

# Avaliação de parâmetros glutamatérgicos de culturas da linhagem C6 de baixa e alta passagens

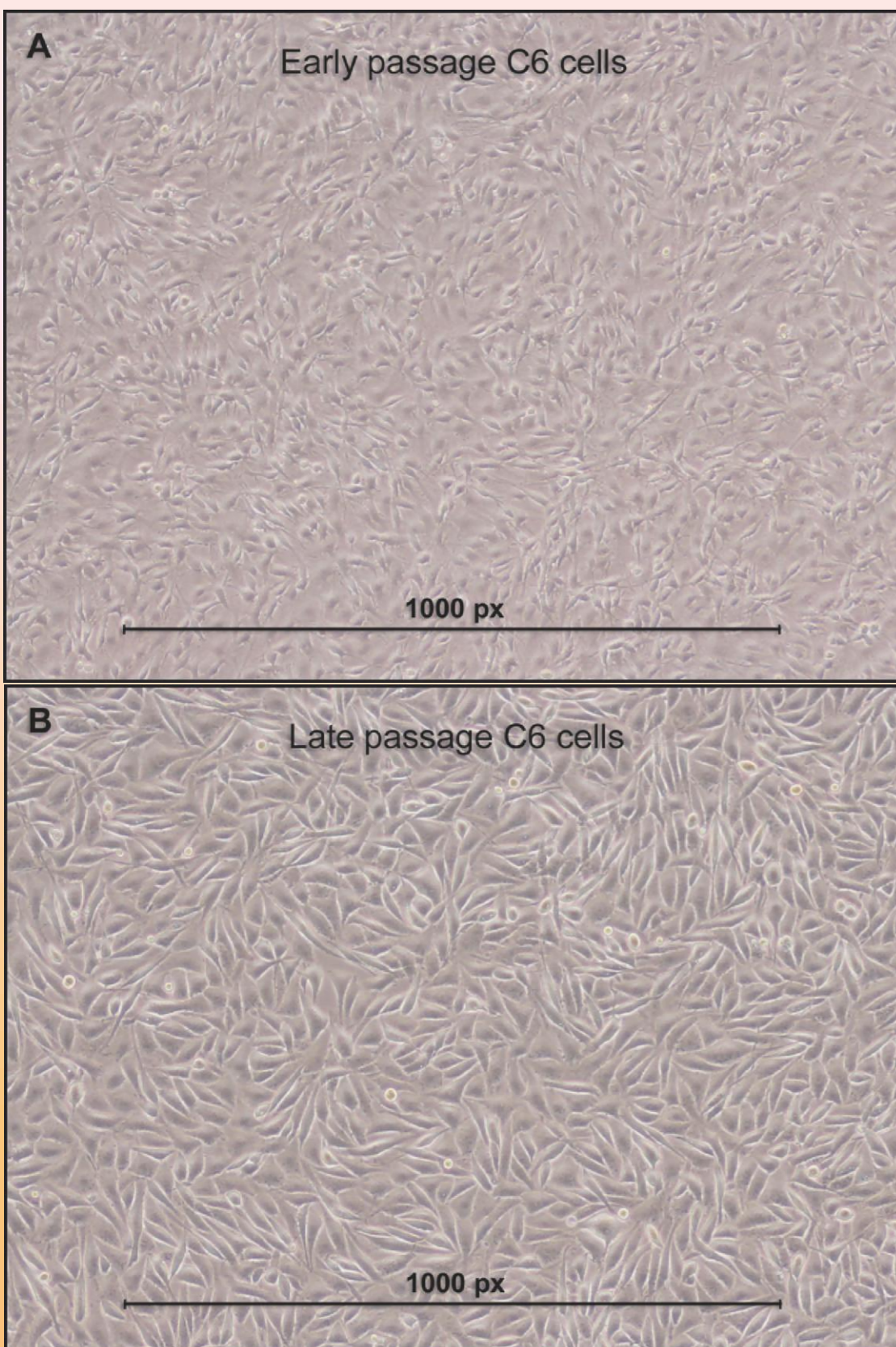
Marcela Mendonça Cavalheiro, Mery Stéfani Leivas Pereira, Kamila Zenki, Rafael Zanin e Diogo Losch de Oliveira.  
Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS, Porto Alegre/RS

## INTRODUÇÃO:

Estudos recentes tem mostrado que a capacidade invasiva dos tumores cerebrais está ligada a mecanismos excitotóxicos induzidos pela liberação de glutamato das células periféricas de gliomas. A linhagem de glioma C6 tem sido amplamente utilizada como um modelo para estudar a biologia de tumores cerebrais, principalmente de glioblastomas. Entretanto, essa linhagem apresenta variações fisiológicas e morfológicas de acordo com o número de passagens em cultura. Células de altas passagens (tardias) se assemelham à astroglia madura, enquanto células de baixas passagens (recentes) são similares aos glioblastomas.

Este trabalho tem como objetivo avaliar e comparar o perfil do sistema glutamatérgico entre as passagens recentes e tardias da linhagem de glioma C6 em cultura.

## MÉTODOS:



**Culturas:** Passagens recentes (6-15 passagens – Fig. 1A) e tardias (acima de 100 passagens – Fig. 1B) da linhagem C6 foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas até atingirem 90 % de confluência em DMEM com 5% de FBS a 37°C em uma atmosfera de ar/CO<sub>2</sub> (95:5).

**Captação de aminoácidos:** As células foram incubadas a 37°C em solução salina balanceada de Hank (HBSS) com L-[<sup>3</sup>H]-Glu ou D-[<sup>3</sup>H]-Asp durante 5-180 min.

**Liberação da radioatividade:** As células foram incubadas com L-[<sup>3</sup>H]-Glu ou D-[<sup>3</sup>H]-Asp diluídos em HBSS durante 1h a 37°C. Após, as passagens recentes e tardias foram lavadas e incubadas durante 1h em HBSS contendo 100 μM de L-Glu ou 100 μM de D-Asp.

**Inibição da captação de aminoácidos:** A inibição dos transportadores de glutamato por 100 μM de L-trans-2,4-PDC e 100 μM de DL-TBOA foi avaliada durante o experimento de captação no tempo de 120 min. As proteínas foram quantificadas segundo a metodologia descrita por Peterson, G. L. 1997, e a radioatividade foi quantificada por cintilação.

**Integridade da membrana:** As células foram incubadas em 5μM de Iodeto de propídeo (IP) 30 min antes dos tratamentos (5-180 min em ausência – controles – ou presença de 100μM de L-Glu diluído em HBSS) e a incorporação do IP foi avaliada por citometria de fluxo.

**Western blot:** As amostras (10μg) foram separadas em um minigel SDS-PAGE 8% e transferidas para uma

Fig. 1 – Comparação da morfologia entre células C6 de passagens recentes (A) e tardias (B).

membrana de nitrocelulose. Após 1h de bloqueio, as membranas foram marcadas com anticorpo anti-rat para EAAC1 (0,17 μg/mL), GLT1 (0,33 μg/mL) ou GLAST (1 μg/mL) overnight. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-rabbit conjugado com peroxidase por 2 horas. A β-actina foi usada como controle para igualar a quantidade de proteína. As bandas foram visualizadas por quimioluminescência e quantificados utilizando-se o software OptiQuant.

## RESULTADOS:

**Captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu:** Ambas as culturas mostraram um aumento tempo-dependente do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu, atingindo um plateau aos 120 minutos. No entanto, o conteúdo de [<sup>3</sup>H] intracelular derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado em passagens tardias foi 55% menor de 60 minutos (22,11 ± 1,79 nmol Glu/mg de proteína; n=14; P<0,001, ANOVA de duas vias) a 180 minutos de incubação (36,55 ± 2,36 nmol Glu/mg de proteína; n=5; P<0,001, ANOVA de duas vias) quando comparado com as passagens recentes (47,60 ± 4,82 nmol Glu/mg de proteína, n=14; 85,93 ± 6,78 nmol Glu/mg de proteína, n=5; respectivamente) (Fig. 2).

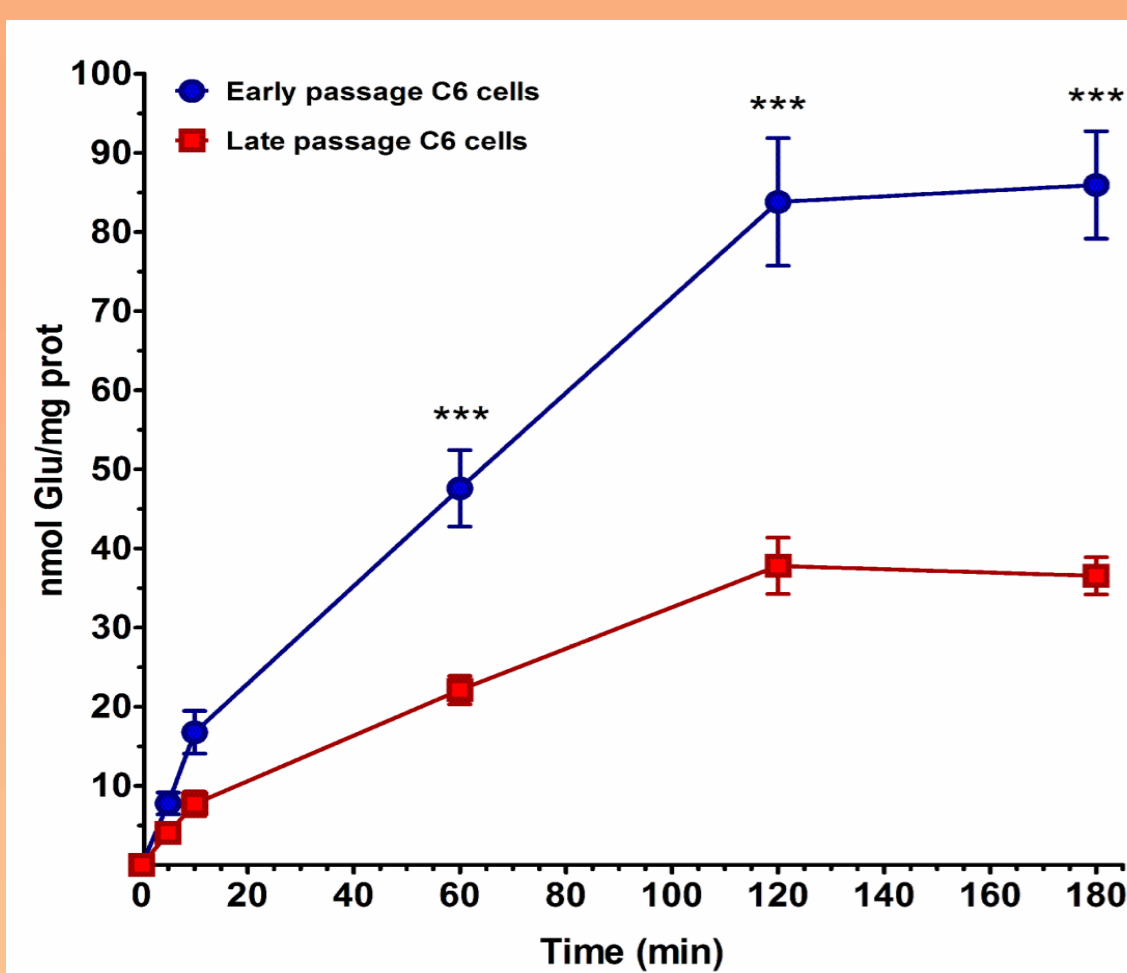


Fig. 2 – Conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu em passagens recentes e tardias da linhagem C6. Os dados foram expressos como média ± EP. \*\*\* P<0,001, ANOVA de duas vias, n=4-14, experimentos realizados em triplicatas.

**Integridade de membrana:** A integridade da membrana celular foi avaliada para verificar se essa diferença no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado está relacionada a uma perda da integridade de membrana. A incorporação de IP foi em torno de 5% nas passagens recentes (Fig. 3A) e menos de 10% nas passagens tardias da linhagem de glioma C6 (Fig. 3B).

**Expressão dos transportadores de glutamato:** Ambas as passagens recentes e tardias da linhagem C6 expressaram apenas o transportador neuronal de glutamato (EAAC1) nos mesmos níveis (Fig. 4C,D).

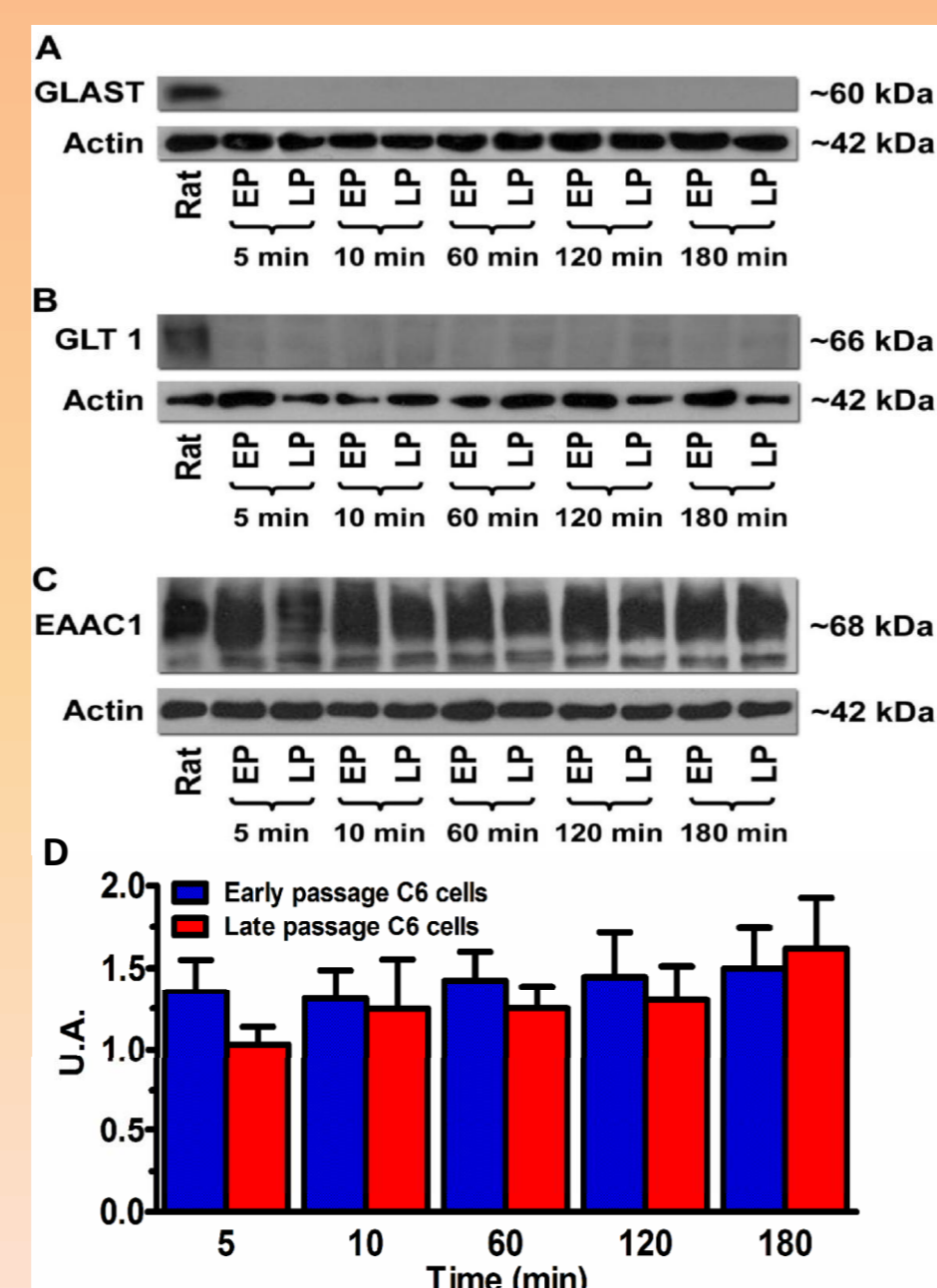


Fig. 4 – Expressão dos transportadores de glutamato em passagens recentes (EP) e tardias (LP). Expressão de GLAST (A), GLT1 (B) e EAAC1 (C). Análise da expressão de EAAC1 (D). Dados expressos como média ± EP; ANOVA de duas vias; n=4-10.

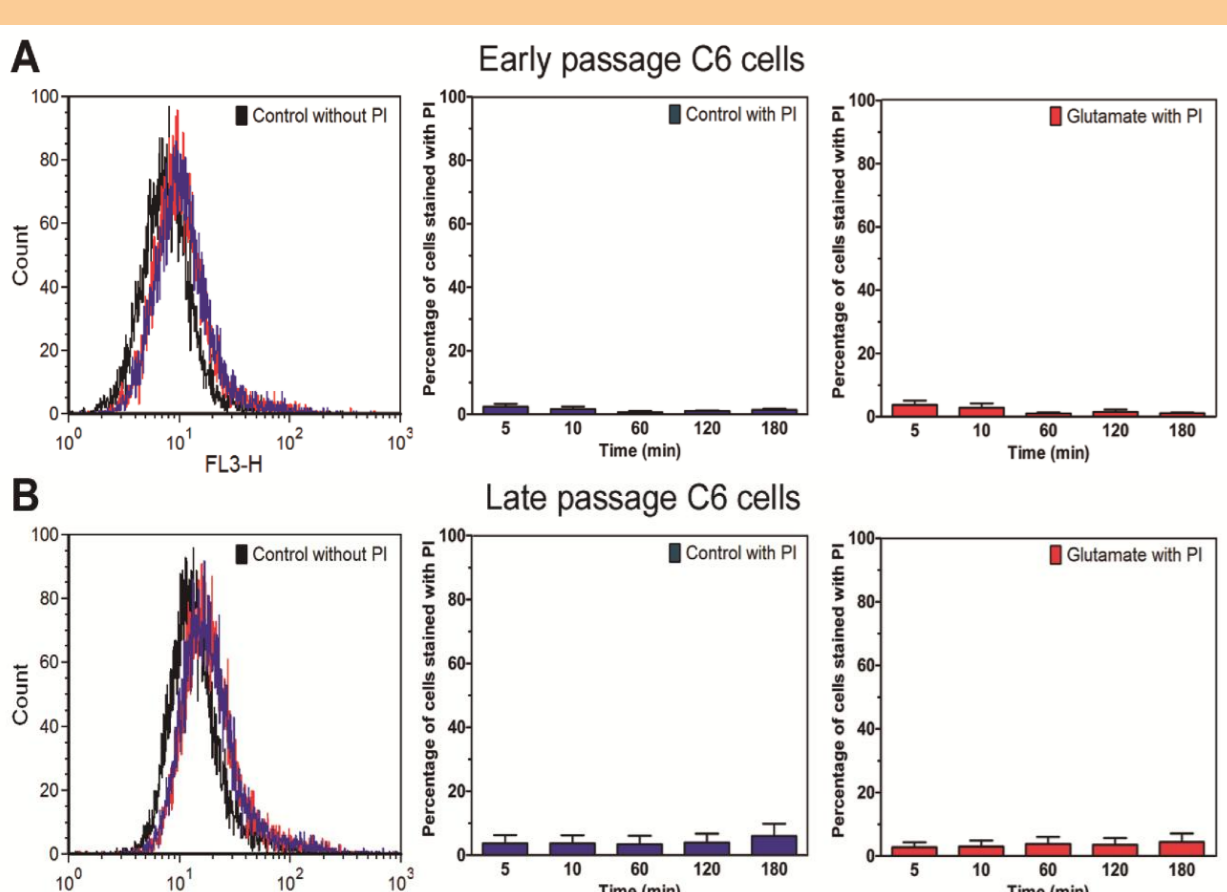


Fig. 3 – Perda da integridade de membrana medida pela incorporação de IP em passagens recentes (A) e tardias (B) da linhagem C6. Os dados foram expressos como média ± EP; ANOVA de duas vias; n=3.

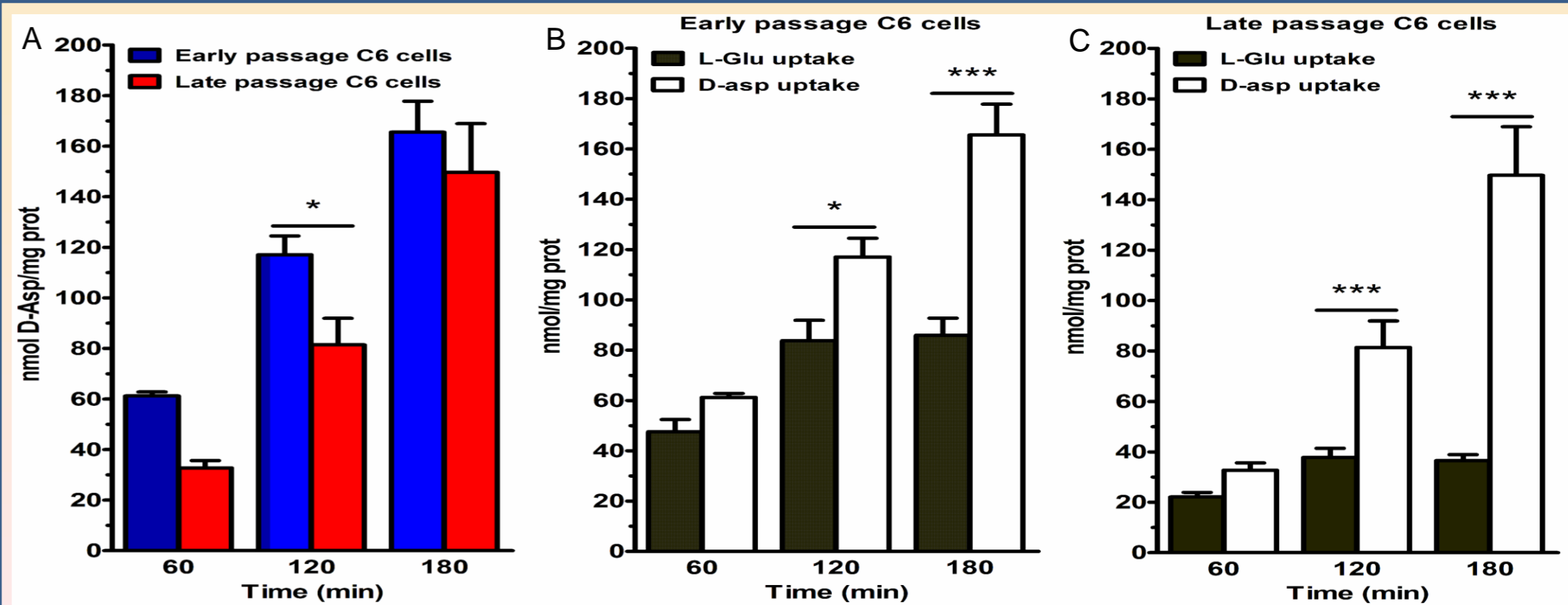


Fig 5 – Conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado. (A) Comparação do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado entre passagens recentes e tardias da linhagem C6. (B) Comparação entre o conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado e o conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado em passagens recentes. (C) Comparação entre o conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado e o conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado em passagens tardias. \*\*\* P<0,001, \* P<0,05; ANOVA de duas vias; n=4-14 experimentos realizados em triplicata. Dados expressos como média ± EP.

**Captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp:** Quando incubadas com D-[<sup>3</sup>H]-Asp, ambas as culturas mostraram um aumento tempo-dependente no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] sem atingir um plateau. O conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado em passagens tardias foi 30% menor aos 120 minutos de incubação (81,42 ± 10,50 nmol de Asp/mg de proteína; n=8; P<0,05, ANOVA de duas vias) quando comparado às passagens recentes (117,05 ± 7,43 nmol Asp/mg de proteína; n=8) (Fig 5A).

**Comparação entre os experimentos de captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu e D-[<sup>3</sup>H]-Asp:** Nas passagens recentes, o conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado foi menor aos 120 minutos (83,81 ± 8,05 nmol Glu/mg de proteína; n=5; P<0,05, ANOVA de duas vias) e aos 180 minutos (85,93 ± 6,78 nmol Glu/mg de proteína; n=5; P<0,001, ANOVA de duas vias) quando comparado ao conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado (117,05 ± 7,43 nmol Asp/mg de proteína, n=8; 165,54 ± 12,23 nmol Asp/mg de proteína, n=5; respectivamente) (Fig 5B). Esse perfil de conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado foi bastante similar nas passagens tardias também em ambos 120 (37,81 ± 3,56 nmol Glu/mg proteína; n=5; P<0,001, ANOVA de duas vias) e 180 minutos (36,55 ± 2,36 nmol Glu/mg de proteína; n=5; P<0,001, ANOVA de duas vias) quando comparado ao conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado (81,42 ± 10,50 nmol Asp/mg de proteína, n=8; 149,70 ± 19,222 nmol Asp/mg de proteína, n=4; respectivamente) (Fig 5C).

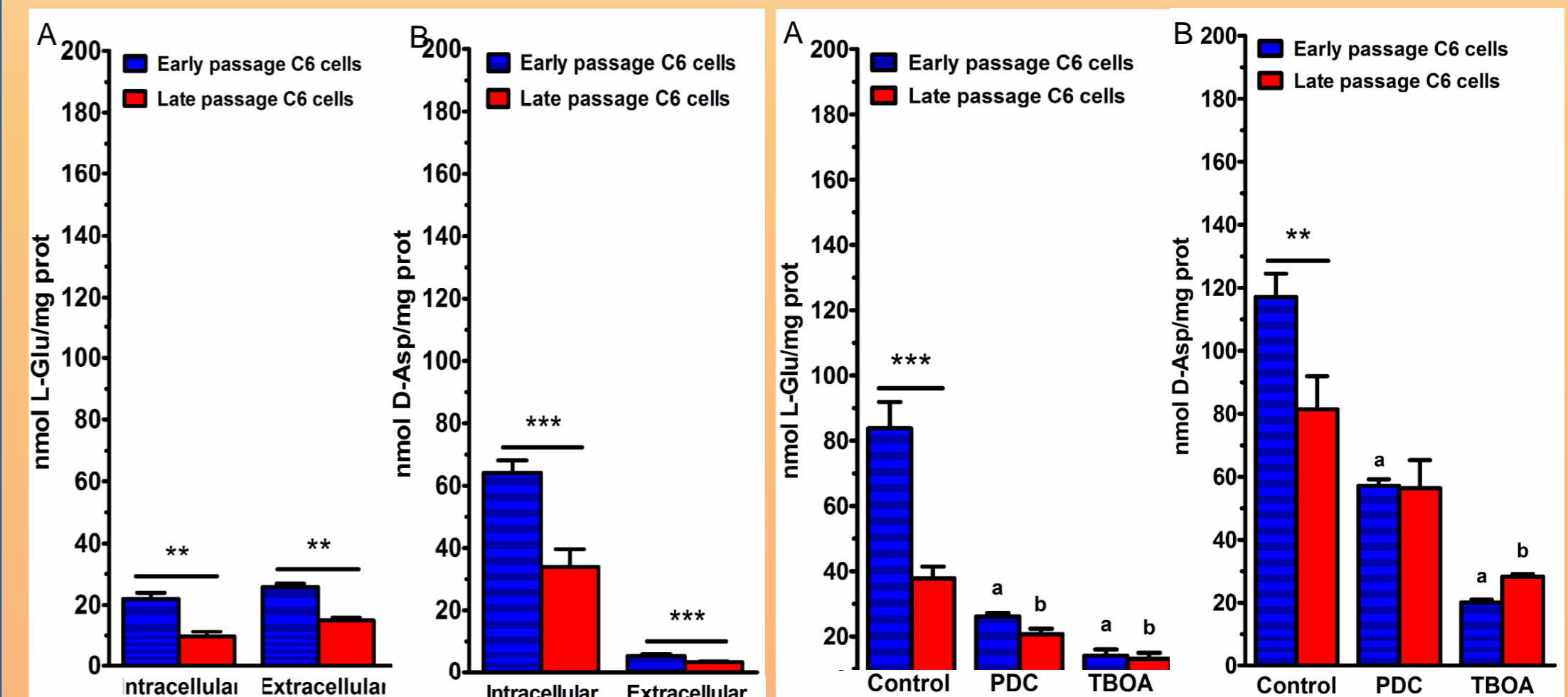


Fig. 6 – Radioatividade liberada de células C6 de passagens recentes e tardias. (A) Conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado de L-[<sup>3</sup>H]-Glu. (B) Conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado de D-[<sup>3</sup>H]-Asp. \*\*\* P<0,001, \*\* P<0,01; ANOVA de duas vias, n=3-4 experimentos realizados em triplicatas. Os dados foram expressos como média ± EP.

Fig. 7 – Inibição dos transportadores de glutamato por PDC ou TBOA em células C6 de passagens recentes e tardias, avaliada durante os experimentos de captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu (A) e D-[<sup>3</sup>H]-Asp (B). \*\*\* P<0,001, \*\* P<0,01; As letras a e b representam diferença significativa entre os tratamentos e seus respectivos controles; ANOVA de duas vias, n=3-8 experimentos realizados em triplicata. Os dados foram expressos como média ± EP.

**Liberação da radioatividade:** Aproximadamente 50% do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado foi liberado para o meio extracelular em ambas as culturas (Fig 6A). Entretanto, não houve liberação do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Aspartato. (Fig 6B).

**Inibição dos transportadores de glutamato:** A inibição dos transportadores de glutamato em passagens recentes da linhagem C6 por PDC ou TBOA diminuiu a captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu em, respectivamente, 70% (26,17 ± 1,04 nmol Glu/mg de proteína; n=5; P<0,001, ANOVA de duas vias) e 80% (14,06 ± 1,95 nmol Glu/mg de proteína; n=5; P<0,001, ANOVA de duas vias) (Fig 7A), e diminuiu a captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp em, respectivamente, 50% (57,13 ± 2,07 nmol Asp/mg de proteína; n=4; P<0,001, ANOVA de duas vias) e 80% (20,06 ± 0,98 nmol Asp/mg de proteína; n=3; P<0,001, ANOVA de duas vias) (Fig 7B). A inibição dos transportadores de glutamato passagens tardias da linhagem C6 por PDC ou TBOA diminuiu a captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu em, respectivamente, 50% (20,66 ± 1,72 nmol Glu/mg de proteína; n=5; P<0,01, ANOVA de duas vias) e 60% (13,09 ± 1,87 nmol Glu/mg de proteína; n=5; P<0,001, ANOVA de duas vias) (Fig 7A), e diminuiu a captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp em, respectivamente, 25% e 70% (28,33 ± 0,80 nmol Asp/mg de proteína; n=3; P<0,01, ANOVA de duas vias) (Fig 7 B).

## CONCLUSÃO:

- **Captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu:** As passagens recentes e tardias da linhagem de glioma C6 possuem diferentes perfis de captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu. Ambas as células apresentam um aumento tempo-dependente do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado, atingindo um plateau aos 120 minutos. Células de passagens recentes tem um aumento de 55% no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] quando comparadas às células de passagens tardias;
- **Captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp:** As passagens recentes e tardias da linhagem de glioma C6 apresentam um aumento tempo-dependente do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado, sem atingir um plateau, o que pode estar relacionado a sua não-liberação. Esse perfil foi quase o mesmo em ambas as culturas e o conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado foi maior em ambas as células quando comparado ao derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado;

• **Integridade de membrana, expressão e inibição dos transportadores de glutamato:** Os perfis distintos de captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu observados nos experimentos não foram explicados nem pela perda de integridade de membrana e nem por diferenças na expressão dos transportadores de glutamato entre as passagens recentes e tardias. O conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado das captações de L-[<sup>3</sup>H]-Glu e D-[<sup>3</sup>H]-Asp foi diminuído em ambas as células na presença de PDC ou TBOA, indicando que a captação desses aminoácidos ocorreu principalmente através dos transportadores de glutamato;

• **Liberação da radioatividade:** Não houve liberação do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado. Entretanto, 50% do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado foi liberado para o meio extracelular em ambas as culturas. Esse perfil poderia explicar o plateau observado durante o experimento de captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu a partir dos 120 minutos em ambas as culturas. Na verdade, ainda não se sabe o que está sendo liberado: se é o L-[<sup>3</sup>H]-Glu, apenas um [<sup>3</sup>H]-metabólito, ou ambos.

• Mais estudos são necessário para que se possa elucidar os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nessa redução da quantidade de conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado do L-[<sup>3</sup>H]-Glu captado nas passagens tardias da linhagem C6.

**APOIO FINANCEIRO:** IBN-Net, CAPES, INCTEN, FAPERGS e CNPq.