PLC, do inglês *phospholipase C*) ou da proteína cinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*; para revisão, ver Hu et al., 2020).

Em resposta ao L-lactato e ao agonista DHBA, se observou uma fosforilação da ERK1/2 dependente do receptor GPR81, o que parece ocorrer em resposta à dissociação da subunidade  $G_{\beta\gamma}$ , mediada por duas vias: uma dependente de PKC e da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e outra dependente da transativação de um receptor de fatores de crescimento, o receptor de fator de

crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R, do inglês *insulin-like growth factor-1 receptor*), pela PI3K (fosfatidil-inositol 3-cinase), fenômeno comum entre os GPCRs (Li et al., 2014).

Recentemente, também foi verificado o envolvimento do GPR81 na promoção da angiogênese através da ativação da via da PI3K/Akt, importante na sobrevivência celular, inativando mediadores pró-apoptóticos e promovendo a sobrevivência tumoral em modelo de câncer de mama (Jin Lee et al., 2016). Alinhado com esses dados, a ativação do receptor GPR81 parece estar associada com a promoção da diferenciação de osteoblastos, via  $G_{\beta\gamma}$ , ativando a PKC e a Akt (Wu et al., 2018).

No SNC, há poucos estudos investigando o papel dessas vias de sobrevivência e proliferação celular: o GPR81 promove a fosforilação da ERK 1/2 e da Akt, resultando em uma modulação da angiogênese (Morland et al., 2017); o lactato, via GPR81, também parece modular a fosforilação de Akt nos fibroblastos das leptomeninges, promovendo a neurogênese (Lambertus et al., 2021). Mais recentemente, um estudo em *preprint* demonstrou que a ativação do GPR81 promove a ativação da via da PI3K/Akt em modelo animal de doença de Alzheimer, possivelmente reduzindo a formação das placas de  $\beta$ -amiloide, um dos eventos-chave na fisiopatologia da doença (Zhang et al., 2021).

Assim, essas vias se configuram como alvos importantes a serem estudados quando se avalia a neuroproteção conferida pelo lactato via GPR81 no SNC, uma vez que promovem a sobrevivência celular e inibem a morte por apoptose.

## 9 GPR81 e o inflamassoma

Inflamassomas são complexos proteicos localizados no meio intracelular, ativados durante a resposta celular mediada pela maturação de caspases pró-inflamatórias, culminando no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Singhal et al., 2014). No SNC, as respostas inflamatórias frente a determinados insultos são desempenhadas principalmente pela microglia e estão associadas à polarização microglial em direção ao fenótipo M1 (pró-inflamatório clássico) ou M2 (anti-inflamatório; Serdar et al., 2019). Os inflamassomas estão envolvidos em diferentes mecanismos de resposta a condições patológicas do SNC, sendo a resposta inflamatória inicial da microglia associada à ativação do inflamassoma NLRP3 (do inglês *nod-like receptor protein 3*), acarretando a produção de citocinas inflamatórias (Qiu et al., 2016). Os inflamassomas NLRP3 necessitam da molécula adaptadora ASC (do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*), a qual possui um domínio CARD (*caspase activation and recruitment domains*) que se liga à caspase-1, ativando-a (de Zoete et al., 2014).

Sabe-se que, após a HI neonatal, a expressão do NLRP3 se eleva na microglia entre 24h e 72h (Ystgaard et al., 2015), intensificando a produção de citocinas pró-inflamatórias. A

deficiência de NLRP3, avaliada pelo uso de camundongos KO para o NLRP3, melhora os desfechos em modelos de isquemia em animais adultos (Yang et al., 2014). Adicionalmente, a ativação do receptor GPR81 pelo lactato parece bloquear a produção do NLRP3 em modelo de pancreatite (Hoque et al., 2014), mas esse papel nunca foi testado no SNC. Além do NLRP3, o aumento na expressão do MCT1 também já foi evidenciado na microglia após a isquemia cerebral em ratos adultos (Moreira et al., 2009), sugerindo um papel importante do transporte de lactato na ativação do fenótipo microglial M1 (Moreira et al., 2009). Aparentemente, tanto o silenciamento do MCT1 (Moreira et al., 2009) quanto a administração de lactato (reduzindo a função transportadora do MCT1) suprimem a expressão de marcadores inflamatórios como iNOS (óxido nítrico sintase induzida), IL-1 $\beta$  e IL-6 (Kong et al., 2019). Esse mecanismo provavelmente ocorre pela manutenção do lactato no compartimento intracelular, como “produto final” da via glicolítica e, portanto, reduzindo a atividade glicolítica microglial necessária para a ativação do fenótipo pró-inflamatório M1. No modelo de hipóxia-isquemia, além da neuroinflamação, a morte neuronal por falha energética é bastante evidente (Vannucci & Hagberg, 2004). Como o lactato é o substrato energético preferencial de neurônios (Schurr et al., 1997), poderia ser utilizado na prevenção da falha energética em um ambiente de privação de glicose e oxigênio (Jourdain et al., 2016). Assim, a via do inflamassoma pode ter um papel-chave na neuroproteção conferida pela ativação do GPR81, e estudos visando a desvendar esse mecanismo tornam-se necessários.

## 10 GPR81 e angiogênese

Como descrito anteriormente (ver tópico 8), a ativação do GPR81 parece estimular a angiogênese no SNC. Além disso, o fato de o lactato ter um papel na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (Gordon et al., 2008) foi a descoberta que despertou a hipótese de o mesmo funcionar como um sinalizador celular. Assim, é possível que o lactato module as respostas angiogênicas no SNC (Zhou et al., 2018) através da sinalização via GPR81 (Morland et al., 2017). Já foi demonstrado que a administração sistêmica de L-lactato é capaz de promover a angiogênese cerebral de forma semelhante àquela observada em um modelo de exercício físico (Morland et al., 2017). Este efeito foi atribuído à ativação do receptor GPR81, pois o efeito cessou quando animais KO (GPR81<sup>-/-</sup>) para o gene deste receptor receberam a administração de L-lactato. Adicionalmente, em fatias hipocâmpais *ex vivo*, a ativação do GPR81 pelo agonista DHBA estimulou a expressão e secreção do VEGFA (fator de crescimento do endotélio vascular A), conhecido por estimular a angiogênese (Ferrara, 2000) a neurogênese e a melhora da função sináptica (de Rossi et al., 2016; Zhou et al., 2018). Essa observação confirmou que a ação do L-lactato na modulação da angiogênese ocorre via receptor. Cabe ressaltar que o lactato, em modelo

de hemorragia cerebral, se acumulou no foco da lesão e facilitou a translocação do NF- $\kappa$ B, potencializando a angiogênese e a neurogênese nesse local (Zhou et al., 2018).

O GPR81 ainda demonstrou ter um papel importante na supressão da inflamação endotelial e no estresse oxidativo induzido pelo estresse de cisalhamento oscilatório, um fator de risco para a aterosclerose (Sun et al., 2019). Tanto a inflamação como o estresse oxidativo são dois processos importantes na fisiopatologia da isquemia cerebral, de forma que os mecanismos envolvidos na proteção conferida pela ativação do GPR81 podem ser importantes nesse contexto.

### **11 L-lactato como agente neuroprotetor na isquemia cerebral: ação metabólica, sinalizadora ou dupla função?**

Concentrações séricas elevadas de lactato costumam ser consideradas como um indicativo de mau prognóstico clínico, sendo um marcador de condições hipóxicas ou que envolvam a redução de substratos energéticos, como durante a isquemia ou em lesões traumáticas cerebrais (Cohen & Simpson, 1975).

Entretanto, com a elucidação dos mecanismos metabólicos e sinalizadores nos quais o lactato está envolvido, surgiu a hipótese de esta molécula não ser um resíduo deletério, mas funcione como uma tentativa do próprio encéfalo de se “auto-curar”. Estudos *in vitro* com culturas de astrócitos já demonstraram que o lactato não prejudica as células em pH normal, mesmo com a exposição por 6h a 20 mmol/L de lactato (Nedergaard & Goldman, 1993). O papel citotóxico atribuído ao lactato provavelmente se deve à acidose promovida pelo seu cotransporte com prótons ( $H^+$ ), e não à molécula de lactato em si - e até mesmo esse efeito já foi desafiado pela demonstração de que a acidose moderada protege contra a excitotoxicidade glutamatérgica em culturas celulares (Andreeva et al., 1992; Kaku et al., 1993). Seria possível, então, que, ao invés de causar danos às células, o lactato funcionasse como um neuroprotetor nessas situações de lesão neural?

Esse efeito neuroprotetor do lactato realmente já foi demonstrado em diversos tipos de lesão encefálica, especialmente naquelas em que a fisiopatologia envolve eventos hipóxicos. Em modelo animal de lesões por traumatismo cranioencefálico (TBI, do inglês *traumatic brain injury*), se verificou um efeito protetor do lactato em relação ao déficit cognitivo e à regeneração de ATP (Rice et al., 2002; Holloway et al., 2007), bem como à redução do edema celular e à melhora da oxigenação do encéfalo (Duhaut et al., 2021). Em modelo de hemorragia intracraniana (ICH, do inglês *intracranial hemorrhage*), o lactato auxilia na proteção contra a morte por apoptose e estimula a regeneração, aumentando a angiogênese e a neurogênese (Zhou et al., 2018). Efeitos protetores do lactato associados à TBI e à ICH agudas também já foram observados na clínica (Gallagher et al., 2009; Ichai et al., 2009, 2013; Cureton et al., 2010; Bouzat

et al., 2014; Carteron et al., 2018) e sugerem que o lactato possa ser utilizado no tratamento dessas condições.

Em modelos de isquemia cerebral, cuja fisiopatologia se assemelha bastante às duas condições anteriormente citadas, diversos efeitos neuroprotetores do L-lactato vêm sendo bastante estudados. Em contexto isquêmico, o lactato se mostra especialmente promissor, mas estudos atuais se restringem a modelos experimentais. É importante citar que o lactato administrado periféricamente pós-isquemia chega ao SNC rapidamente e é metabolizado (Hyacinthe et al., 2020; Tassinari et al., 2020; Roumes et al., 2021). Há décadas, já se demonstrou *in vitro* que, após a fase de reoxigenação, é o lactato, e não a glicose, que auxilia na recuperação da função sináptica (Schurr et al., 1997); isso se soma ao seu papel como substrato metabólico para o tecido encefálico com baixa (ou nenhuma) perfusão sanguínea, citado anteriormente (ver item 3.2), o que é reforçado, por exemplo, pela observação do aumento na expressão dos MCTs reduziu o volume de lesão em modelo de acidente vascular encefálico (AVE; Wang et al., 2011). Em relação à neuroproteção propriamente dita, a administração de lactato reduziu a lesão encefálica e melhorou os desfechos comportamentais e funcionais em modelo animal de oclusão transitória da artéria cerebral média (tMCAO, do inglês, *transient middle cerebral artery occlusion*; (Berthet et al., 2009, 2012; Horn & Klein, 2013; Castillo et al., 2015; Buscemi et al., 2020). Também se verificou que a administração de lactato causou redução da morte celular em modelos *ex vivo* de privação de oxigênio e glicose (OGD, do inglês, *oxygen-glucose deprivation*) em fatias hipocámpais (Schurr et al., 1999; Berthet et al., 2009; Castillo et al., 2015). Em modelos animais de hipóxia-isquemia neonatal, estudos recentes mostraram um promissor efeito do lactato na redução da lesão encefálica, acompanhado de melhora em parâmetros comportamentais (Tassinari et al., 2020; Roumes et al., 2021).

Em experimentos *in vivo* em modelo de dano neural excitotóxico induzido pela infusão de glutamato, a injeção concomitante de L-lactato reduziu a lesão e atenuou a depleção de glicose (Ros et al., 2001). O papel neuroprotetor do L-lactato nessas condições era, desde então, atribuído a sua capacidade de atender às demandas energéticas neuronais associadas às elevadas concentrações de glutamato, uma vez que nessas condições a captação de glicose é inibida. Porém, se demonstrou *in vitro* que a neuroproteção envolve outros mecanismos e o ATP produzido a partir da utilização do lactato, em contextos excitotóxicos, atua como um sinalizador autócrino/parácrino que ativa os receptores purinérgicos P2Y do próprio neurônio ou dos neurônios adjacentes; esses receptores, por sua vez, ativam a via da PI3K, que causa a hiperpolarização da célula e consequente redução da excitabilidade (Jourdain et al., 2016). A neuroproteção se mostrou concentração-dependente, uma vez que, em contextos fisiológicos, o lactato potencializa a neurotransmissão glutamatérgica, atuando como inibidor apenas em

situações excitotóxicas, através da modulação dos receptores de glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato; Jourdain et al., 2018).

Todas essas observações explicitam a importância da ANLS no contexto excitotóxico, uma vez que os astrócitos são os principais produtores de lactato no encéfalo (Pellerin & Magistretti, 1994). No contexto das sinapses glutamatérgicas, em que a recaptação de glutamato induz a ativação da glicólise e a liberação de lactato para os neurônios (Pellerin & Magistretti, 1994), o glutamato liberado em excesso poderia aumentar a produção de lactato pelos astrócitos e, possivelmente, ativar esse sistema de sinalização neuroprotetora nos neurônios. Já que a excitotoxicidade é um componente importante na fisiopatologia da lesão encefálica na maioria das patologias do SNC, especialmente lesões traumáticas, hemorragia intracraniana e isquemia cerebral (para revisão, ver Arundine & Tymianski, 2004), esses resultados são sugestivos de um possível mecanismo associado à neuroproteção do lactato observadas nesses modelos.

Embora os efeitos neuroprotetores do lactato sejam atribuídos exclusivamente ao seu papel como substrato metabólico, a maioria dos estudos descritos até aqui não caracterizou o mecanismo de ação envolvido; assim, a descoberta do receptor GPR81 e da sua presença no SNC levanta uma questão importante: o papel neuroprotetor do lactato na isquemia cerebral e em patologias afins poderia estar associado a uma ação sinalizadora, via receptor GPR81?

O papel neuroprotetor do lactato na redução da morte celular pós-isquemia observado *in vivo* (modelo tMCAO) e *in vitro* (modelo de OGD) foi atribuído tanto à ativação do receptor quanto ao seu papel como substrato metabólico, de maneira complementar (Castillo et al., 2015). Nesse estudo, verificou-se que a administração de D-lactato conferiu uma proteção semelhante àquela observada em resposta ao L-lactato. O D-lactato foi utilizado porque, teoricamente, é um agonista do receptor que não seria metabolizado (Tekkök et al., 2005; Rinholm et al., 2011). Entretanto, essa afirmação é questionada (Flick & Konieczny, 2002) e o próprio estudo mostrou uma oxidação parcial do estereoisômero D-lactato (Castillo et al., 2015). Outros substratos metabólicos transportados pelos MCTs, como o piruvato e o acetato, não conferiram proteção, ou conferiram apenas proteção parcial. Sugere-se, assim, um possível papel dual do lactato como neuroprotetor: atuando como substrato energético de neurônios em contexto de privação de glicose, mas também agindo por sinalização via GPR81. Além disso, a expressão do receptor está aumentada no hemisfério cerebral isquêmico, e esse aumento é potencializado pela administração de lactato; assim, é possível que exista um mecanismo de regulação da expressão do GPR81 em resposta às concentrações de lactato no SNC (Castillo et al., 2015).

Condizentes com a ideia da possível ação dupla do lactato, outros estudos trouxeram evidências do envolvimento da ativação do GPR81 na neuroproteção conferida pelo lactato em diversas condições: parece melhorar a consolidação da memória (Scavuzzo et al., 2020) e

aumentar a neurogênese na zona ventricular-subventricular (Lambertus et al., 2021) em resposta ao lactato administrado ou produzido durante o exercício físico; esse efeito pode estar relacionado à liberação de fatores de crescimento no CSF pelos fibroblastos e células endoteliais do plexo coroide em resposta a altas concentrações de lactato (Hadzic et al., 2020). A neurogênese nessa região parece ter papel protetor na formação de memórias, evitando o declínio cognitivo (Eichenbaum & Robitsek, 2009).

Um trabalho em *preprint* mostrou *in vivo* um efeito bastante pronunciado em modelo de hipóxia-isquemia neonatal, que sugere que o GPR81 é um regulador transcricional chave das vias relacionadas à neurogênese e à regeneração pós evento hipóxico-isquêmico. Se observou pouca diferença na lesão encefálica a curto prazo entre os animais KO para o GPR81 e os selvagens (WT, do inglês *wild-type*); a longo prazo, porém, houve uma perda de tecido significativamente maior nos animais KO em todas as regiões analisadas, o que sugere o papel essencial do receptor nos processos de reparo tecidual. Isso foi confirmado pela demonstração da redução da proliferação e renovação de células progenitoras neurais; se observou, ainda, que o receptor GPR81 induz a diferenciação dessas células em neurônios, em detrimento da diferenciação em astrócitos, além de estimular a proliferação e ativação da microglia (importante nos momentos iniciais da lesão para facilitar os processos de reparo subsequentes). Por fim, uma análise transcriptômica mostrou uma resposta transcricional bastante evidente no hemisfério ipsilateral dos animais WT, associada à regulação do ciclo celular e à resposta imune, o que não ocorreu nos animais KO (Kennedy et al., 2020)

A estimulação do receptor por dois de seus agonistas específicos, DHBA e CHBA, após tMCAO, porém, não demonstrou efeitos significativos na redução do volume de lesão ou na melhora em parâmetros comportamentais. Os autores sugerem que isso possa ter ocorrido devido à interferência do lactato endógeno produzido em altas quantidades nessa condição, podendo ter ocorrido saturação dos receptores ou, ainda, uma redução da resposta causada por dessensibilização após hiperexcitação, de forma que o estudo não pode descartar nem o papel metabólico nem o papel sinalizador do lactato (Buscemi et al., 2021).

Outro estudo demonstrou resultados contrastantes com os demais, sugerindo que a ativação do GPR81 pelo L-lactato contribui para a morte neuronal pós-isquemia. Além disso, a inibição do receptor pelo antagonista 3-OBA protegeu contra essa lesão, reduzindo a morte celular por apoptose (Shen et al., 2015).

Mais recentemente, foi demonstrado *in vitro* que a via de sinalização ativada pelo GPR81 também está associada à neuroproteção em contextos excitotóxicos: em astrócitos, o lactato promoveu o aumento da expressão de Arc/arg3.1, associado à regulação da plasticidade sináptica, de forma MAPK-dependente. Esse efeito, porém, se demonstrou não ser dependente da ativação

da proteína  $G_i$ , mas sim mediado por uma via associada à  $\beta$ -arrestina, não descrita até então para esse receptor (Ma et al., 2020). Esse efeito parece induzir a internalização dos receptores glutamatérgicos astrocíticos, reduzindo o dano excitotóxico nessas células. Porém, o papel do lactato na proteção contra a excitotoxicidade, mediado pelo receptor GPR81, ainda precisa ser avaliado em neurônios.

Outro efeito do GPR81 ainda pouco estudado no encéfalo, porém bastante importante na periferia, é sua ação anti-inflamatória, que poderia contribuir imensamente na atenuação dos desfechos negativos de várias condições, uma vez que a maioria das doenças do SNC tem uma importante base inflamatória. Uma região onde há uma alta expressão do receptor GPR81 (Lauritzen et al., 2014), mas na qual sua função ainda é pouco conhecida, é a BHE. Altas concentrações de lactato na unidade neurovascular da BHE estão associadas a neuroinflamação e disfunção da barreira (Mariga et al., 2014). Em modelo *in vitro*, foi demonstrado que a ativação do receptor estimula a biogênese mitocondrial e a angiogênese, controlando também a permeabilidade da camada de células endoteliais (Khilazheva et al., 2017). Por outro lado, o mesmo grupo observou que o dano à BHE reduziu a expressão de GPR81 e de MCT1 nas células endoteliais da microvasculatura encefálica. Essa redução, portanto, pode impedir o efeito positivo do L-lactato na dinâmica mitocondrial, prejudicando o metabolismo do endotélio e suprimindo a angiogênese (Boitsova et al., 2018).

Em conjunto, esses resultados demonstram a necessidade de avaliar de forma mais aprofundada os mecanismos associados à neuroproteção conferida pelo lactato. A Figura 5 resume os possíveis mecanismos neuroprotetores ativados pelo receptor GPR81 no SNC. Portanto, além dos efeitos metabólicos do lactato, é de extrema importância a compreensão das vias ativadas pelo receptor GPR81, uma vez que os processos aparentemente regulados pelo receptor estão envolvidos em diversas patologias. A Figura 6 sumariza as principais descobertas relativas ao receptor.

## 12 Conclusões e perspectivas

Os dados revisados no presente trabalho permitem concluir que o receptor de lactato GPR81 pode ser considerado como um potencial alvo-terapêutico no tratamento de diversas doenças que acometem o SNC, parecendo ser especialmente promissor em casos de isquemia encefálica.

Na isquemia cerebral, a redução do fluxo sanguíneo e a consequente redução do aporte de oxigênio e glicose fazem do uso de substratos energéticos alternativos, como o lactato, uma estratégia terapêutica bastante interessante para a redução da lesão aguda - especialmente no caso da hipóxia-isquemia neonatal, pois em etapas iniciais do neurodesenvolvimento os substratos



preferenciais dos neurônios são o lactato e os corpos cetônicos, e não a glicose. Adicionalmente, a fisiopatologia da lesão isquêmica envolve, além da redução do fluxo sanguíneo cerebral, a excitotoxicidade, a modulação das vias de morte e sobrevivência celular e os processos inflamatórios e de reparo tecidual. Todos esses processos parecem ser modulados, pelo menos parcialmente, pelo receptor GPR81 – mas muitos destes ainda não foram estudados no SNC.

Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de mais estudos sobre o GPR81 e as vias de sinalização ativadas pela ligação do lactato ao receptor. Para tanto, o conhecimento da sua estrutura, bem como o desenvolvimento ou a descoberta de agonistas específicos torna-se primordial. Para além do papel neuroprotetor, o GPR81 parece ser importante em diversos processos fisiológicos envolvidos na manutenção da homeostase e no processamento de informações, modulando a atividade sináptica, o metabolismo encefálico, a neurogênese e o fluxo sanguíneo cerebral.

Trabalhos recentes têm elucidado o papel sinérgico das duas formas de ação do lactato na neuroproteção: como substrato metabólico e sinalizador celular. Mais estudos são necessários no intuito de compreender de forma mais profunda os mecanismos envolvidos em cada uma dessas ações. Isso poderia permitir uma maior segurança para a utilização do GPR81 como alvo-terapêutico para o tratamento da isquemia cerebral e condições associadas, as quais atingem milhares de pessoas anualmente, sendo uma causa importante de morte e de morbidade em todas as idades.

## 13 Referências

- Abi-Saab, W., Maggs, D. G., Jones, T., Jacob, R., Srihari, V., Thompson, J., Kerr, D., Leone, P., Krystal, J. H., Spencer, D. D., During, M. J., Sherwin, R. S. Striking Differences in Glucose and Lactate Levels Between Brain Extracellular Fluid and Plasma in Conscious Human Subjects: Effects of Hyperglycemia and Hypoglycemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 22:271–279. doi: 10.1097/00004647-200203000-00004.
- Abrantes, H. de C., Briquet, M., Schmuziger, C., Restivo, L., Puyal, J., Rosenberg, N., et al. (2019). The lactate receptor HCAR1 modulates neuronal network activity through the activation of G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  subunits. *Journal of Neuroscience* 39, 4422–4433. doi:10.1523/JNEUROSCI.2092-18.2019.
- Achten, J., and Jeukendrup, A. E. (2004). Optimizing fat oxidation through exercise and diet. *Nutrition* 20, 716–727. doi:10.1016/j.nut.2004.04.005.
- Agnati, L. F., Guidolin, D., Guescini, M., Genedani, S., and Fuxe, K. (2010). Understanding wiring and volume transmission. *Brain Research Reviews* 64, 137–159. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.03.003.
- Ahmed, K., Tunaru, S., Tang, C., Müller, M., Gille, A., Sassmann, A., et al. (2010). An Autocrine Lactate Loop Mediates Insulin-Dependent Inhibition of Lipolysis through GPR81. *Cell Metabolism* 11, 311–319. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.012.
- Ahmed, K. (2011). Biological roles and therapeutic potential of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Frontiers in Endocrinology* 2. doi:10.3389/fendo.2011.00051.
- Ahn, S., Kim, J., Hara, M. R., Ren, X. R., and Lefkowitz, R. J. (2009).  $\beta$ -arrestin-2 mediates anti-apoptotic signaling through regulation of BAD phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8855–8865. doi:10.1074/jbc.M808463200.
- Ainscow, E. K., Mirshamsi, S., Tang, T., Ashford, M. L. J., and Rutter, G. A. (2002). Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: Evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Journal of Physiology* 544, 429–445. doi:10.1113/jphysiol.2002.022434.
- Andreeva, N., Khodorov, B., Stelmashook, E., Sokolova, S., Cragoe Jr, E., Victorov, I. (1992). 5-(N-Ethyl-N-Isopropyl)Amiloride and Mild Acidosis Protect Cultured Cerebellar Granule Cells Against Glutamate-Induced Delayed Neuronal Death. *Neuroscience* 49, 175-181. doi: 0.1016/0306-4522(92)90085-g
- Arundine, M., and Tymianski, M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 657–668. doi:10.1007/s00018-003-3319-x.
- Balmforth, A. J., Lee, A. J., Warburton, P., Donnelly, D., and Ball, S. G. (1997). The conformational change responsible for AT1 receptor activation is dependent upon two juxtaposed asparagine residues on transmembrane helices III and VII. *Journal of Biological Chemistry* 272, 4245–4251. doi:10.1074/jbc.272.7.4245.
- Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism* 14, 724–738. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016.

- Bened-Jensen, T., and Rosenkilde, M. M. (2010). Distinct expression and ligand-binding profiles of two constitutively active GPR17 splice variants. *British Journal of Pharmacology* 159, 1092–1105. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00633.x.
- Bergersen, L. H., and Gjedde, A. (2012). Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain? *Frontiers in Neuroenergetics* 4, 5. doi:10.3389/fnene.2012.00005.
- Bergersen, L. H. (2015). Lactate transport and signaling in the brain: Potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35, 176–185. doi:10.1038/jcbfm.2014.206.
- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P. J., and Hirt, L. (2009). Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 1780–1789. doi:10.1038/jcbfm.2009.97.
- Berthet, C., Castillo, X., Magistretti, P. J., and Hirt, L. (2012). New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia: Extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration. *Cerebrovascular Diseases* 34, 329–335. doi:10.1159/000343657.
- Björntorp, P. (1965). The Effect of Lactic Acid on Adipose Tissue Metabolism in Vitro. *Acta Medica Scandinavica* 178, 253–255. doi:10.1111/j.0954-6820.1965.tb04268.x.
- Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: An evolutionary success. *EMBO Journal* 18, 1723–1729. doi:10.1093/emboj/18.7.1723.
- Boitsova, E. B., Morgun, A. v., Osipova, E. D., Pozhilenkova, E. A., Martinova, G. P., Frolova, O. v., et al. (2018). The inhibitory effect of LPS on the expression of GPR81 lactate receptor in blood-brain barrier model in vitro. *Journal of Neuroinflammation* 15. doi:10.1186/s12974-018-1233-2.
- Boumezbeur, F., Petersen, K. F., Cline, G. W., Mason, G. F., Behar, K. L., Shulman, G. I., et al. (2010). The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Neuroscience* 30, 13983–13991. doi:10.1523/JNEUROSCI.2040-10.2010.
- Bouzat, P., and Oddo, M. (2014). Lactate and the injured brain: Friend or foe? *Current Opinion in Critical Care* 20, 133–140. doi:10.1097/MCC.0000000000000072.
- Bouzat, P., Sala, N., Suys, T., Zerlauth, J. B., Marques-Vidal, P., Feihl, F., et al. (2014). Cerebral metabolic effects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain. *Intensive Care Medicine* 40, 412–421. doi:10.1007/s00134-013-3203-6.
- Boyd, A. E., Giamber, S. R., Mager, M., and Lebovitz, H. E. (1974). Lactate Inhibition of Lipolysis in Exercising Man. *Metabolism* 23, 531–542. doi: 10.1016/0026-0495(74)90081-X
- Bozzo, L., Puyal, J., and Chatton, J. Y. (2013). Lactate Modulates the Activity of Primary Cortical Neurons through a Receptor-Mediated Pathway. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0071721.
- Brooks, G. A. (1986). The lactate shuttle during exercise and recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 18, 360–368. doi:10.1249/00005768-198606000-00019.
- Brooks, G. A. (2018). The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism* 27, 757–785. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.008.

- Brouns, R., and de Deyn, P. P. (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 111, 483–495. doi:10.1016/j.clineuro.2009.04.001.
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., et al. (2003). The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry* 278, 11312–11319. doi:10.1074/jbc.M211609200.
- Brown, A. M. (2004). Brain glycogen re-awakened. *Journal of Neurochemistry* 89, 537–552. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02421.x.
- Buscemi, L., Blochet, C., Price, M., Magistretti, P. J., Lei, H., and Hirt, L. (2020). Extended preclinical investigation of lactate for neuroprotection after ischemic stroke. *Clinical and Translational Neuroscience* 4, 2514183X2090457. doi:10.1177/2514183x20904571.
- Buscemi, L., Blochet, C., Magistretti, P. J., and Hirt, L. (2021). Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1 and Neuroprotection in a Mouse Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion. *Frontiers in Physiology* 12. doi:10.3389/fphys.2021.689239.
- Buxbaum, J., Yan, A., Yeh, K., Lane, C., Nguyen, N., and Laine, L. (2014). Aggressive hydration with lactated ringer's solution reduces pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12. doi:10.1016/j.cgh.2013.07.026.
- Cai, T. Q., Ren, N., Jin, L., Cheng, K., Kash, S., Chen, R., et al. (2008). Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377, 987–991. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.088.
- Calebiro, D., and Koszegi, Z. (2019). The subcellular dynamics of GPCR signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 483, 24–30. doi:10.1016/j.mce.2018.12.020.
- Carteron, L., Solari, D., Patet, C., Quintard, H., Miroz, J. P., Bloch, J., et al. (2018). Hypertonic lactate to improve cerebral perfusion and glucose availability after acute brain injury. *Critical Care Medicine* 46, 1649–1655. doi:10.1097/CCM.0000000000003274.
- Castillo, X., Rosafio, K., Wyss, M. T., Drandarov, K., Buck, A., Pellerin, L., et al. (2015). A probable dual mode of action for both L- and D-lactate neuroprotection in cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35, 1561–1569. doi:10.1038/jcbfm.2015.115.
- Cohen, R. D., and Simpson, R. (1975). Lactate Metabolism. *Anesthesiology* 43, 661–673. doi:10.1097/00000542-197512000-00013
- Cureton, E. L., Kwan, R. O., Dozier, K. C., Sadjadi, J., Pal, J. D., and Victorino, G. P. (2010). A Different View of Lactate in Trauma Patients: Protecting the Injured Brain. *Journal of Surgical Research* 159, 468–473. doi:10.1016/j.jss.2009.04.020.
- Cvacek, V., Goddard, W. A., and Abrol, R. (2016). Structure-Based Sequence Alignment of the Transmembrane Domains of All Human GPCRs: Phylogenetic, Structural and Functional Implications. *PLoS Computational Biology* 12. doi:10.1371/journal.pcbi.1004805.
- Dalsgaard, M. K., Quistorff, B., Danielsen, E. R., Selmer, C., Vogelsang, T., and Secher, N. H. (2004). A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not

- accumulation of lactate within the human brain. *Journal of Physiology* 554, 571–578. doi:10.1113/jphysiol.2003.055053.
- de Rossi, P., Harde, E., Dupuis, J. P., Martin, L., Chounlamountri, N., Bardin, M., et al. (2016). A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Molecular Psychiatry* 21, 1768–1780. doi:10.1038/mp.2015.195.
- de Vries, L., Fischer, T., Lè Ne Tronchè Re, H., Brothers, G. M., Strockbine, B., Siderovski, D. P., et al. (2000). Activator of G protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for G i subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14364–14369. doi: 10.1073/pnas.97.26.14364
- de Zoete, M. R., Palm, N. W., Zhu, S., and Flave, R. A. (2014). Inflammasomes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6. doi:10.1101/cshperspect.a016287.
- DeFea, K. A. (2008). Beta-arrestin multimers: does a crowd help or hinder function? *The Biochemical journal* 413. doi:10.1042/BJ20081009.
- de-Madaria, E., Herrera-Marante, I., González-Camacho, V., Bonjoch, L., Quesada-Vázquez, N., Almenta-Saavedra, I., et al. (2018). Fluid resuscitation with lactated Ringer's solution vs normal saline in acute pancreatitis: A triple-blind, randomized, controlled trial. *United European Gastroenterology Journal* 6, 63–72. doi:10.1177/2050640617707864.
- Dienel, G. A., and Cruz, N. F. (2004). Nutrition during brain activation: Does cell-to-cell lactate shuttling contribute significantly to sweet and sour food for thought? *Neurochemistry International* 45, 321–351. doi:10.1016/j.neuint.2003.10.011.
- Dienel, G. A. (2012). Brain lactate metabolism: The discoveries and the controversies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 1107–1138. doi:10.1038/jcbfm.2011.175.
- Dinuzzo, M., Mangia, S., Maraviglia, B., and Giove, F. (2010). Glycogenolysis in astrocytes supports blood-borne glucose channeling not glycogen-derived lactate shuttling to neurons: Evidence from mathematical modeling. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 1895–1904. doi:10.1038/jcbfm.2010.151.
- Duhaut, D. E., Heurteaux, C., Gandin, C., Ichai, C., and Quintard, H. (2021). The Antiedematous Effect of Exogenous Lactate Therapy in Traumatic Brain Injury: A Physiological and Mechanistic Approach. *Neurocritical Care*. doi:10.1007/s12028-021-01219-y.
- Dvorak, C. A., Liu, C., Shelton, J., Kuei, C., Sutton, S. W., Lovenberg, T. W., and Carruthers, N. I. (2012). Identification of hydroxybenzoic acids as selective lactate receptor (GPR81) agonists with antilipolytic effects. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 3, 637–639. doi: 10.1021/ml3000676
- Eichenbaum, H., and Robitsek, R. J. (2009). Olfactory memory: A bridge between humans and animals in models of cognitive aging. in *Annals of the New York Academy of Sciences* (Blackwell Publishing Inc.), 658–663. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04012.x.
- Feingold, K. R., Moser, A., Shigenaga, J. K., and Grunfeld, C. (2011). Inflammation inhibits GPR81 expression in adipose tissue. *Inflammation Research* 60, 991–995. doi:10.1007/s00011-011-0361-2.
- Ferguson, B. S., Rogatzki, M. J., Goodwin, M. L., Kane D. A., Rightmire, Z., and Gladden, L. B. (2018). Lactate Metabolism: Historical Context, Prior Misinterpretations, And Current

- Understanding. *European Journal of Applied Physiology*, 118, 691-728. doi: 10.1007/s00421-017-3795-6
- Fernández-Moncada, I., Ruminot, I., Robles-Maldonado, D., Alegría, K., Deitmer, J. W., and Barros, L. F. (2018). Neuronal control of astrocytic respiration through a variant of the Crabtree effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 1623–1628. doi:10.1073/pnas.1716469115.
- Ferrara, N. (2000). VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 617-624. doi: 10.1016/s0958-1669(00)00153-1
- Ferriero, D. M. (2001). Oxidant Mechanisms in Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Developmental Neuroscience* 23, 198-202. doi: 10.1159/000046143
- Flick, M. J., and Konieczny, S. F. (2002). Identification of putative mammalian D-lactate dehydrogenase enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295, 910–916 doi: 10.1016/s0006-291x(02)00768-4
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Zhang, W. B., and Agnati, L. F. (2013). Volume transmission and its different forms in the central nervous system. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 19, 323–329. doi:10.1007/s11655-013-1455-1.
- Gallagher, C. N., Carpenter, K. L. H., Grice, P., Howe, D. J., Mason, A., Timofeev, I., et al. (2009). The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: A <sup>13</sup>C-labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study. *Brain* 132, 2839–2849. doi:10.1093/brain/awp202.
- Gandhi, G. K., Cruz, N. F., Ball, K. K., and Dienel, G. A. (2009). Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons. *Journal of Neurochemistry* 111, 522–536. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06333.x.
- Ge, H., Weiszmann, J., Reagan, J. D., Gupte, J., Baribault, H., Gyuris, T., et al. (2008). Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *Journal of Lipid Research* 49, 797–803. doi:10.1194/jlr.M700513-JLR200.
- Gibbs, M. E., Hutchinson, D., and Hertz, L. (2008). Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32, 927–944. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.02.001.
- Gilbert, E., Tang, J. M., Ludvig, N., and Bergold, P. J. (2006). Elevated lactate suppresses neuronal firing in vivo and inhibits glucose metabolism in hippocampal slice cultures. *Brain Research* 1117, 213–223. doi:10.1016/j.brainres.2006.07.107.
- Gilman, A. G. (1987). G Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual Reviews Of Biochemistry* 56, 615-649. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.003151
- Ginsberg, M. D. (1997). The New Language of Cerebral Ischemia. *American Journal of Neuroradiology* 18, 1435-1445. PMID: 9296184
- Gold, M., Miller, H. I., Spitzer, J. J., and Spitzer, J. J. E. (1963). Effect of exercise and lactic acid infusion on individual free fatty acids of plasma. *American Journal Of Physiology* 205, 902-904. doi: 10.1152/ajplegacy.1963.205.5.902

- Gordon, G. R. J., Choi, H. B., Rungta, R. L., Ellis-Davies, G. C. R., and MacVicar, B. A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745–750. doi:10.1038/nature07525.
- Groblewski, T., Maigret, B., Languier, R., Lombard, C., Bonnafous, J. C., and Marie, J. (1997). Mutation of Asn111 in the third transmembrane domain of the AT(1A) angiotensin II receptor induces its constitutive activation. *Journal of Biological Chemistry* 272, 1822–1826. doi:10.1074/jbc.272.3.1822.
- Hadzic, A., Nguyen, T. D., Hosoyamada, M., Tomioka, N. H., Bergersen, L. H., Storm-Mathisen, J., et al. (2020). The lactate receptor HCA1 is present in the choroid plexus, the tela choroidea, and the neuroepithelial lining of the dorsal part of the third ventricle. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1–14. doi:10.3390/ijms21186457.
- Hagberg, H., Wilson, M. A., Matsushita, H., Zhu, C., Lange, M., Gustavsson, M., et al. (2004). PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. *Journal of Neurochemistry* 90, 1068–1075. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02547.x.
- Hall, C. N., Klein-Flügge, M. C., Howarth, C., and Attwell, D. (2012). Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *Journal of Neuroscience* 32, 8940–8951. doi:10.1523/JNEUROSCI.0026-12.2012.
- Harada, M., Okuda, C., Sawa, T., and Murakami, T. (1992). Cerebral extracellular glucose and lactate concentrations during and after moderate hypoxia in glucose- and saline-infused rats. *Anesthesiology* 77, 728–734. doi: 10.1097/00000542-199210000-00017
- Hasegawa, H., Fukushima, T., Lee, J. A., Tsukamoto, K., Moriya, K., Ono, Y., et al. (2003). Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377, 886–891. doi:10.1007/s00216-003-2108-6.
- Herrera-López, G., and Galván, E. J. (2018). Modulation of hippocampal excitability via the hydroxycarboxylic acid receptor 1. *Hippocampus* 28, 557–567. doi:10.1002/hipo.22958.
- Holloway, R., Zhou, Z., Harvey, H. B., Levasseur, J. E., Rice, A. C., Sun, D., et al. (2007). Effect of lactate therapy upon cognitive deficits after traumatic brain injury in the rat. *Acta Neurochirurgica* 149, 919–927. doi:10.1007/s00701-007-1241-y.
- Hoque, R., Farooq, A., Ghani, A., Gorelick, F., and Mehal, W. Z. (2014). Lactate reduces liver and pancreatic injury in toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via gpr81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology* 146, 1763–1774. doi:10.1053/j.gastro.2014.03.014.
- Horn, T., and Klein, J. (2013). Neuroprotective effects of lactate in brain ischemia: Dependence on anesthetic drugs. *Neurochemistry International* 62, 251–257. doi:10.1016/j.neuint.2012.12.017.
- Hu, J., Cai, M., Liu, Y., Liu, B., Xue, X., Ji, R., et al. (2020). The roles of GRP81 as a metabolic sensor and inflammatory mediator. *Journal of Cellular Physiology* 235, 8938–8950. doi:10.1002/jcp.29739.

- Hyacinthe, J. N., Buscemi, L., Lê, T. P., Lepore, M., Hirt, L., and Mishkovsky, M. (2020). Evaluating the potential of hyperpolarised [1-13C] L-lactate as a neuroprotectant metabolic biosensor for stroke. *Scientific Reports* 10. doi:10.1038/s41598-020-62319-x.
- Ichai, C., Armando, G., Orban, J. C., Berthier, F., Rami, L., Samat-Long, C., et al. (2009). Sodium lactate versus mannitol in the treatment of intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain-injured patients. *Intensive Care Medicine* 35, 471–479. doi:10.1007/s00134-008-1283-5.
- Ichai, C., Payen, J. F., Orban, J. C., Quintard, H., Roth, H., Legrand, R., et al. (2013). Half-molar sodium lactate infusion to prevent intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain injured patients: A randomized controlled trial. *Intensive Care Medicine* 39, 1413–1422. doi:10.1007/s00134-013-2978-9.
- Jeninga, E. H., Bugge, A., Nielsen, R., Kersten, S., Hamers, N., Dani, C., et al. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  regulates expression of the anti-lipolytic G-protein-coupled receptor 81 (GPR81/Gpr81). *Journal of Biological Chemistry* 284, 26385–26393. doi:10.1074/jbc.M109.040741.
- Jin Lee, Y., Jin Shin, K., Park, S.-A., Su Park, K., Park, S., Heo, K., et al. (2016). G-protein-coupled receptor 81 promotes a malignant phenotype in breast cancer through angiogenic factor secretion. *Oncotarget* 7, 70898-70911. doi: 0.18632/oncotarget.12286
- Johnston, M. (2001). Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 7, 229-234. doi: 10.1002/mrdd.1032.
- Jourdain, P., Allaman, I., Rothenfusser, K., Fiumelli, H., Marquet, P., and Magistretti, P. J. (2016). L-Lactate protects neurons against excitotoxicity: Implication of an ATP-mediated signaling cascade. *Scientific Reports* 6. doi:10.1038/srep21250.
- Jourdain, P., Rothenfusser, K., Ben-Adiba, C., Allaman, I., Marquet, P., and Magistretti, P. J. (2018). Dual action of L-Lactate on the activity of NR2B-containing NMDA receptors: from potentiation to neuroprotection. *Scientific Reports* 8. doi:10.1038/s41598-018-31534-y.
- Jukkola, P., and Gu, C. (2015). Regulation of neurovascular coupling in autoimmunity to water and ion channels. *Autoimmunity Reviews* 14, 258–267. doi: 10.1016/j.autrev.2014.11.010.
- Kaku, D. A., Giffard, R. G., and Choi, D. W. (1993). Neuroprotective Effects of Glutamate Antagonists and Extracellular Acidity. *Science* 260, 1516-1518. <http://www.jstor.org/stable/2881526>
- Katsura, K., Kristian, T., and Siesjo, B. K. (1994). Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochemical Society transactions* 22, 991-996. doi: 10.1042/bst0220991
- Kennedy, L. H., Glesaaen, E. R., Palibrk, V., Pannone, M., Wang, W., Al-Jabri, A. H. J., Suganthan, R., Meyer, N., Lin X., Bergersen, L. H., Bjørås, M., Rinholm, J. Lactate receptor HCAR1 regulates neurogenesis and microglia activation after neonatal hypoxia-ischemia. **Preprint. Disponible en:** <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.02.408070v1>
- Khilazheva, E. D., Pisareva, N. V., Morgun, A. V., Boitsova, E. B., Taranushenko, T. E., Frolova, O. V., et al. (2017). Activation of GPR81 lactate receptors stimulates mitochondrial biogenesis in cerebral microvessel endothelial cells. *Annals of Clinical and Experimental Neurology* 1, 34–39. doi: 10.18454/ACEN.2017.1.6155



- Kong, L., Wang, Z., Liang, X., Wang, Y., Gao, L., and Ma, C. (2019). Monocarboxylate transporter 1 promotes classical microglial activation and pro-inflammatory effect via 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3. *Journal of Neuroinflammation* 16. doi:10.1186/s12974-019-1648-4.
- Kuei, C., Yu, J., Zhu, J., Wu, J., Zhang, L., Shih, A., et al. (2011). Study of GPR81, the lactate receptor, from distant species identifies residues and motifs critical for GPR81 functions. *Molecular Pharmacology* 80, 848–858. doi:10.1124/mol.111.074500.
- Lambertus, M., Øverberg, L. T., Andersson, K. A., Hjelden, M. S., Hadzic, A., Haugen, Ø. P., et al. (2021). L-lactate induces neurogenesis in the mouse ventricular-subventricular zone via the lactate receptor HCA1. *Acta Physiologica* 231. doi:10.1111/apha.13587.
- Lander, S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome - International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature* 409, 860-921. doi: 10.1038/35057062
- Langemann, H., Alessandri, B., Mendelowitsch, A., Feuerstein, T., Landolt, H., and Gratzl, O. (2001). Extracellular levels of glucose and lactate measured by quantitative microdialysis in the human brain. *Neurological Research*. 5, 531-536. doi: 10.1179/016164101101198785
- Larsen, T. (2017). Fluorometric determination of D-lactate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 539, 152–157. doi:10.1016/j.ab.2017.10.026.
- Lauritzen, K. H., Morland, C., Puchades, M., Holm-Hansen, S., Hagelin, E. M., Lauritzen, F., et al. (2014). Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cerebral Cortex* 24, 2784–2795. doi:10.1093/cercor/bht136.
- Lee, D. K., Nguyen, T., Lynch, K. R., Cheng, R., Vanti, W. B., Arkhitko, O., et al. (2001). Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene* 275, 83-91. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00651-5
- Lefkowitz, R. J. (1994). Rodbell and Gilman win 1994 Nobel Prize for Physiology and Medicine. *Trends in Pharmacological Sciences* 15, 442–444. doi:10.1016/0165-6147(94)90053-1.
- Lefkowitz, R. J., and Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by  $\beta$ -arrestins. *Science* 308, 512–517. doi:10.1126/science.1109237.
- Li, G., Wang, H. Q., Wang, L. H., Chen, R. P., and Liu, J. P. (2014). Distinct pathways of ERK1/2 activation by hydroxy-carboxylic acid receptor-1. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0093041.
- Ling, B., Peng, F., Alcorn, J., Lohmann, K., Bandy, B., and Zello, G. A. (2012). D-Lactate altered mitochondrial energy production in rat brain and heart but not liver. *Nutrition and Metabolism*. 9, 2-9. doi: 10.1186/1743-7075-9-6
- Liu, C., Wu, J., Zhu, J., Kuei, C., Yu, J., Shelton, J., et al. (2009). Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *Journal of Biological Chemistry* 284, 2811–2822. doi:10.1074/jbc.M806409200.
- Lorenz, K., Schmitt, J. P., Schmitteckert, E. M., and Lohse, M. J. (2009). A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature Medicine* 15, 75–83. doi:10.1038/nm.1893.

- Ma, K., Ding, X., Song, Q., Han, Z., Yao, H., Ding, J., et al. (2020). Lactate enhances Arc/arg3.1 expression through hydroxycarboxylic acid receptor 1- $\beta$ -arrestin2 pathway in astrocytes. *Neuropharmacology* 171. doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108084.
- Magistretti, P. J., and Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience* 19, 235–249. doi:10.1038/nrn.2018.19.
- Mariga, S. T., Kolko, M., Gjedde, A., and Bergersen, L. H. (2014). Lactate transport and receptor actions in cerebral malaria. *Frontiers in Neuroenergetics* 6. doi:10.3389/fnins.2014.00125.
- Mayor, D., and Tymianski, M. (2018). Neurotransmitters in the mediation of cerebral ischemic injury. *Neuropharmacology* 134, 178–188. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.11.050.
- McLennan, H. (1976). The autoradiographic localization of L-[3H]glutamate in rat brain tissue. *Brain Research* 115, 139-144. doi: 10.1016/0006-8993(76)90828-3
- Moreira, T. J. T. P., Pierre, K., Maekawa, F., Repond, C., Cebere, A., Liljequist, S., et al. (2009). Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 1273–1283. doi:10.1038/jcbfm.2009.50.
- Morland, C., Andersson, K. A., Haugen, Ø. P., Hadzic, A., Kleppa, L., Gille, A., et al. (2017). Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nature Communications* 8. doi:10.1038/ncomms15557.
- Mosienko, V., Teschemacher, A. G., and Kasparov, S. (2015). Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35, 1069–1075. doi:10.1038/jcbfm.2015.77.
- Mosienko V., Rasooli-Nejad S., Kishi K., De Both, M., Jane D., Huentelman, M. J., Kasparov, S., and Teschemacher, A. G. (2018) Putative Receptors Underpinning L-Lactate Signalling in Locus Coeruleus. *Neuroglia* 1, 365-380. doi: 10.3390/neuroglia1020025
- Nedergaard, M., and Goldman, S. A. (1993). Carrier-mediated transport of lactic acid in cultured neurons and astrocytes. *The American Journal Of Physiology* 265, 282-289. doi: 10.1152/ajpregu.1993.265.2.R282
- Offermanns, S., Colletti, S. L., Lovenberg, T. W., Semple, G., Wise, A., and Ijzerman, A. P. (2011). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXII: Nomenclature and classification of hydroxy-carboxylic acid receptors (GPR81, GPR109A, and GPR109B). *Pharmacological Reviews* 63, 269–290. doi:10.1124/pr.110.003301.
- Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10625-10629 doi: 10.1073/pnas.91.22.10625
- Pellerin, L., Pellegrini, Martin, J.-L., Magistretti, P. (1998). Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: Support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 3990-3995. doi: doi.org/10.1073/pnas.95.7.3990

- Peters, A., and Feldman, M. L. (1976). The projection of the lateral geniculate nucleus to area I7 of the rat cerebral cortex. I. General description. *Journal of Neurocytology* 5, 63-84. doi: 10.1007/BF01176183
- Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: Distribution, regulation and function. *Journal of Neurochemistry* 94, 1–14. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x.
- Pohanka, M. (2020). D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection. *BioMed Research International* 2020. doi:10.1155/2020/3419034.
- Qiu, J., Wang, M., Zhang, J., Cai, Q., Lu, D., Li, Y., et al. (2016). The neuroprotection of Sinomenine against ischemic stroke in mice by suppressing NLRP3 inflammasome via AMPK signaling. *International Immunopharmacology* 40, 492–500. doi:10.1016/j.intimp.2016.09.024.
- Ranganathan, P., Shanmugam, A., Swafford, D., Suryawanshi, A., Bhattacharjee, P., Hussein, M. S., et al. (2018). GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *The Journal of Immunology*, j11700604. doi:10.4049/jimmunol.1700604.
- Rice, A. C., Zsoldos, R., Chen, T., Wilson, M. S., Alessandri, B., Hamm, R. J., et al. (2002). Lactate administration attenuates cognitive deficits following traumatic brain injury. *Brain Research* 928, 156-159. doi: 10.1016/s0006-8993(01)03299-1
- Rinholm, J. E., Hamilton, N. B., Kessaris, N., Richardson, W. D., Bergersen, L. H., and Attwell, D. (2011). Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. *Journal of Neuroscience* 31, 538–548. doi:10.1523/JNEUROSCI.3516-10.2011.
- Rooney, K., and Trayhurn, P. (2011). Lactate and the GPR81 receptor in metabolic regulation: Implications for adipose tissue function and fatty acid utilisation by muscle during exercise. *British Journal of Nutrition* 106, 1310–1316. doi:10.1017/S0007114511004673.
- Ros, J., Pecinska, N., Alessandri, B., Landolt, H., and Fillenz, M. (2001). Lactate reduces glutamate-induced neurotoxicity in rat cortex. in *Journal of Neuroscience Research*, 790–794. doi:10.1002/jnr.10043.
- Ross, E. M., and Wilkie, T. M. (2000). GTPASE-ACTIVATING PROTEINS FOR HETEROTRIMERIC G PROTEINS: Regulators of G Protein Signaling (RGS) and RGS-Like Proteins. *Annual Reviews Of Biochemistry* 69, 795-827. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.795
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., et al. (2021). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 41, 342–358. doi:10.1177/0271678X20908355.
- Sakurai, T., Davenport, R., Stafford, S., Grosse, J., Ogawa, K., Cameron, J., et al., (2014). Identification of a novel GPR81-selective agonist that suppresses lipolysis in mice without cutaneous flushing. *European Journal of Pharmacology*. 727, 1-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.029
- Scavuzzo, C. J., Rakotovo, I., and Dickson, C. T. (2020). Differential effects of L- and D-lactate on memory encoding and consolidation: Potential role of HCAR1 signaling. *Neurobiology of Learning and Memory* 168. doi:10.1016/j.nlm.2019.107151.

- Schurr, A., Payne, R. S., Miller, J. J., and Rigor, B. M. (1997). Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. *Brain Research* 744, 105-111. doi: 10.1016/s0006-8993(96)01106-7
- Schurr, A., Miller, J. J., Payne, R. S., and Rigor, B. M. (1999). An Increase in Lactate Output by Brain Tissue Serves to Meet the Energy Needs of Glutamate-Activated Neurons. *The Journal Of Neuroscience* 19, 34-39. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-01-00034.1999
- Schwindinger, W. F., and Robishaw, J. D. (2001). Heterotrimeric G-protein bg -dimers in growth and differentiation. *Nature* 20, 1653-1660. doi: 10.1038/sj.onc.1204181
- Serdar, M., Kempe, K., Rizazad, M., Herz, J., Bendix, I., Felderhoff-Müser, U., et al. (2019). Early pro-inflammatory microglia activation after inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13. doi:10.3389/fncel.2019.00237.
- Shalak, L., and Perlman, J. M. (2004). Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Human Development* 80, 125–141. doi:10.1016/j.earlhumdev.2004.06.003.
- Shen, Z., Jiang, L., Yuan, Y., Deng, T., Zheng, Y. R., Zhao, Y. Y., et al. (2015). Inhibition of G Protein-Coupled Receptor 81 (GPR81) Protects Against Ischemic Brain Injury. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 21, 271–279. doi:10.1111/cns.12362.
- Shimizu, H., Watanabe, E., Hiyama, T. Y., Nagakura, A., Fujikawa, A., Okado, H., et al. (2007). Glial Nax Channels Control Lactate Signaling to Neurons for Brain [Na<sup>+</sup>] Sensing. *Neuron* 54, 59–72. doi:10.1016/j.neuron.2007.03.014.
- Siesjö, B. K. (1978). Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *Journal of Neural Transmission. Supplementum* 14, 17-22. PMID: 290738.
- Singhal, G., Jaehne, E. J., Corrigan, F., Toben, C., and Baune, B. T. (2014). Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. *Frontiers in Neuroscience* 8, 1–22. doi:10.3389/fnins.2014.00315.
- Soga, T., Kamohara, M., Takasaki, J., Matsumoto, S. I., Saito, T., Ohishi, T., et al. (2003). Molecular identification of nicotinic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303, 364–369. doi:10.1016/S0006-291X(03)00342-5.
- Song, Z., Levin, B. E., Mcardle, J. J., Bakhos, N., and Routh, V. H. (2001). Convergence of Pre- and Postsynaptic Influences on Glucosensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *Diabetes* 50, 2673-2681. doi: 10.2337/diabetes.50.12.2673
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002).  $\beta$ -arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49212–49219. doi:10.1074/jbc.M207294200.
- Sun, Z., Han, Y., Song, S., Chen, T., Han, Y., and Liu, Y. (2019). Activation of GPR81 by lactate inhibits oscillatory shear stress-induced endothelial inflammation by activating the expression of KLF2. *IUBMB Life* 71, 2010–2019. doi:10.1002/iub.2151.
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., et al. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810–823. doi:10.1016/j.cell.2011.02.018.

- Taggart, A. K. P., Kero, J., Gan, X., Cai, T. Q., Cheng, K., Ippolito, M., et al. (2005). (D)- $\beta$ -hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26649–26652. doi:10.1074/jbc.C500213200.
- Tang, F., Lane, S., Korsak, A., Paton, J. F. R., Gourine, A. v., Kasparov, S., et al. (2014). Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nature Communications* 5. doi:10.1038/ncomms4284.
- Tassinari, I. D. Á., Andrade, M. K. G., da Rosa, L. A., Hoff, M. L. M., Nunes, R. R., Vogt, E. L., et al. (2020). Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia–Ischemia. *Neuroscience* 448, 191–205. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.09.006.
- Tassinari, I., and de Fraga, L. (2022). Potential use of lactate for the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neural Regeneration Research* 17, 788–790. doi:10.4103/1673-5374.322459.
- Tekkök, S. B., Brown, A. M., Westenbroek, R., Pellerin, L., and Ransom, B. R. (2005). Transfer of glycogen-derived lactate from astrocytes to axons via specific monocarboxylate transporters supports mouse optic nerve activity. *Journal of Neuroscience Research* 81, 644–652. doi:10.1002/jnr.20573.
- Tunaru, S., Kero, J., Schaub, A., Wufka, C., Blaukat, A., Pfeffer, K., et al. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nature Medicine* 9, 352–355. doi:10.1038/nm824.
- Tunaru, S., Lättig, J., Kero, J., Krause, G., and Offermanns, S. (2005). Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Molecular Pharmacology* 68, 1271–1280. doi:10.1124/mol.105.015750.
- Tuteja, N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signaling & Behavior* 4, 942–947. doi: 10.4161/psb.4.10.9530
- van Hall, G. (2009). Lactate kinetics in human tissues at rest and during exercise. *Acta Physiologica* 199, 499–508. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02122.x.
- Vannucci, S. J., and Hagberg, H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *Journal of Experimental Biology* 207, 3149–3154. doi:10.1242/jeb.01064.
- Wanders, D., Graff, E. C., and Judd, R. L. (2012). Effects of high fat diet on GPR109A and GPR81 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425, 278–283. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.082.
- Wang, Y., Guo, S. Z., Bonen, A., Li, R. C., Kheirandish-Gozal, L., Zhang, S. X. L., et al. (2011). Monocarboxylate transporter 2 and stroke severity in a rodent model of sleep apnea. *Journal of Neuroscience* 31, 10241–10248. doi:10.1523/JNEUROSCI.1462-11.2011.
- Werry, T. D., Wilkinson, G. F., and Willars, G. B. (2003). Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *The Biochemical Journal* 374, 281–296. doi: 10.1042/BJ20030312.
- White, B. C., Sullivan, J. M., Degracia, D. J., O’neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., et al. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences* 179, 1–33. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00386-5

- Wise, A., Jupe, S. C., and Rees, S. (2004). The Identification of Ligands at Orphan G-Protein Coupled Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44, 43–66. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121419.
- Withers, R. T., Sherman, W. M., Clark, D. G., Esselbach, P. C., Nolan, S. R., Mackay, M. H., et al. (1991). Muscle metabolism during 30, 60 and 90 s of maximal cycling on an air-braked ergometer. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 63, 354–362. doi: 10.1007/BF00364462
- Wu, B. U., Hwang, J. Q., Gardner, T. H., Repas, K., Delee, R., Yu, S., et al. (2011). Lactated Ringer's Solution Reduces Systemic Inflammation Compared With Saline in Patients With Acute Pancreatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 9. doi:10.1016/j.cgh.2011.04.026.
- Wu, Y., Wang, M., Zhang, K., Li, Y., Xu, M., Tang, S., et al. (2018). Lactate enhanced the effect of parathyroid hormone on osteoblast differentiation via GPR81-PKC-Akt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503, 737–743. doi:10.1016/j.bbrc.2018.06.069.
- Yang, J., Ruchti, E., Petit, J. M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I., et al. (2014). Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 12228–12233. doi:10.1073/pnas.1322912111.
- Yao, Z., Yan, Y., Zheng, X., Wang, M., Zhang, H., Li, H., et al. (2020). Dietary Lactate Supplementation Protects against Obesity by Promoting Adipose Browning in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 14841–14849. doi:10.1021/acs.jafc.0c05899.
- Ystgaard, M. B., Sejersted, Y., Løberg, E. M., Lien, E., Yndestad, A., and Saugstad, O. D. (2015). Early upregulation of NLRP3 in the brain of neonatal mice exposed to hypoxia-ischemia: No early neuroprotective effects of NLRP3 deficiency. *Neonatology* 108, 211–219. doi:10.1159/000437247.
- Zhang, M., Wang, Y., Chen, X., Dai, L., Bai, Y., Yao, Z., et al. (2021). Inhibition of Lactate-GPR81-PI3K/Akt Pathway May Exacerbate A $\beta$  Aggregation in 3-Month-Old APP/PS1 Mice. **Preprint. Disponível em:** <https://www.researchsquare.com/article/rs-651317/v1>
- Zhou, J., Liu, T., Guo, H., Cui, H., Li, P., Feng, D., et al. (2018). Lactate potentiates angiogenesis and neurogenesis in experimental intracerebral hemorrhage. *Experimental and Molecular Medicine* 50. doi:10.1038/s12276-018-0113-2.

## Legendas das Figuras

**Figura 1:** Eventos envolvidos na fisiopatologia da isquemia e reperfusão no sistema nervoso central. Durante a isquemia, há menor chegada de sangue ao encéfalo, reduzindo o aporte de glicose e oxigênio, o que compromete a produção de ATP e a manutenção do gradiente eletroquímico das células do SNC. Na reperfusão, ocorre a retomada da chegada de sangue, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Concomitantemente, esses dois processos (isquemia seguida de reperfusão) promovem uma condição inflamatória, capaz de estender a morte celular e promover a progressão da lesão encefálica.

ATP: adenosina trifosfato;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase: bomba de sódio e potássio;  $\text{Ca}^{++}$ : íon cálcio; SNC: sistema nervoso central. Autoria própria, baseado em White *et al*, 2000.

**Figura 2:** Mecanismo de cooperação no transporte de lactato entre astrócitos, com maior capacidade redutora e presença da enzima LDH5, e neurônios, células oxidativas com a LDH1. Os astrócitos captam a glicose da corrente sanguínea através dos transportadores GLUT1, uma vez que circundam os vasos do parênquima cerebral. A glicose captada entra na via glicolítica, na qual é oxidada a piruvato, que é convertido a lactato pela LDH5 com a oxidação de um NADH em  $\text{NAD}^+$ . O lactato, então, sai da célula pelos transportadores MCT4, sendo captado pelos neurônios através do MCT2, de alta afinidade. A isoforma LDH1, presente nos neurônios, utiliza da redução de um NADH para reoxidar o lactato em piruvato, o qual pode ser utilizado no TCA para a produção de ATP mitocondrial. Assim, os astrócitos garantem o fornecimento de substrato energético aos neurônios.

GLUT1: proteína transportadora de glicose 1; LDH: enzima lactato desidrogenase; MCT: transportador de monocarboxilatos; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida;  $\text{NAD}^+$ : nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada; ATP: trifosfato de adenosina; TCA: ciclo do ácido tricarboxílico. Autoria própria, baseado em Magistretti & Allaman, 2018.

**Figura 3:** Representação do desvio lactato-glicose ou lançadeira de lactato entre astrócitos e neurônios (ANLS, do inglês *astrocyte-neuron lactate shuttle*). São mostrados os sítios de produção e liberação de lactato no meio extracelular. Esse lactato extracelular pode ativar o receptor GPR81 no SNC. O glutamato liberado pelos neurônios na fenda sináptica é captado pelos astrócitos através dos transportadores EAAT. O astrócito converte o glutamato em glutamina, evitando a excitotoxicidade do meio extracelular. Esse glutamato induz um metabolismo preferencialmente glicolítico nos astrócitos. A glicose captada da circulação pelo astrócito é, então, convertida a lactato pela LDH5 e exportada ao meio extracelular pelo MCT4. O lactato, uma vez fora da célula, pode ser captado pelo neurônio para ser convertido novamente a piruvato e utilizado no TCA para a geração de ATP, ou ativar os receptores GPR81 presentes nas

membranas dos neurônios (e, em menor quantidade, dos astrócitos), especialmente na membrana pós-sináptica, ativando vias de sinalização celular.

GLUT1: proteína transportadora de glicose 1; EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios; MCT: transportador de monocarboxilato; LDH: enzima lactato desidrogenase; GluR: receptor de glutamato; GPR81: receptor acoplado à proteína G81; SNC: sistema nervoso central; ATP: trifosfato de adenosina; TCA: ciclo do ácido tricarboxílico. Autoria própria, baseado em Pellerin & Magistretti, 1994.

**Figura 4:** Ativação do receptor GPR81 e participação da proteína  $G_{i\alpha}$  inibindo a atividade da enzima AC. A estimulação do receptor por seu ligante causa uma mudança conformacional no receptor. Isso, por sua vez, ativa a proteína G associada, causando o desacoplamento da subunidade G alfa ( $G_{\alpha}$ ) do dímero beta-gama ( $G_{\beta\gamma}$ ). Na subunidade  $G_{\alpha}$  há um sítio ligante de nucleotídeo que, na forma inativada, está ligado a uma molécula de GDP. Após a ativação, uma molécula de GTP, bastante concentrada no citoplasma, ocupa o sítio e a subunidade  $G_{\alpha}$  atua sobre efetores - nesse caso, a subunidade é inibitória ( $G_{i\alpha}$ ) e atua reduzindo a atividade da AC, culminando na redução da concentração de AMPc intracelular.

GPR81: receptor acoplado à proteína G 81; AC: adenilato ciclase; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato;  $G_{\alpha}$ : subunidade  $\alpha$  da proteína G;  $G_{\beta\gamma}$ : dímero  $\beta\gamma$  da proteína G; SNC: sistema nervoso central. Autoria própria, baseado em Ahmed *et al*, 2011.

**Figura 5:** Resumo das vias de sinalização nas quais a modulação pelo GPR81 já foi demonstrada no sistema nervoso central (SNC) ou na periferia. Vias ainda não estudadas no SNC estão marcadas com “?”. Essas vias poderiam estar associadas a mecanismos de neuroproteção.

GPR81: receptor acoplado à proteína G 81; AC: adenilato ciclase; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; GTP: guanosina trifosfato;  $G_{\alpha}$ : subunidade  $\alpha$  da proteína G;  $G_{\beta\gamma}$ : dímero  $\beta\gamma$  da proteína G; PKC: proteína cinase C; PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase; NLRP3: proteína que contém domínio NOD- like; ERK1/2: cinase regulada por sinal extracelular 1/2; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; A $\beta$ : beta amiloide; SNC: sistema nervoso central.

Autoria própria, baseado em Hu *et al.*, 2020.

**Figura 6:** Linha do tempo resumando as descobertas mais relevantes relativas ao receptor GPR81, desde a sua descoberta até a descrição das cascatas de sinalização ativadas e de seu papel (a) na periferia e (b) no SNC.

SNC: sistema nervoso central. Autoria própria.



Figura 1

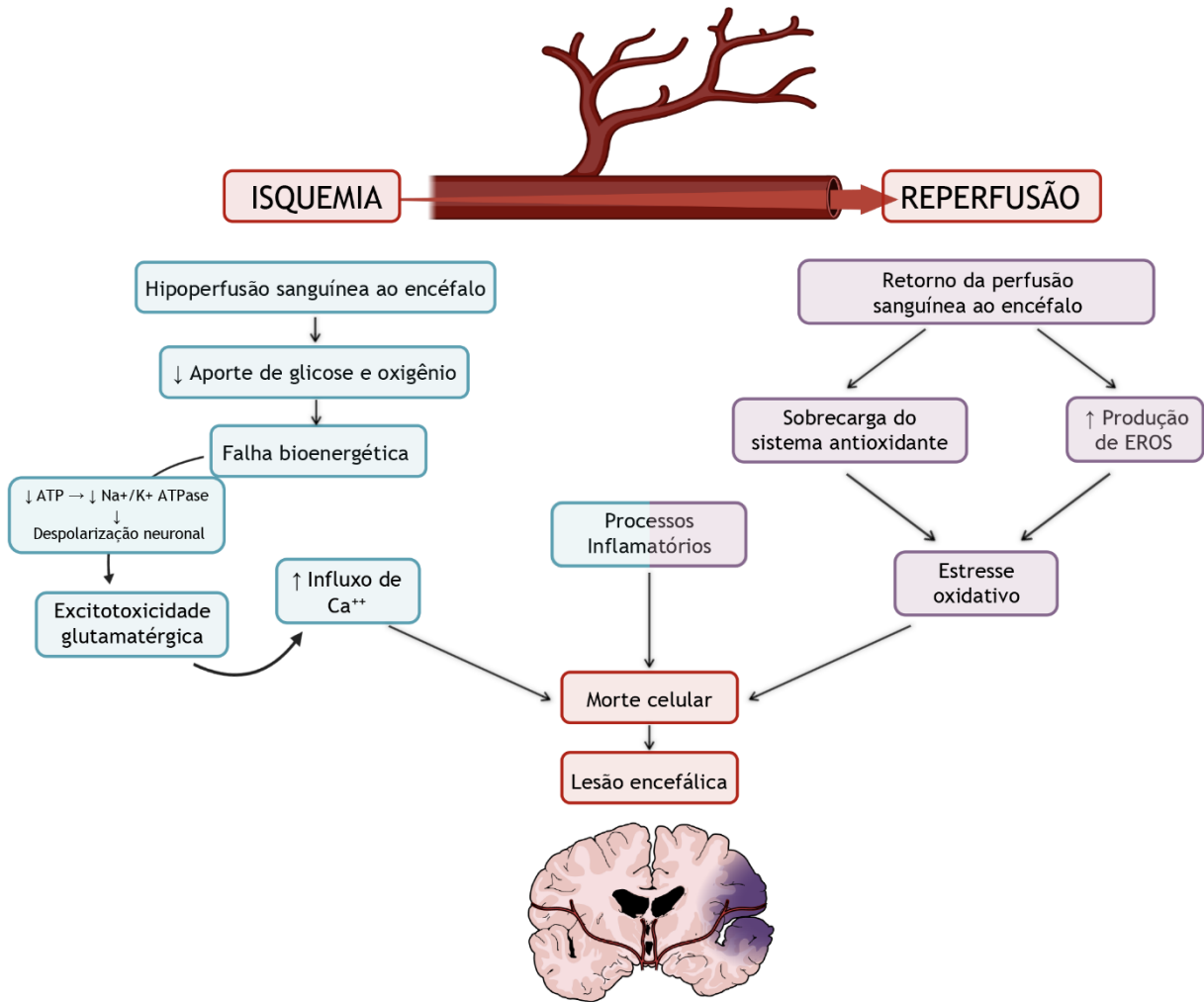


Figura 2

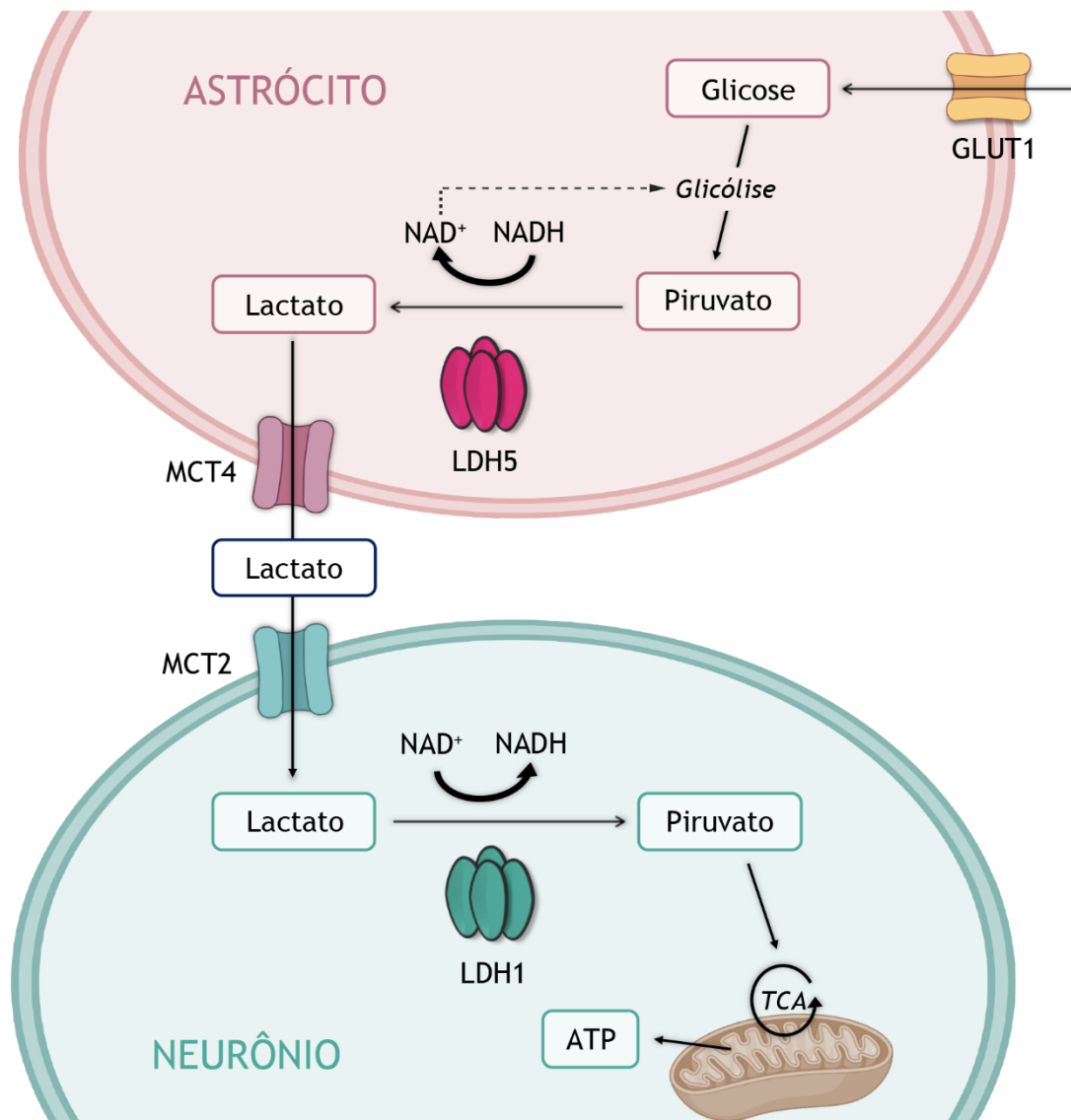


Figura 3

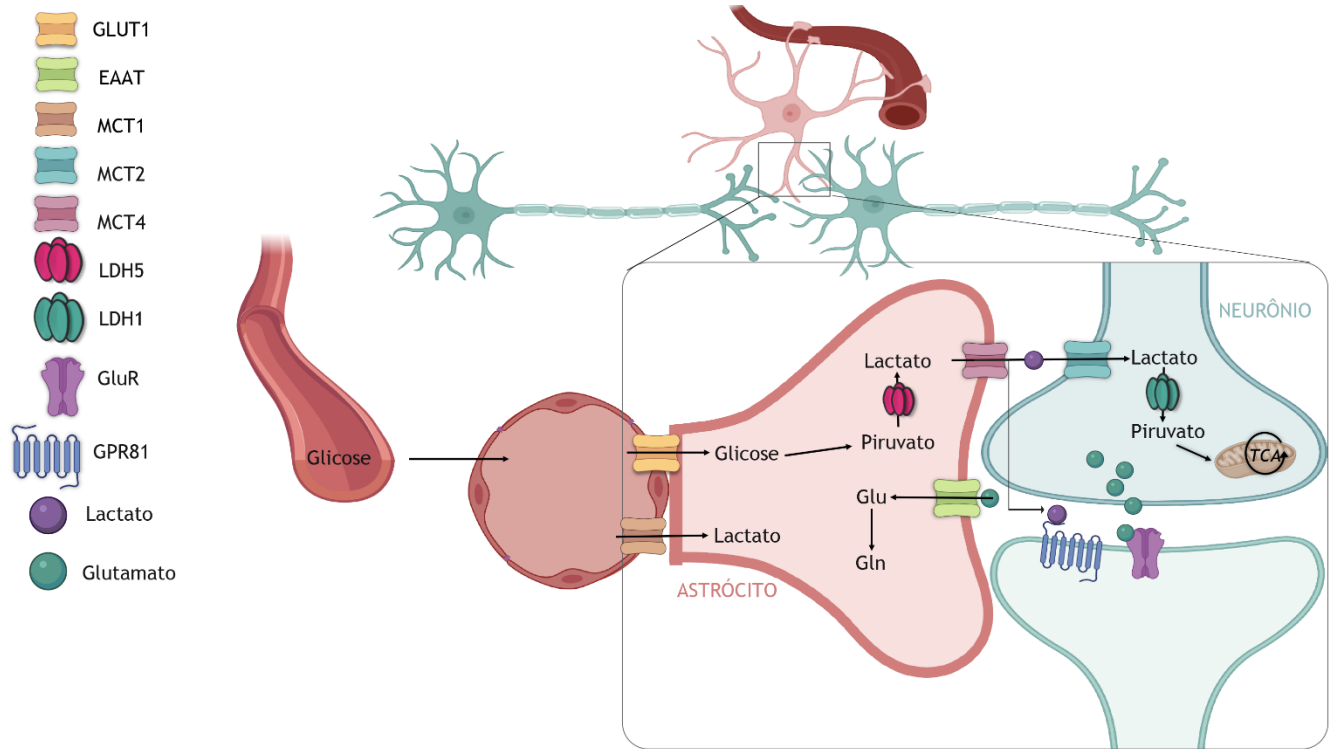


Figura 4

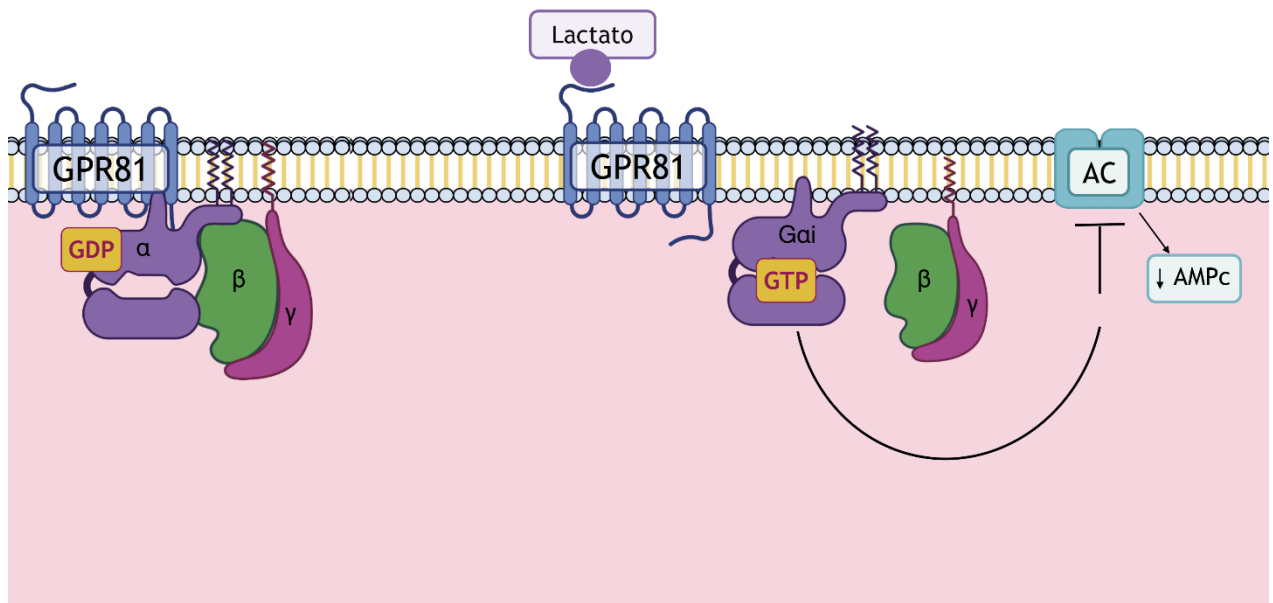


Figura 5

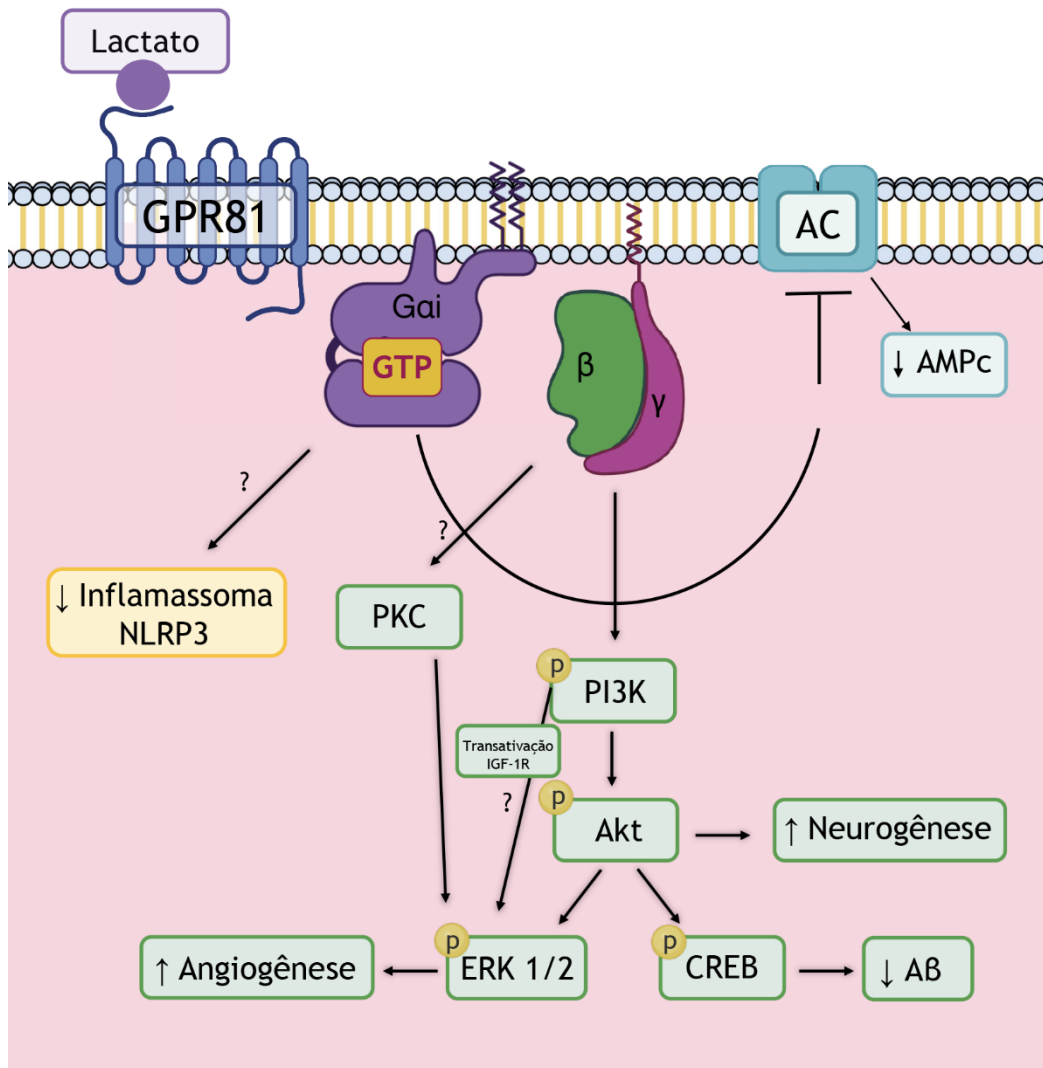


Figura 6

## PERSPECTIVA HISTÓRICA DO GPR81

