

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

Tese de Doutorado

***Metabolismo cerebral de glicose em modelos murinos da doença de Alzheimer:
tipos celulares e interpretações biológicas***

Andréia Silva da Rocha

Porto Alegre

2023

Andréia Silva da Rocha

***Metabolismo cerebral de glicose em modelos murinos da doença de Alzheimer:
tipos celulares e interpretações biológicas***

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rigon Zimmer
Co-orientador: Prof. Diogo Onofre Gomes de Souza

Porto Alegre
2023

CIP - Catalogação na Publicação

Silva da Rocha, Andréia
Metabolismo cerebral de glicose em modelos murinos da doença de Alzheimer: tipos celulares e interpretações biológicas / Andréia Silva da Rocha. -- 2023.
142 f.
Orientador: Eduardo Rigon Zimmer.

Coorientador: Diogo Onofre Gomes de Souza.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. [18F]FDG-PET . 2. Astrócitos. 3. Doença de Alzheimer. I. Rigon Zimmer, Eduardo, orient. II. Onofre Gomes de Souza, Diogo, coorient. III. Título.

“Aonde não puderes ser um rio, não transborde.”

Lecão

APRESENTAÇÃO

A seguinte tese está organizada em conformidade com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, artigo 31º do regimento de 2023. A tese está dividida nas seguintes partes:

Parte I

Abstract/Resumo

Introdução: introdução abordando os temas importantes para o entendimento dos trabalhos de pesquisa a serem apresentados na Parte II.

Objetivos: Objetivos gerais e específicos

Parte II

Artigos que estão divididos em três capítulos, sendo cada que capítulo contém um breve prefácio seguido do um artigo científico;

Parte III

Conclusão

Referências

Na seção “Anexos A” estão os artigos científicos publicados durante o período de doutoramento que têm conteúdo associado ao tema do projeto de doutorado. Na seção “Anexos B” está o artigo que não possui tema associado ao projeto de doutorado.

SUMÁRIO

PARTE I

ABSTRACT	7
RESUMO.....	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 O metabolismo cerebral de glicose	9
1.2 A tomografia por emissão de pósitrons	11
1.3 A 2-desoxi-2-[¹⁸ F]fluoroglicose.....	12
1.4 O sistema glutamatérgico	18
1.4.1 Moduladores do transporte de glutamato astrocitário.....	21
1.5 Astrócitos e a lançadeira de lactato	25
1.6 A importância de estudar doenças neurológicas	29
1.6.1 A Doença de Alzheimer	31
1.6.1.1 O diagnóstico da Doença de Alzheimer	34
1.6.1.2 As espécies da proteína β -amiloide	37
1.6.1.3 Modelos da Doença de Alzheimer em Roedores.....	40
2. OBJETIVO.....	43
2.1 Objetivos específicos.....	43

PARTE II

Clozapine induces astrocyte-dependent FDG-PET hypometabolism.....	45
Soluble amyloid- β oligomers trigger brain glucose hypometabolism and network abnormalities	71
Early metabolic and glial changes in a transgenic rat model of amyloidosis	88

PARTE III

3. CONCLUSÃO	118
REFERÊNCIAS.....	121
ANEXO A	132
ANEXO B	140

PARTE I

ABSTRACT

Advancements in functional imaging have enabled the visualization of in vivo and non-invasive brain glucose metabolism through positron emission tomography (PET) imaging using the radiopharmaceutical 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoroglucose ([¹⁸F]FDG). Over the past few decades, [¹⁸F]FDG-PET has been pivotal in understanding brain function and diagnosing various pathologies, especially Alzheimer's Disease (AD). However, despite its widespread use, the interpretation of the cellular origin of [¹⁸F]FDG-PET signals remains controversial. For many years, the imaging signals from this exam have been attributed to neuronal [¹⁸F]FDG metabolism. However, multiple lines of evidence have pointed toward a significant involvement of other brain cell types, such as glial cell, in the cerebral glucose metabolism.

This thesis aimed to evaluate: I) brain cell contributions to [¹⁸F]FDG-PET signals, with a particular focus on astrocytes, and II) the role of [¹⁸F]FDG-PET imaging in the understanding of AD pathophysiology. In **Article I**, we provided evidence that pharmacological manipulation of the astrocyte glutamate transport in rats alters the brain [¹⁸F]FDG-PET signal, mimicking the hypometabolism seen in AD and other causes of dementia. In **Article II**, we provided evidence that soluble amyloid- β oligomers (A β Os) induce [¹⁸F]FDG-PET abnormalities in mice, even in the absence of amyloid plaques. The presence of detectable metabolic changes using [¹⁸F]FDG-PET in the early stages of AD and in the absence of amyloid plaques has been confirmed in two additional transgenic models of AD and in non-demented amyloid-negative individuals on the AD continuum. These results challenge the notion that amyloid plaque deposition precedes brain glucose abnormalities as postulated by the most well-accepted biomarker-based models. In **Article III**, we conducted a longitudinal analysis of brain glucose metabolism via [¹⁸F]FDG-PET in the AD transgenic rat model (TgF344-AD) rats at four time points, starting before plaque deposition. In parallel, we evaluated these animals' behavior, glial, neuronal, and inflammatory markers, as well as glutamate uptake at the same ages. Our findings suggest that this model exhibits early hypermetabolism in glucose metabolism, possibly related to astrocyte reactivity and increased glutamate uptake by these cells.

All findings suggest astrocytes contribute to the [¹⁸F]FDG-PET signal, A β Os cause early glucose brain abnormalities, which seem to be related to astrocyte reactivity. Altogether, these results have important clinical implications for the interpretation of [¹⁸F]FDG-PET and, also highlight its potential as an early biomarker for AD.

RESUMO

Avanços na imagem funcional permitiram a visualização do metabolismo da glicose cerebral in vivo e de forma não invasiva por meio da tomografia por emissão de pósitrons (PET) usando o radiofármaco 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoroglicose ([¹⁸F]FDG). Nas últimas décadas, o [¹⁸F]FDG-PET tem sido fundamental na compreensão da função cerebral e no diagnóstico de diversas patologias, especialmente a doença de Alzheimer (DA). No entanto, apesar do seu uso generalizado, a interpretação da origem celular dos sinais [¹⁸F]FDG-PET permanece controversa. Durante muitos anos, os sinais de imagem deste exame têm sido atribuídos ao metabolismo neuronal do [¹⁸F]FDG. No entanto, múltiplas linhas de evidência apontaram para um envolvimento significativo de outros tipos de células cerebrais, como as células gliais.

Esta tese teve como objetivo avaliar: I) as contribuições das diferentes células cerebrais para o sinal de [¹⁸F]FDG-PET, com foco particular nos astrócitos, e II) o papel da imagem de [¹⁸F]FDG-PET na compreensão da fisiopatologia da DA. No **Artigo I**, fornecemos evidências de que a manipulação farmacológica do transporte de glutamato em astrócitos em ratos altera o sinal cerebral [¹⁸F]FDG-PET, mimetizando o hipometabolismo observado na DA e outras causas de demência. No **Artigo II**, identificamos que os oligômeros β -amiloide solúveis (A β Os) induzem anormalidades de cerebrais no sinal do [¹⁸F]FDG-PET em camundongos, mesmo na ausência de placas amiloides. A presença de alterações metabólicas detectáveis usando [¹⁸F]FDG-PET nos estágios iniciais da DA e na ausência de placas amiloides foi confirmada em dois modelos transgênicos de DA adicionais e em indivíduos não dementes negativos para amiloide no continuum da DA. Esses resultados desafiam a noção de que a deposição de placas amiloides precede as alterações da glicose cerebral, conforme postulado pelos modelos baseados em biomarcadores mais aceitos. No **Artigo III**, conduzimos uma análise longitudinal do metabolismo da glicose cerebral via [¹⁸F]FDG-PET em um modelo de rato transgênico da DA (TgF344-AD) em quatro idades, começando antes da deposição das placas. Paralelamente, avaliamos o comportamento, marcadores gliais, neuronais e inflamatórios, bem como a captação de glutamato nesses animais. Nossos achados sugerem que este modelo apresenta hipermetabolismo precoce no metabolismo da glicose, possivelmente relacionado à reatividade dos astrócitos e ao aumento da captação de glutamato por essas células.

Nossos achados sugerem que os astrócitos contribuem para o sinal [¹⁸F] FDG-PET e os A β Os causam anormalidades precoces no metabolismo de glicose cerebral, que parecem estar relacionadas à reatividade dos astrócitos. Em conjunto, estes resultados têm implicações clínicas importantes para a interpretação do [¹⁸F]FDG-PET e, também, destacam o seu potencial como um biomarcador precoce para a DA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O metabolismo cerebral de glicose

Responsável por coordenar nossas funções cognitivas, sensoriais e motoras, o encéfalo humano é considerado um órgão altamente complexo e metabolicamente exigente, cujo funcionamento adequado depende substancialmente do metabolismo de glicose. Estima-se que, apesar de corresponder a apenas cerca de 2% da massa corpórea, o encéfalo consuma perto de um quinto (20%) da quantidade total de glicose presente no corpo. No encéfalo, fontes alternativas de combustível, como corpos cetônicos, ficam em segundo plano quando comparadas com a glicose (ERBSLOH; BERNISMEIER; HILLESHEIM, 1958).

O encéfalo parece ter adaptado sua maquinaria metabólica para priorizar o uso de glicose e acredita-se que essa particular dependência do encéfalo pela glicose derive em parte da existência da barreira hematoencefálica (BBB) e de sua permeabilidade seletiva. A entrada de diversas moléculas (por exemplo, glutamato, aspartato, glicina, D-serina) no encéfalo é altamente restrita pela BBB, sendo assim, esses compostos devem ser sintetizados a partir da glicose dentro do cérebro. Além de essencial para a síntese de diversos neurotransmissores e neuromoduladores, no cérebro a glicose é utilizada para diversas funções críticas, como a produção de ATP, manutenção do estresse oxidativo e síntese de componentes estruturais (MERGENTHALER; LINDAUER; DIENEL; MEISEL, 2013).

Outro ponto pelo qual o metabolismo cerebral se destaca, quando comparado aos órgãos periféricos, é por ser relativamente independente da insulina. Ao contrário de muitos outros tecidos, o cérebro, em geral, não requer a presença direta de insulina para a captação de glicose. As células cerebrais predominantemente expressam transportadores de glicose do tipo GLUT1 ou GLUT3, que apresentam alta afinidade pela glicose e não são sensíveis à insulina. Isso garante um suprimento constante de glicose, independentemente dos níveis de insulina circulante. Entretanto, pesquisas mais recentes indicaram que, mesmo sem atuar diretamente nos transportadores de glicose, a insulina pode influenciar funções cerebrais (KLEINRIDDERS; FERRIS; CAI; KAHN, 2014).

Outra peculiaridade do metabolismo cerebral de glicose é a presença de um estoque de glicogênio específico para seu uso, localizado principalmente nos astrócitos. Esse estoque atua como uma reserva rápida de glicose em momentos de

escassez, como durante o jejum ou em situações de hipoglicemia (DURAN; GRUART; LOPEZ-RAMOS; DELGADO-GARCIA *et al.*, 2019).

No cérebro, o metabolismo da glicose é cuidadosamente regulado e intrincadamente ligado a diferentes vias metabólicas. Por exemplo, para gerar adenosina trifosfato (ATP), a glicose passa pelo processo de metabolização que inclui a glicólise, e pode vir ou não a incluir o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, depende da região e estado de ativação cerebral e tipo celular.

Evidências apontam que no cérebro em repouso e acordado, a maior parte da glicose é completamente oxidada a gás carbônico e água, e quase uma quantidade estequiométrica de oxigênio (ou seja, 6 moléculas oxigênio por molécula de glicose) é consumida. Dessa forma, nesse estado, a proporção entre o consumo de oxigênio e glicose é geralmente cerca de 5.5 a 5.8 moléculas oxigênio por molécula de glicose. Acredita-se que a proporção não seja exatamente 6 devido a reações biossintéticas ocorrendo no cérebro (MERGENTHALER; LINDAUER; DIENEL; MEISEL, 2013).

No entanto, durante a ativação do cérebro, observou-se que a taxa de glicólise é preferencialmente aumentada, e a proporção de utilização de oxigênio/glicose diminui, apesar do aporte de oxigênio suficiente. Nesse contexto, ainda persistem consideráveis controvérsias em relação a quais células cerebrais mais intensamente utilizam a glicose e que são responsáveis, predominantemente, por essas diferentes vias metabólicas nos diferentes estados de ativação cerebral (**ver seção 2.2 na Parte I dessa tese**) (MERGENTHALER; LINDAUER; DIENEL; MEISEL, 2013).

A compreensão integral do metabolismo de glicose, processo crucial para o funcionamento normal do cerebral, é indispensável para o entendimento, diagnóstico e tratamento de inúmeros distúrbios neurológicos que têm demonstrado apresentar modificações nesse metabolismo, tais como a doença de Alzheimer (DA), epilepsia e acidente vascular cerebral. Sendo assim, o desenvolvimento de diversas técnicas para estudar o metabolismo de glicose, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, desempenha um papel fundamental nesse avanço científico e clínico, possibilitando uma compreensão mais profunda e precisa das complexas interações metabólicas que ocorrem no cérebro. Neste cenário, o desenvolvimento da tomografia por emissão de pósitrons foi um grande trunfo.

1.2 A tomografia por emissão de pósitrons

A tomografia por emissão de pósitrons (PET), desenvolvida em 1974 (PHELPS; HOFFMAN; MULLANI; TER-POGOSSIAN, 1975), é uma técnica de imageamento nuclear que revolucionou a área de imagem médica. Com a PET tornou-se possível, de forma não invasiva, a visualização e a quantificação de funções e componentes moleculares em organismos biológicos vivos. Para isso, a PET faz uso dos chamados radiofármacos, moléculas de interesse biológico nas quais um átomo emissor de pósitrons foi inserido. Estes átomos são produzidos em um acelerador de partículas, chamado cíclotron, e depois inseridos rapidamente na molécula de interesse. Após a administração do radiofármaco, este distribui-se no organismo e interage com componentes moleculares e processos fisiológicos/bioquímicos em curso, podendo, por exemplo, ser transportado, ligar-se a receptores ou ser metabolizado, entre outras possibilidades. Simultaneamente, o equipamento de PET é capaz de detectar, quantificar e mapear a localização espacial deste radiofármaco e, conseqüentemente, das moléculas e processos com os quais este interage (PORTNOW; VAILLANCOURT; OKUN, 2013).

A detecção e o processamento da imagem pelo PET é possível graças a uma série de processos físicos e matemáticos (a **Figura 1** apresenta um esquema ilustrativo). Basicamente, quando o átomo radioativo emissor de pósitrons decai, um pósitron é emitido. O pósitron então percorre uma distância muito curta no tecido do organismo onde foi injetado e rapidamente encontra e colide com elétrons dos átomos compondo o tecido. Quando ocorre essa colisão entre pósitron e elétron, uma reação chamada aniquilação acontece e a massa das duas partículas é convertida em energia, resultando na emissão de fótons de alta energia (raios gama) com direção oposta (CHERRY; GAMBHIR, 2001).

O PET, por sua vez, consiste em um conjunto de detectores dispostos ao redor do organismo a ser estudado e são projetados para converter esses fótons de alta energia em um sinal elétrico, que pode ser processado posteriormente por componentes eletrônicos. Durante uma varredura típica do PET, são detectados entre 1 milhão e 1 bilhão desses eventos de decaimento. Esses eventos são corrigidos para levar em consideração diversos fatores e, em seguida, são reconstruídos em uma imagem tomográfica utilizando algoritmos matemáticos (CHERRY; DAHLBOM, 2006).

O resultado desse processo de reconstrução é um volume de imagem tridimensional, onde a intensidade do sinal em cada voxel específico é proporcional à quantidade de radionuclídeo presente nesse voxel (e, portanto, à quantidade da molécula marcada à qual ele está ligado). Desse modo, as imagens obtidas por PET permitem mapear de forma quantitativa a distribuição espacial de radiofármacos em um organismo vivo. Ao realizar uma sequência de imagens ao longo do tempo, é possível medir a concentração do radiofármaco nos tecidos em função do tempo e, com o uso de um modelo matemático apropriado, determinar a taxa de processos biológicos específicos (CHERRY; DAHLBOM, 2006).

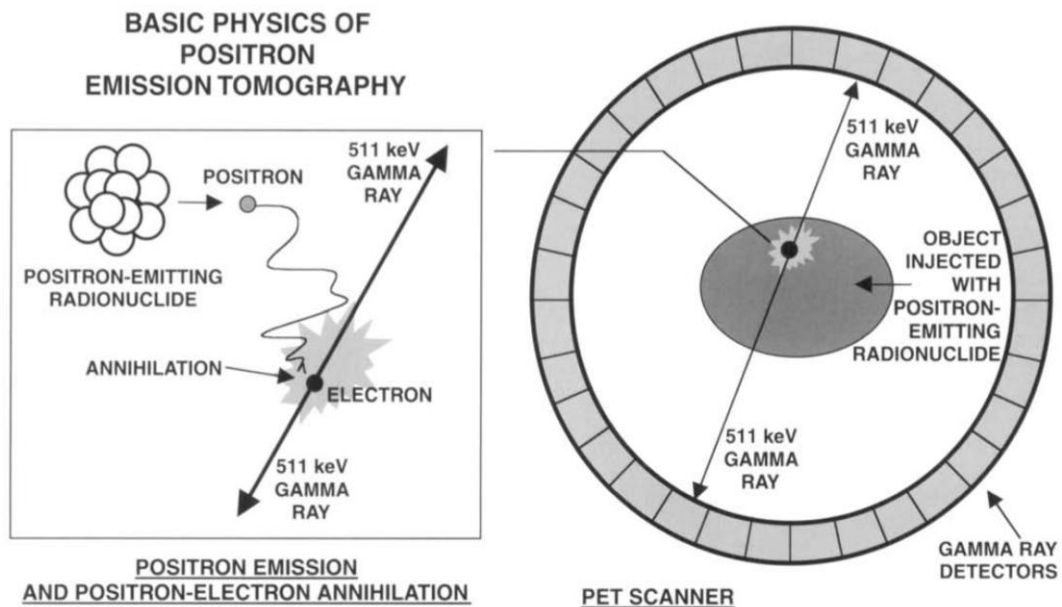


Figura 1. Física básica da tomografia por emissão de pósitrons. Um composto marcado com um radionuclídeo emissor de pósitrons é introduzido no corpo, geralmente por meio de injeção intravenosa. Quando um dos átomos do radionuclídeo decai, um pósitron é emitido. O pósitron percorre uma distância muito curta no tecido (tipicamente cerca de 10 mm) e aniquila-se com um elétron no tecido. A massa das duas partículas é convertida em energia, que é emitida na forma de dois raios gama de 511 keV, opostos um ao outro. O aparelho tomógrafo por emissão de pósitrons consiste em um anel, ou vários anéis, de detectores de raios gama que registram a detecção simultânea dos raios gama e sua localização, definindo assim a linha ao longo da qual ocorreu a emissão de pósitrons. Ao coletar um grande número de eventos de pares de raios gama e utilizar métodos de tomografia computadorizada, imagens refletindo a concentração do radionuclídeo emissor de pósitrons são geradas. Fonte: (CHERRY; GAMBHIR, 2001; LEE; CHO; RYU, 2021)

1.3 A 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoroglicose

Dentre os radiofármacos emissores de pósitrons desenvolvidos até hoje, a 2-desoxi-2-[¹⁸F]fluoroglicose ([¹⁸F]FDG) destaca-se como o mais conhecido, sendo considerada, por vezes, como o "radiotraçador do século" (WAGNER, 2008). Inspirado pelas pesquisas pioneiras de Sokoloff e colaboradores com a 2-desoxi-2-

[¹⁴C]-glicose ([¹⁴C]2DG) (KENNEDY; DES ROSIERS; JEHLE; REIVICH *et al.*, 1975), o [¹⁸F]FDG foi sintetizado pela primeira vez em 1976 (IDO; WAN; CASELLA; FOWLER *et al.*, 1978). Inicialmente, este radiofármaco foi concebido com o intuito de avaliar a atividade cerebral (em razão do grande uso de glicose por esse tecido) (FOWLER; IDO, 2002), mas posteriormente revelou-se também uma ferramenta inestimável na detecção do câncer, em virtude do efeito Warburg observado nas células cancerígenas (KELLOFF; HOFFMAN; JOHNSON; SCHER *et al.*, 2005; SOM; ATKINS; BANDOYPADHYAY; FOWLER *et al.*, 1980).

A notável relevância do [¹⁸F]FDG no diagnóstico de tumores impulsionou sua disseminação global, bem como da própria PET. Atualmente, o [¹⁸F]FDG é o radiofármaco emissor de pósitrons mais utilizado, encontrando-se em uso clínico em quase todas as cidades de médio e grande porte ao redor do mundo. A ampla disponibilidade desse radiofármaco, em comparação com outros radiofármacos para avaliação cerebral, torna seu uso em escala global viável nas neurociências e estabelece uma grande relevância para a interpretação correta dos seus resultados. No Brasil, por exemplo, o [¹⁸F]FDG foi o primeiro do radiofármaco emissor de pósitrons aprovado para fins de diagnóstico clínico.

O [¹⁸F]FDG é uma molécula análoga a glicose, modificada com a adição de um radioisótopo Fluor-18 em substituição a um grupo hidroxila na posição C-2 (**Figura 2a**). Quando administrado em organismos vivos, o [¹⁸F]FDG se comporta exatamente como uma molécula de glicose, apresentando distribuição no organismo e transporte celular equivalentes, bem como, recebendo um fosfato pela ação da enzima hexoquinase ao entrar nas células. Assim como no caso da glicose-6-fosfato, a fosforilação do [¹⁸F]FDG em [¹⁸F]FDG-6-fosfato impede a liberação dessa molécula da célula (SUOLINNA; HAAPARANTA; PAUL; HARKONEN *et al.*, 1986). No entanto, diferentemente da glicose-6-fosfato, a molécula de [¹⁸F]FDG-6-fosfato não pode seguir as vias metabólicas e permanece retida na célula até que o radioisótopo Fluor-18 decaia para Oxigênio-18, permitindo então sua entrada nas rotas metabólicas (REIVICH; KUHL; WOLF; GREENBERG *et al.*, 1979) (**Figura 2b-c**).

Dessa forma, o [¹⁸F]FDG entra nas células como se fosse uma molécula de glicose e se acumula. Conseqüentemente, células que consomem mais glicose terão um maior acúmulo de [¹⁸F]FDG, enquanto células com metabolismo mais lento acumularão menos. A concentração intracelular de [¹⁸F]FDG é, portanto, um indicativo

da taxa de captação de glicose pelas células, e a quantificação do [^{18}F]FDG em um tecido ao longo de um período de tempo específico, combinada com outros fatores, permite calcular a taxa de absorção de glicose pelo tecido (WIENHARD, 2002).

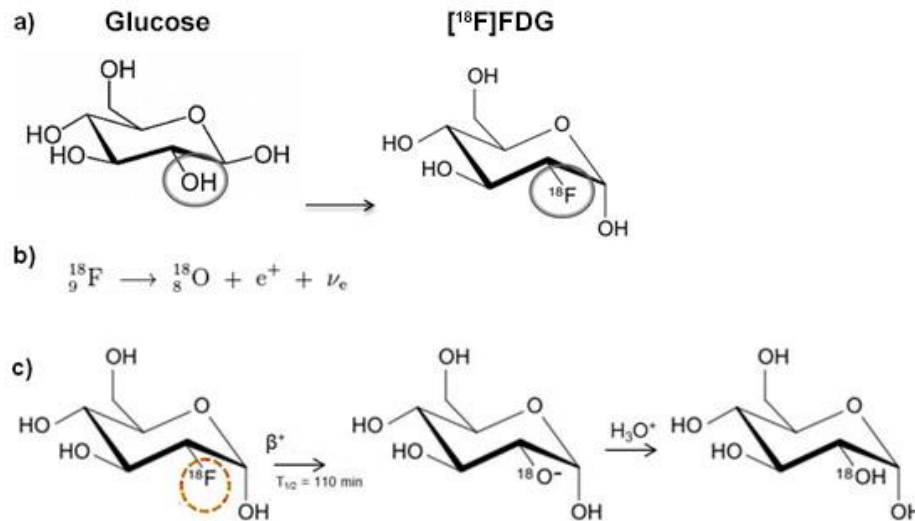


Figura 2. A molécula de [^{18}F]FDG. a) Comparação das moléculas de glicose e [^{18}F]FDG. **b)** Equação de decaimento do Fluor-18. **c)** Decaimento do Fluor-18 na molécula de [^{18}F]FDG resultando em uma molécula de [^{18}O]glicose.

O uso deste radiofármaco para avaliação da taxa metabólica de glicose cerebral foi validado em 1979 (PHELPS; HUANG; HOFFMAN; SELIN *et al.*, 1979) e é, até hoje, empregado para identificar regiões cerebrais mais ou menos ativas em situações fisiológicas e em resposta a diferentes estímulos, danos ou patologias. O [^{18}F]FDG-PET pode ser aplicado para realizar estudos fisiológicos de memória, cognição, entre outros (GREENBERG; REIVICH; ALAVI; HAND *et al.*, 1981), bem como, para detectar e diagnosticar vários tipos de tumores e outras doenças cerebrais.

De fato, nos últimos anos, o [^{18}F]FDG-PET tornou-se uma das ferramentas mais importantes na investigação do encéfalo, com aplicações em pesquisa, diagnóstico e monitoramento de vários distúrbios cerebrais e condições neuropsiquiátricas, como demência (SMIALGIC; VACANTE; HYDE; MARTIN *et al.*, 2015), epilepsia (SARIKAYA, 2015), doença de Huntington (FEIGIN; LEENDERS; MOELLER; MISSIMER *et al.*, 2001), doença de Parkinson (POSTON; EIDELBERG, 2010), trauma cranioencefálico (ALAVI, 1989), esclerose múltipla (BLINKENBERG; JENSEN; HOLM; PAULSON *et al.*, 1999), lesões isquêmicas (HEISS; KESSLER; KARBE; FINK *et al.*, 1993), esquizofrenia (SEETHALAKSHMI; PARKAR; NAIR; ADARKAR *et al.*, 2006), transtorno bipolar (ALTAMURA; BERTOLDO; MAROTTA; PAOLI *et al.*, 2013),

depressão (SU; CAI; XU; DUTT *et al.*, 2014), transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (ZAMETKIN; NORDAHL; GROSS; KING *et al.*, 1990), entre outros.

Por exemplo, no caso das demências, o $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ desponta como uma importante ferramenta de diagnóstico e já tem sido adotado em larga escala na prática clínica. Os estudos com $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ não apenas fornecem evidências do processo patológico que se manifesta no cérebro, mas também possibilitam o diagnóstico diferencial dos diversos tipos de demência. Isto é possível porque essas patologias, apesar de exibirem uma manifestação cognitiva semelhante, apresentam distintos padrões regionais de alteração no metabolismo de glicose (BROWN; BOHNNEN; WONG; MINOSHIMA *et al.*, 2014). A **Figura 3** exibe os variados padrões de hipometabolismo regional encontrados nas diferentes demências com uso do $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$, contribuindo para o seu diagnóstico diferencial.

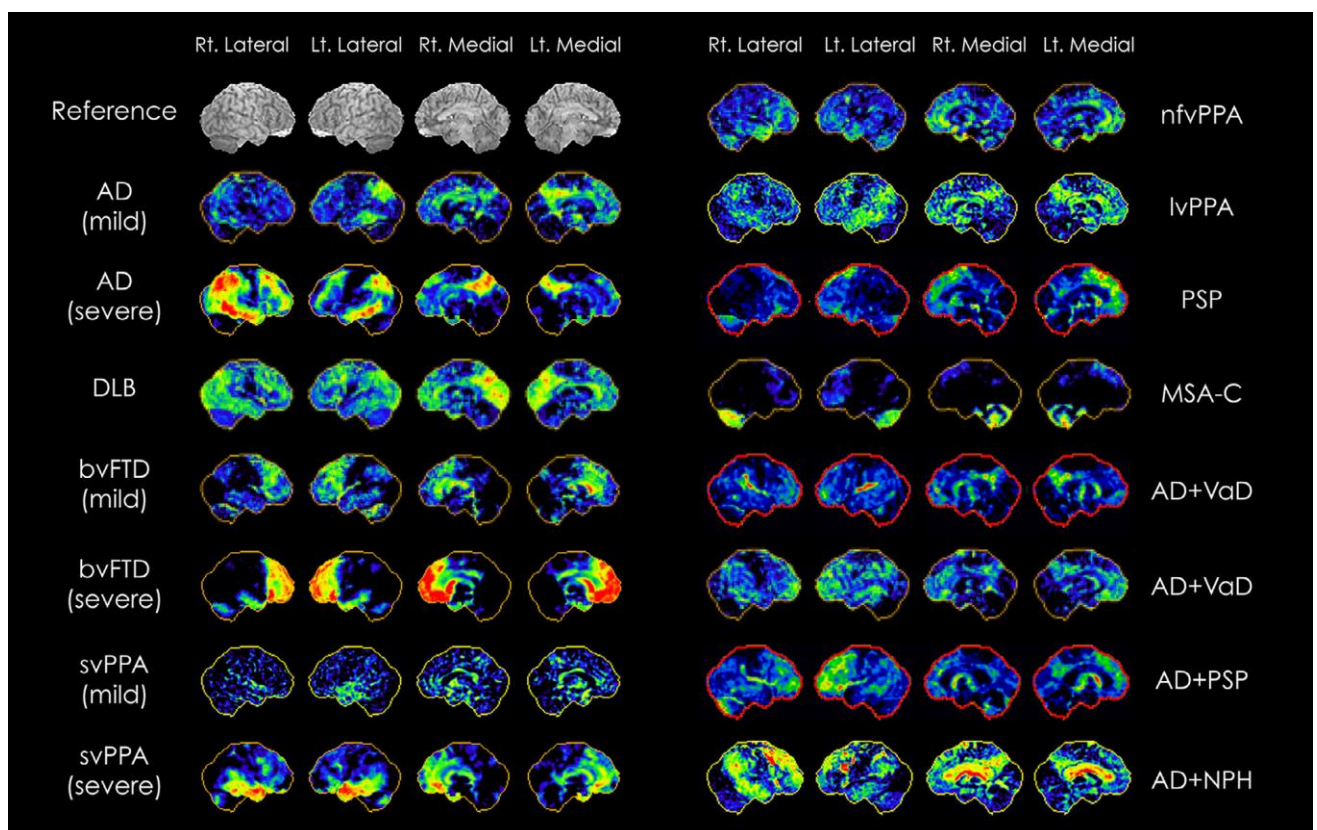


Figura 3. Padrões de mudança no metabolismo da glicose indexados por $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ em diferentes demências. Mapas de Z-score codificados em escala de cores demonstrando o padrão clássico de alteração no metabolismo de glicose cerebral exibido por diversos tipos de demência. Vistas lateral e medial dos hemisférios direito (R) e esquerdo (L) são mostradas. Doença de Alzheimer (DA); Demência com corpos de Lewy (DCB); Variante comportamental da demência frontotemporal (bvFTD); Afasia progressiva primária variante semântica (svPPA); Afasia progressiva primária variante não fluente (nfvPPA); Afasia progressiva primária variante logopênica (lvPPA); Paralisia supranuclear progressiva (PSP); Atrofia de múltiplos sistemas, tipo cerebelar (MSA-C); Demências mistas: DA+Demência Vascular (VaD); AD+PSP, DA+hidrocefalia de pressão normal (NPH). Fonte: (MINOSHIMA; MOSCI; CROSS; THIENTUNYAKIT, 2021)

No que diz respeito à interpretação dessa técnica a nível celular no encéfalo, presume-se que os sinais do [^{18}F]FDG-PET reflitam diretamente o uso de glicose pelos neurônios (SOKOLOFF; REIVICH; KENNEDY; DES ROSIERS *et al.*, 1977). Está interpretação se deve ao fato de que por muitos anos os neurônios têm sido amplamente considerados como os principais consumidores de energia no cérebro. Portanto, tomando novamente as demências como exemplo, o hipometabolismo de [^{18}F]FDG observado em determinadas regiões cerebrais nesse pacientes é frequentemente interpretado como um indicativo de disfunção ou morte neuronal (MORBELLI; GARIBOTTO; VAN DE GIESSEN; ARBIZU *et al.*, 2015).

A participação de outras células cerebrais para o sinal do [^{18}F]FDG-PET ainda é amplamente negligenciada. Um importante dilema, uma vez que, nos últimos 30 anos, a neurociência acumulou um grande número de fortes evidências corroborando uma importante contribuição de outros tipos celulares, como os astrócitos (PELLERIN; MAGISTRETTI, 2012), no metabolismo cerebral de glicose. O possível envolvimento e as implicações da contribuição dos astrócitos na captação de glicose para o exame de [^{18}F]FDG-PET e técnicas similares, como a autorradiografia com 2-desoxi-D-glicose, têm sido apontadas desde o início dos anos 90 (MAGISTRETTI; PELLERIN, 1996; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). No entanto, foram necessários mais de 20 anos para que essa teoria fosse finalmente colocada à prova na prática com o uso da técnica de [^{18}F]FDG-PET.

Em 2017 surgiram as primeiras evidências *in vivo* da contribuição dos astrócitos no sinal do [^{18}F]FDG-PET. Zimmer e colegas (ZIMMER; PARENT; SOUZA; LEUZY *et al.*, 2017) utilizaram ceftriaxona para estimular o transporte de glutamato nos astrócitos e observaram o efeito no metabolismo cerebral de glicose em roedores com uso do [^{18}F]FDG-microPET. A administração de ceftriaxona resultou em um claro aumento no sinal de [^{18}F]FDG (**Figura 4**). Além disso, uma abordagem *in vitro* utilizando culturas de astrócitos adultos tratados com ceftriaxona foi também empregada. Na captação de [^3H]2DG nas culturas de astrócitos observou-se que a ceftriaxona também causou um aumento na captação desse análogo de glicose, resultado semelhante ao visto *in vivo* com o [^{18}F]FDG-microPET. Simultaneamente, também se observou o aumento no transporte de glutamato nessas culturas.

Mais recentemente, dois estudos em pacientes com DA encontraram uma associação entre a reatividade astrocitária, verificada por meio de [^{11}C]deutério-L-

deprenil-PET ou níveis plasmáticos da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), e o metabolismo da glicose, via [^{18}F]FDG-PET (CARTER; CHIOTIS; NORDBERG; RODRIGUEZ-VIEITEZ, 2019; SALVADO; MILA-ALOMA; SHEKARI; ASHTON *et al.*, 2022).

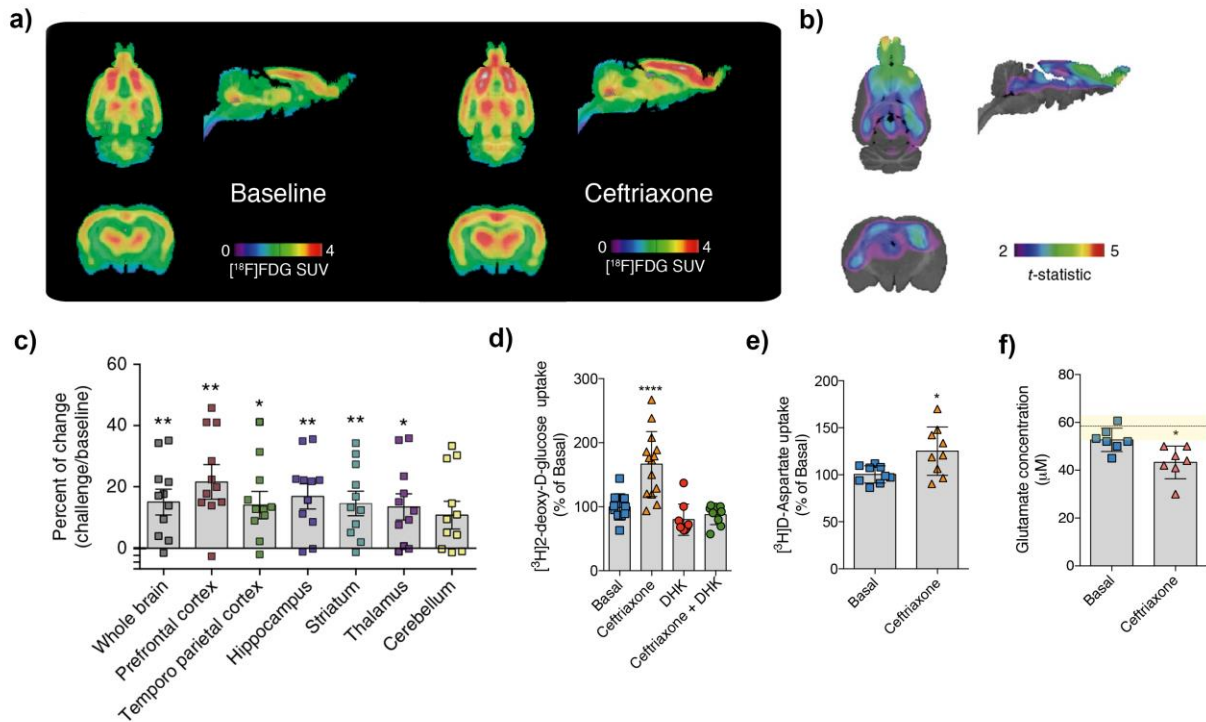


Figura 4. Efeitos do tratamento com ceftriaxona e da estimulação da captação de glutamato astrocitária nos resultados do [^{18}F]FDG-PET. Mapas cerebrais médios de [^{18}F]FDG-PET SUV antes (baseline) e após a administração de ceftriaxona (ceftriaxone) (a). Mapa estatístico T apresentando as regiões cerebrais onde houve diferença significativa no [^{18}F]FDG-PET entre os grupos baseline e ceftriaxona (b). Gráfico apresentando o percentual de mudança no [^{18}F]FDG-PET SUV médio regional entre os grupos baseline e ceftriaxona em diferentes regiões cerebrais (c). Gráfico apresentando os resultados da captação de 2-desoxi-D-glicose em culturas astrocitárias controle, que receberam tratamento com ceftriaxona e/ou dihidrocainato (DHK, inibidor da captação de glutamato astrocitária) (d). Gráfico apresentando os resultados da captação de D-aspartato (índice da captação de glutamato) em culturas astrocitárias controle ou que receberam tratamento com ceftriaxona (e). Gráfico apresentando a concentração de glutamato no meio de cultura das dos astrócitos controle ou que receberam tratamento com ceftriaxona (f). Valor de captação padronizado (SUV). Fonte: (ZIMMER; PARENT; SOUZA; LEUZY *et al.*, 2017)

Em resumo, estes trabalhos apresentaram as primeiras evidências in vivo da contribuição dos astrócitos no sinal do [^{18}F]FDG-PET. Desde então, outras pesquisas têm sido realizadas para investigar a possível contribuição de outros tipos celulares cerebrais neste exame. Por exemplo, mais recentemente, Brendel e colegas observaram evidências de que as células microgliais também podem estar contribuindo para o sinal do [^{18}F]FDG-PET (XIANG; WIND; WIEDEMANN; BLUME *et al.*, 2021) e sugerem que esta participação pode ser particularmente aumentada em patologias que apresentam um forte componente inflamatório, como a DA.

Ainda não há um consenso sobre a origem celular do sinal cerebral do [¹⁸F]FDG-PET. Há, sem dúvidas, importantes evidências corroborando a hipótese de que os células astrocitárias, e mais recentemente, células microgliais, desempenham um papel importante na captação e metabolismo da glicose (CARTER; CHIOTIS; NORDBERG; RODRIGUEZ-VIEITEZ, 2019; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015; NEHLIG; COLES, 2007; PELLERIN; MAGISTRETTI, 2012; XIANG; WIND; WIEDEMANN; BLUME *et al.*, 2021; ZIMMER; PARENT; SOUZA; LEUZY *et al.*, 2017). No entanto, existem também fortes argumentos corroborando a hipótese de que contribuição das células gliais é mínima e que a maior parte da captação e metabolismo de glicose ocorre em neurônios (DIENEL, 2013; 2017; 2019; HERTZ, 2004; TANG, 2018).

Por enquanto, a interpretação mais aceita ainda é a de que o metabolismo de glicose no cérebro e, conseqüentemente, o sinal do [¹⁸F]FDG-PET, são principalmente derivados da atividade sináptica neuronal, com envolvimento mínimo das células gliais (MOSCONI, 2013). Ao mesmo tempo, por participarem da sinapse tripartida, os astrócitos parecem estar sendo gradualmente inseridos na interpretação sináptica do metabolismo de glicose cerebral (STOESSL, 2017). Permanece em debate se uma disfunção de origem astrocitária ou de outras células gliais poderia influenciar esse processo.

1.4 O sistema glutamatérgico

O sistema glutamatérgico é uma intrincada rede de neurônios que utiliza o aminoácido glutamato como principal neurotransmissor. O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) de vertebrados (ORREGO; VILLANUEVA, 1993; PLATT, 2007). Sua importância na sinalização cerebral é tão extensa que frequentemente o encéfalo é referido como uma máquina Glutamato/GABA (SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012) sendo o GABA o principal neurotransmissor inibitório. Além de ser responsável por grande parte da neurotransmissão excitatória, o glutamato também parece ser o principal mediador de informações sensoriais, cognitivas, motoras e emocionais (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; DINGLELINE; BORGES; BOWIE; TRAYNELIS, 1999; OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998). Estima-se que cerca de 70-80% das sinapses do

encéfalo em mamíferos sejam glutamatérgicas (FAIRMAN; AMARA, 1999; WATKINS; EVANS, 1981).

Essencialmente, o glutamato é sintetizado a partir de um esqueleto de carbono, derivado direta ou indiretamente, da molécula de glicose em conjunto com doadores do grupo amino, como outros aminoácidos, amônia ou nucleotídeos. Uma das principais fontes de glutamato no encéfalo parece ser a glutamina, que é convertida em glutamato pela ação da glutaminase ativada por fosfato (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006). O glutamato produzido é então armazenado em vesículas sinápticas por meio dos transportadores vesiculares de glutamato (vGLUTs) e pode ser liberado dos terminais pré-sinápticos através de um mecanismo dependente de cálcio (ANDERSON; SWANSON, 2000; BIRNBAUMER; CAMPBELL; CATTERALL; HARPOLD *et al.*, 1994).

Após ser liberado na fenda sináptica, o glutamato é capaz de se ligar a receptores pré- e pós-sinápticos ou ser captado pelos transportadores de glutamato presentes em células gliais ou neuronais. O glutamato exerce sua ação basicamente em duas classes de receptores: ionotrópicos (canais iônicos) e metabotrópicos (acoplados à proteína G). A classe de receptores ionotrópicos, por sua vez, é dividida em três tipos: receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e receptores de cainato. Os oito receptores metabotrópicos identificados também são subdivididos em três tipos, com base na homologia de suas sequências, no segundo mensageiro e na farmacologia (KEW; KEMP, 2005).

Um importante ponto do sistema glutamatérgico a ser mencionado, é o de que as concentrações de glutamato no espaço extracelular são baixas e rigorosamente controladas. Até o momento, não foram identificadas enzimas capazes de realizar a degradação do glutamato extracelular. Portanto, um fenômeno de extrema importância no sistema glutamatérgico é a recaptação do glutamato liberado na fenda sináptica pelos astrócitos. Desequilíbrios nesse sistema regulatório podem ter efeitos prejudiciais, induzindo hiperexcitabilidade e excitotoxicidade em neurônios pós-sinápticos (CHOI, 1994; DOBLE, 1999), ou interferindo na sinalização glutamatérgica ao alterar a relação sinal-ruído necessária para uma sinalização específica. Outro ponto relevante na captação de glutamato é a economia, uma vez que o glutamato

coletado é, em sua maior parte, reciclado através do ciclo glutamina-glutamato (DANBOLT; FURNESS; ZHOU, 2016).

A captação de glutamato é realizada pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). Esse processo constitui uma importante fonte de gasto de energia cerebral, pois está acoplado ao transporte de íons (H^+ , Na^+ e K^+) e à manutenção de um gradiente eletroquímico (SILVER; ERECINSKA, 1997). Até o momento, foram identificados cinco tipos distintos de EAATs em mamíferos: GLAST (Transportador de Glutamato-Aspartato, também conhecido como EAAT1), GLT-1 (transportador de glutamato 1, também conhecido como EAAT2), EAAC1 (transportador de aminoácidos excitatórios 1, também conhecido como EAAT3), EAAT4 (transportador de aminoácidos excitatórios 4) e EAAT5 (transportador de aminoácidos excitatórios 5) (TANAKA, 2000).

Os cinco tipos de transportadores de glutamato são expressos de maneira diferencial em regiões distintas do encéfalo e tipos de células. Em relação à expressão celular dos transportadores, o GLT-1 é encontrado quase exclusivamente em astrócitos - com expressão neuronal rara em regiões específicas, como nas células piramidais da região CA3 do hipocampo; o GLAST está presente apenas em astrócitos; e o EAAC1, EAAT4 e EAAT5 são encontrados apenas em células neuronais, sendo que o EAAC1 é expresso apenas em soma e dendritos, mas não em axônios (DANBOLT; FURNESS; ZHOU, 2016).

Em termos da distribuição regional no SNC, o transportador EAAT5 é encontrado exclusivamente em células da retina (fotorreceptores e neurônios bipolares), enquanto o EAAT4 é expresso predominantemente no cerebelo (nas células de Purkinje), embora também esteja presente em alguns neurônios do prosencéfalo. Por outro lado, o EAAT3 é mais disperso, sendo encontrado na maioria dos neurônios no SNC (ZHOU; DANBOLT, 2013). Quanto aos transportadores astrocitários, o GLT-1 é encontrado em todo o cérebro, mas é significativamente mais abundante no córtex, hipocampo e estriado. Enquanto isso, o GLAST é o principal transportador no cerebelo, ouvido interno, retina, entre outras regiões.

No cerebelo, onde está mais concentrado, a expressão de GLAST é aproximadamente seis vezes maior do que a de GLT-1. Em contraste, no hipocampo, o GLT-1 é cerca de quatro vezes mais abundante do que GLAST (DANBOLT, 2001;

LEHRE; LEVY; OTTERSEN; STORM-MATHISEN *et al.*, 1995; VANDENBERG; RYAN, 2013; ZHOU; DANBOLT, 2013) (**Figura 5**).

Além de ser o transportador de glutamato mais abundante no encéfalo - representando 1% da proteína total cerebral - o GLT-1 é, de longe, o mais importante na captação de glutamato, sendo responsável por mais de 90% da captação desse neurotransmissor no encéfalo (HOLMSETH; SCOTT; REAL; LEHRE *et al.*, 2009).

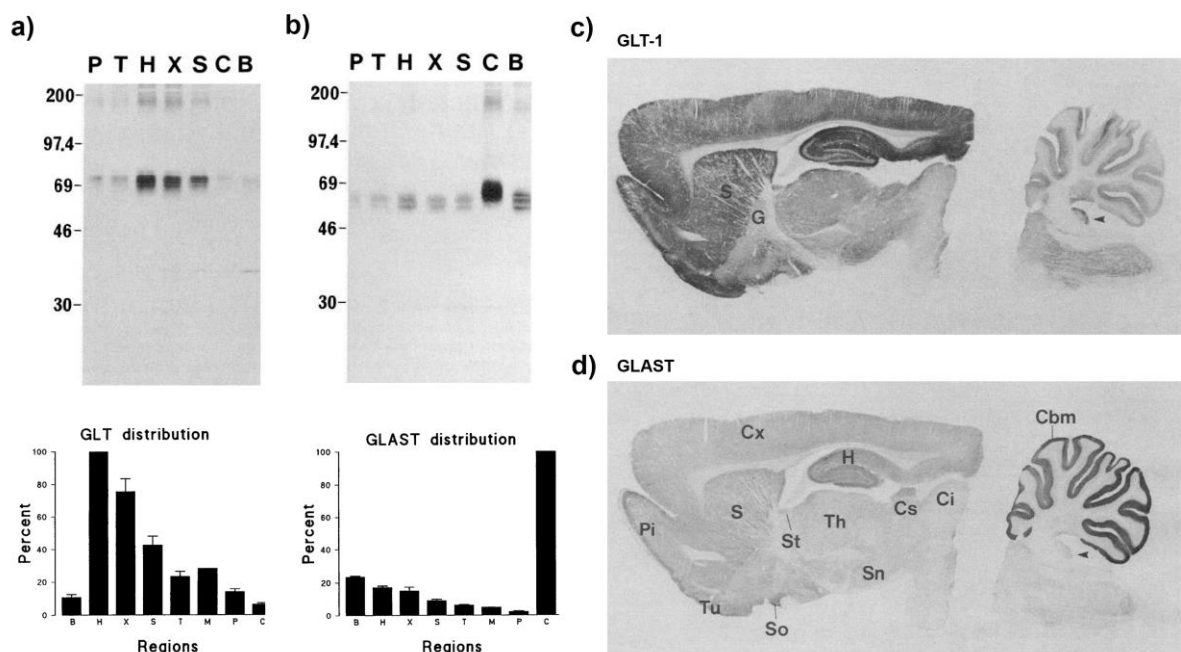


Figura 5. Distribuição encefálica dos transportadores de glutamato GLT-1 e GLAST em ratos. Imagens representativas e quantificação do *Western Blot* dos transportadores GLT-1 (a) e GLAST (b) em diferentes regiões do encéfalo de ratos. Regiões: P, ponte; T, tálamo/hipotálamo; H, hipocampo; X, córtex; S, estriado; C, cerebelo; B, bulbo olfatório. Imagens representativas de imunistoquímica dos transportadores GLT-1 (c) e GLAST (d) em fatias sagitais do encéfalo de ratos. Regiões: Pi, córtex piriforme; S, estriado; Tu, tubérculo olfatório; Cx, córtex; St, estria terminal; Th, tálamo; So, núcleo supra óptico; H, hipocampo; Sn, *substantia nigra*; Ci and Cs, colículo inferior e superior; Cbm, camada molecular cerebelar. Fonte: (LEHRE; LEVY; OTTERSEN; STORM-MATHISEN *et al.*, 1995)

1.4.1 Moduladores do transporte de glutamato astrocitário

Como mencionado, a captação de glutamato é uma função crucial na homeostase cerebral e é, majoritariamente, realizada por astrócitos, principalmente através do transportador GLT-1, mas também via GLAST. Ao longo dos anos, foram encontradas algumas moléculas capazes de alterar a expressão e função desses transportadores. Em termos de modulares positivos, uma revisão recente realizada por Fontana e colegas classifica as moléculas moduladoras positivas em três categorias: proteínas, moléculas endógenas e moléculas sintéticas/exógenas (FONTANA, 2015).

Na primeira categoria, encontramos um grupo de quinases, as quinases específicas de serina-treonina Akt (proteína quinase B), mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e GSK3 β (Glicogênio Sintase Quinase 3 β), e a quinase de tirosina JAK2 (Janus quinase 2). Todas mostraram efeitos potencializadores na expressão de GLT-1 (FONTANA, 2015).

Dentre as moléculas endógenas, encontramos hormônios, segundos mensageiros, metabólitos e um neurotransmissor: guanosina, fator de crescimento epidérmico (EGF), dBcAMP (dibutiril-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), corticosterona, retinol, estradiol e histamina. O dibutiril-cAMP é um análogo de AMP cíclico (cAMP) que ativa quinases dependentes de cAMP e é amplamente utilizado em culturas primárias de astrócitos neonatais para elevar a expressão de GLT-1 (FONTANA, 2015).

Por fim, alguns medicamentos e moléculas exógenas foram identificados como estimuladores do transporte de glutamato: o medicamento Riluzole, a toxina de aranhas Parawixin1, o corticosteroide Dexametasona, o anticonvulsivante Ácido valproico, os antibióticos Minociclina, Sulbactam e Ceftriaxona, entre outros. Dentro desse grupo, é importante mencionar a Ceftriaxona, cujo efeito específico sobre GLT-1 foi descrito pela primeira vez em 2005 (ROTHSTEIN; PATEL; REGAN; HAENGGELI *et al.*, 2005). Devido à sua especificidade cerebral, efeito significativo e fácil administração, a Ceftriaxona foi utilizada por Zimmer e colegas (ZIMMER; PARENT; SOUZA; LEUZY *et al.*, 2017) para testar os efeitos do transporte de glutamato astrocitário nos resultados do [^{18}F]FDG-PET.

A excitotoxicidade, causada pelo acúmulo excessivo de glutamato no espaço extracelular, é uma característica comum em diversos distúrbios neurológicos. Portanto, as moléculas mencionadas anteriormente e seus efeitos no transporte de glutamato são de extrema relevância, apresentando um potencial promissor na prevenção e tratamento dessas doenças. Muitas delas já demonstraram efeitos neuroprotetores em diversos estudos. Vale ressaltar que, entre essas moléculas, o medicamento Riluzol é o único até o momento aprovado para uso clínico (FONTANA, 2015).

Por outro lado, também foram descritos na literatura alguns inibidores do transporte de glutamato. Até o momento, não foram encontradas aplicações terapêuticas para essas moléculas, porém elas são de grande interesse para

abordagens experimentais que visam investigar a influência do sistema glutamatérgico em diversas funções cerebrais e distúrbios.

A lista de moduladores negativos do transporte de glutamato é relativamente pequena, representando menos da metade dos membros em comparação com a lista de moduladores positivos. Até o momento, foram identificados os seguintes compostos: Clozapina, Dihidrocainato (DHK), DL-TBOA (ácido dl-treo- β -benziloxiaspartato), β -THA (ácido dl-treo- β -hidroxiaspartato), L- β -TBOA (L- β -benzil-aspartato), PDC (L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxilato) e WAY-855 (3-amino-triciclo-heptano-1,3-dicarboxilato) (SONI; REDDY; KUMAR, 2014).

O DHK é um inibidor específico e competitivo do transportador GLT-1, sendo utilizado em pesquisas há décadas. Além de inibir a captação de glutamato, o DHK também apresenta efeitos nos receptores ionotrópicos de glutamato. No entanto, é importante ressaltar que a permeabilidade do DHK na barreira hematoencefálica (BBB) é muito baixa. Embora o DHK seja capaz de atravessar a BBB, as concentrações no cérebro são baixas após a administração sistêmica (GYNTHER; PETSALO; HANSEN; BUNCH *et al.*, 2015). Por esse motivo, em muitos estudos que utilizam o DHK, a administração por infusão intracerebroventricular é a rota escolhida para sua administração.

O β -THA e o PDC são bloqueadores de amplo espectro dos transportadores EAATs, com afinidade igual para GLT-1, GLAST e EAAT3. O PDC também apresenta efeitos depressores na transmissão sináptica excitatória (MAKI; ROBINSON; DICHTER, 1994). Já o L- β -TBOA é seletivo para EAAT3 (ESSLINGER; AGARWAL; GERDES; WILSON *et al.*, 2005). DL-TBOA e WAY-855 também são bloqueadores de amplo espectro dos EAATs, com efeitos em GLT-1, GLAST e EAAT3, mas apresentam maior afinidade por GLT-1 (SHIMAMOTO; LEBRUN; YASUDA-KAMATANI; SAKAITANI *et al.*, 1998), (DUNLOP; ELIASOF; STACK; MCILVAIN *et al.*, 2003). No entanto, WAY-855 é uma molécula bastante recente e, portanto ainda não foi amplamente caracterizada e utilizada em pesquisas.

Por fim, a clozapina é um medicamento antipsicótico atípico e o seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, mas já se observou que essa molécula apresenta baixa afinidade pelos receptores de dopamina D1, D2 e D4, pelos subtipos 2A, 2C, 6 e 7 dos receptores de serotonina (5-HT), pelos receptores histamínicos H1 e pelos receptores muscarínicos de acetilcolina (NAHEED; GREEN,

2001). Além disso, identificou-se que a clozapina é capaz de reduzir em até 60% a densidade e função de GLT-1 no córtex de ratos (MELONE; VITELLARO-ZUCCARELLO; VALLEJO-ILLARRAMENDI; PEREZ-SAMARTIN *et al.*, 2001).

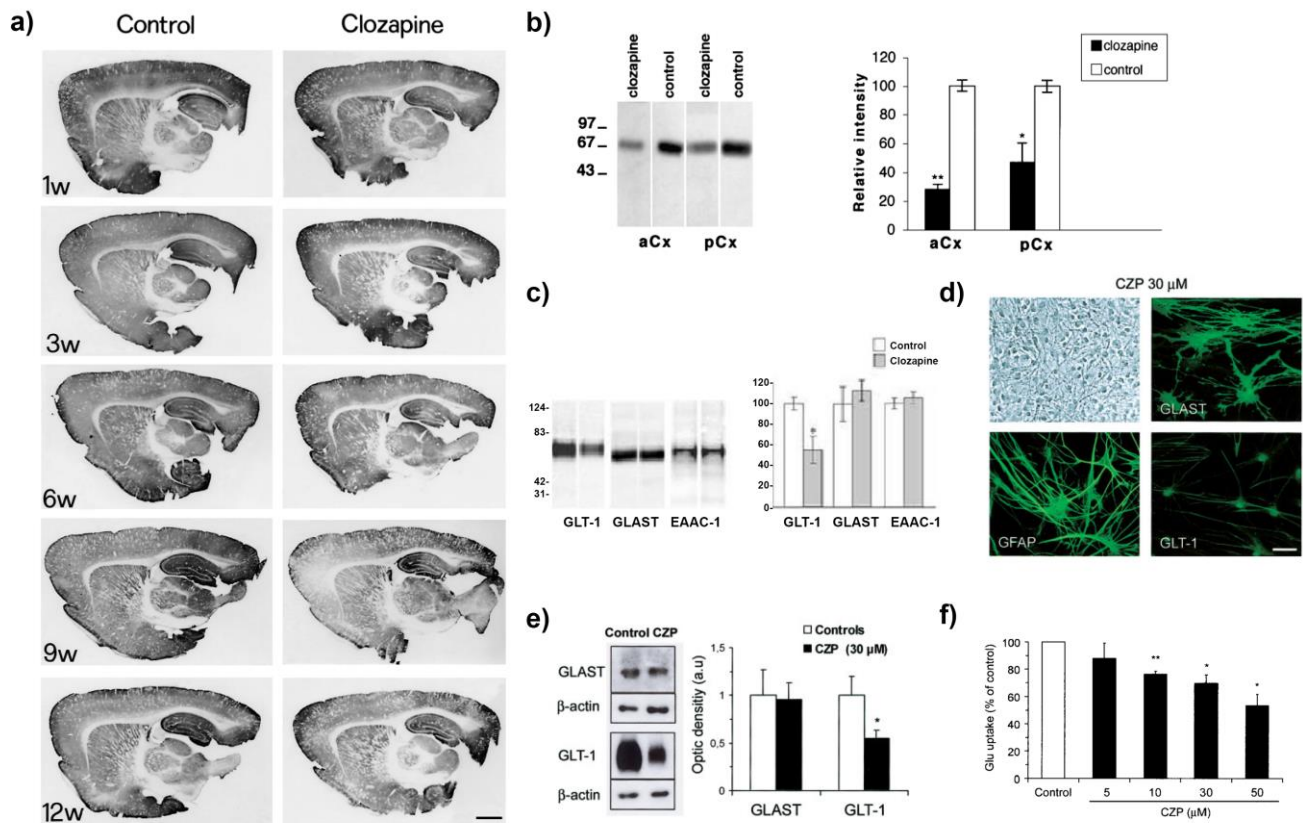


Figura 6. Efeitos da administração de clozapina nos níveis de GLT-1 e no transporte de glutamato. Imagens representativas de imunohistoquímica do transportador GLT-1 em fatias parasagittais do encéfalo de ratos tratados com clozapina por 1 semana (1w), 3 semanas (3w), 6 semanas (6w), 9 semanas (9w) e 12 semanas (12w) (a). Imagens representativas e quantificação do *Western Blot* do transportador GLT-1 no encéfalo de ratos tratados com clozapina por 9 semanas. Regiões: aCx, córtex anterior; pCx, córtex posterior (b). Imagens representativas e quantificação do *Western Blot* dos transportador GLT-1, GLAST e EAAC-1 na região cortical encefálica de ratos tratados com clozapina por 9 semanas (c). Imagens representativas de campo claro e imunofluorescência dos transportadores GLT-1 e GLAST, e do marcador astrocitário GFAP, em culturas de astrócitos tratadas com 30 mM de clozapina (d). Imagens representativas e quantificação do *Western Blot* dos transportadores GLT-1 e GLAST em culturas de astrócitos tratadas com 30 mM de clozapina (e). Resultados do ensaio de captação de [³H]-glutamato (dependente de Na⁺) em culturas de astrócitos tratadas com 5, 10, 30 ou 50 mM de clozapina (f). Fonte: (MELONE; VITELLARO-ZUCCARELLO; VALLEJO-ILLARRAMENDI; PEREZ-SAMARTIN *et al.*, 2001) (MELONE; BRAGINA; CONTI, 2003) (VALLEJO-ILLARRAMENDI; TORRES-RAMOS; MELONE; CONTI *et al.*, 2005)

Estudos subsequentes demonstraram que GLAST e EAAT3 não foram afetados pela clozapina, sugerindo que sua ação é mais específica em relação ao GLT-1 (MELONE; BRAGINA; CONTI, 2003). Além disso, o efeito da clozapina na densidade do GLT-1 e na captação de glutamato é replicado em culturas astrocitárias, sugerindo que essas células estão diretamente envolvidas nesse fenômeno (VALLEJO-ILLARRAMENDI; TORRES-RAMOS; MELONE; CONTI *et al.*, 2005). A **Figura 6** apresenta os principais resultados desses trabalhos investigando o efeito da clozapina nos transportadores e no transporte astrocitário de glutamato.

1.5 Astrócitos e a lançadeira de lactato

Os astrócitos são células gliais abundantes no cérebro e participam de diversas atividades importantes para a manutenção adequada da função cerebral. Essas células gliais participam na formação da barreira hematoencefálica (BBB) e da matriz extracelular, na regulação da homeostase iônica e química no ambiente extracelular, além de contribuírem para o desenvolvimento neuronal e para a plasticidade sináptica (MARKIEWICZ; LUKOMSKA, 2006; MONTGOMERY, 1994). A importância dos astrócitos no funcionamento cerebral tem sido cada vez mais reconhecida, à medida que novas interações e funções dessas células são descobertas a cada ano.

Na década de 1990, Pellerin e Magistretti foram responsáveis por propor uma nova contribuição astrocitária: o envolvimento dessas células no metabolismo de glicose cerebral. Pellerin e Magistretti observaram em culturas primárias de astrócitos que a presença do neurotransmissor glutamato estimula significativamente a captação de glicose e a liberação de lactato (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994) por estas células. Nesse trabalho seminal, eles identificaram que o glutamato estimula a glicólise aeróbica nos astrócitos e sugeriram que o lactato liberado é captado pelos neurônios, onde será utilizado pelas vias oxidativas para gerar energia ou em vias de biossíntese. É importante ressaltar que o efeito do glutamato nos astrócitos não foi inibido pelos antagonistas dos receptores de glutamato, mas sim por inibidores específicos dos transportadores de glutamato ou da Na^+, K^+ -ATPase. Indicando que o gatilho para o aumento da captação de glicose não é mediado pela ligação do glutamato a receptores, mas sim pelo transporte de glutamato e que seu efeito depende da Na^+, K^+ -ATPase. No ano seguinte, o efeito do glutamato na captação de glicose astrocitária foi replicado por outro importante grupo de pesquisa, que também avaliou a influência de variantes do gradiente eletroquímico no processo, observando novamente um papel importante para a Na^+, K^+ -ATPase e os canais de Na^+ (TAKAHASHI; DRISCOLL; LAW; SOKOLOFF, 1995).

A teoria baseada inicialmente nesses resultados é hoje chamada de "Lançadeira de Lactato Astrócito-Neurônio" (ANLS) (PELLERIN; PELLEGGRI; BITTAR; CHARNAY *et al.*, 1998), um esquema simplificado da ANLS pode ser encontrado na **Figura 7**. Nos últimos 29 anos, a existência da ANLS foi corroborada por novas evidências (BARROS; SAN MARTIN; RUMINOT; SANDOVAL *et al.*, 2020) além dos trabalhos iniciais de Pellerin, Magistretti, Takahashi e colegas.

Por exemplo, um trabalho mais recente, utilizando sensores de glicose baseados na Transferência de Energia por Ressonância de Forster (FRET), também observou que o glutamato age estimulando o aumento da captação de glicose e glicólise pelos astrócitos. Além disso, nesse trabalho verificou-se que o K^+ , assim como o glutamato liberado junto no disparo neuronal, também exerce o mesmo estímulo nos astrócitos. No entanto, o estímulo gerado K^+ é rápido e transitório, enquanto o estímulo gerado pelo glutamato tem um início mais tardio, porém mais duradouro (BITTNER; VALDEBENITO; RUMINOT; LOAIZA *et al.*, 2011).

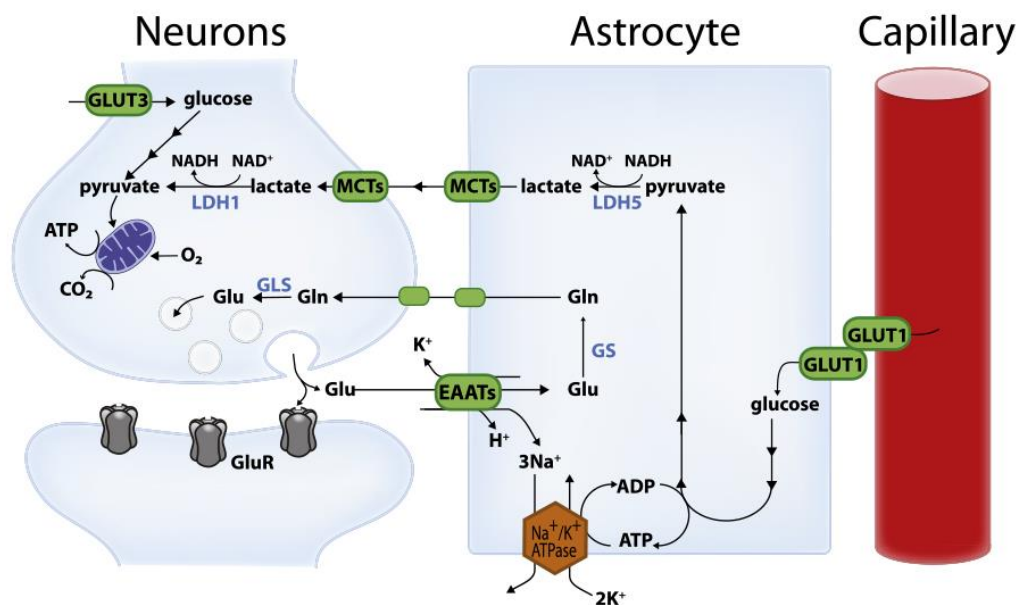


Figura 7. Lançadeira de Lactato Astrócito-Neurônio. Esquema representativo da ANLS demonstrado em uma sinapse tripartida. O glutamato (Glu) liberado na fenda sináptica pelo neurônio pré-sináptico pode agir nos receptores de glutamato (GluR) e/ou ser capturado pelo astrócito através dos transportadores de glutamato (EAATs). O transporte de glutamato pelos EAATs está acoplado ao transporte de íons Na^+ , H^+ e K^+ . A manutenção dos gradientes desses íons é realizada por uma bomba de Na^+/K^+ com gasto de ATP. O astrócito, localizado mais próximo ao vaso, captura glicose (transportador GLUT1) e utiliza essa molécula para gerar ATP por meio de um processo de glicólise aeróbica, gerando lactato. O lactato é liberado no meio extracelular pelos transportadores de monocarboxilato (MCTs). O lactato no meio extracelular pode ser capturado pelo neurônio também através dos MCTs. Uma vez dentro do neurônio, o lactato pode ser convertido em piruvato e oxidado para gerar energia. O neurônio também pode captar glicose (transportador GLUT3) diretamente e realizar a glicólise e oxidação dessa molécula para gerar energia. Fonte: (BELANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011)

O papel do transporte de glutamato como um gatilho para a captação de glicose em astrócitos também foi observado *in vivo*. Por exemplo, estudos que analisaram o metabolismo da $[^{14}C]$ -2-desoxiglicose ($[^{14}C]2DG$) em camundongos com *downregulation* de GLAST ou *knockout* para GLAST e GLT-1, observaram uma diminuição na resposta de captação de $[^{14}C]2DG$ à ativação somatossensorial (CHOLET; PELLERIN; WELKER; LACOMBE *et al.*, 2001; VOUTSINOS-PORCHE; KNOTT; TANAKA; QUAIRIAUX *et al.*, 2003). Além disso, um estudo utilizando

microscopia de dois fótons e o análogo de glicose 6-desoxi-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-aminoglicose em ratos verificou que a captação de glicose em astrócitos é aumentada em resposta à estimulação das vibrissas, enquanto a captação neuronal de glicose permanece inalterada (CHUQUET; QUILICHINI; NIMCHINSKY; BUZSAKI, 2010).

Ademais, Itoh e colaboradores investigaram o uso de glicose e lactato em culturas de astrócitos e neurônios. Nesses estudos as culturas neuronais oxidaram rapidamente tanto a glicose quanto o lactato, enquanto as culturas de astrócitos oxidaram os dois substratos moderadamente e metabolizaram a glicose predominantemente em lactato, corroborando a ANLS. Além disso, um aumento significativo na concentração de glicose no meio de cultura inibiu a oxidação do lactato pelos astrócitos, mas não pelos neurônios, indicando uma preferência pela oxidação do lactato nos neurônios (ITOH; ESAKI; SHIMOJI; COOK *et al.*, 2003).

Outro estudo importante corroborando a ANLS e a participação dos astrócitos na captação de glicose foi o trabalho realizado por Nehlig e colaboradores. Utilizando [¹⁴C]2DG e aplicando um procedimento de imagem microautoradiográfica combinado com imunohistoquímica, observou-se que os neurônios captaram apenas cerca da metade do [¹⁴C]2DG, enquanto aproximadamente 53% foi absorvido pelos astrócitos (NEHLIG; WITTENDORP-RECHENMANN; LAM, 2004).

Além de todas as observações funcionais que corroboram a ANLS, também existem evidências estruturais. Os astrócitos possuem prolongamentos enriquecidos em transportadores de glicose que se estendem aos vasos sanguíneos e os envolvem (DUELLI; KUSCHINSKY, 2001; LEINO; GERHART; VAN BUEREN; MCCALL *et al.*, 1997). Inclusive, um estudo recente identificou que quase todos os astrócitos da substância cinzenta têm contato direto com o sistema vascular (HOSLI; ZUEND; BREDELL; ZANKER *et al.*, 2022). Além disso, os astrócitos parecem ter participação na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (MACVICAR; NEWMAN, 2015). Dessa forma, a captação da glicose, que é entregue ao cérebro pelo sistema vascular, parece ser facilitada e favorecida nos astrócitos.

Por outro lado, também há uma grande quantidade de evidências e discussões contrárias à existência ou importância real do ANLS como um fenômeno *in vivo*. Por exemplo, em contraste com o estímulo do metabolismo glicolítico por glutamato em astrócitos proposto pela ANLS, um estudo observou um aumento, também

dependente de Na^+, K^+ -ATPase, nos processos oxidativos em culturas de astrócitos quando expostos ao glutamato (ERIKSSON; PETERSON; IVERFELDT; WALUM, 1995).

Em relação ao consumo de ATP no cérebro, um estudo, utilizando modelos matemáticos, estimou que no córtex cerebral de roedores a glia é responsável por apenas 5% do consumo de energia cerebral em sinalização, o qual é atribuído ao potencial de repouso glial, captação de glutamato e sua conversão em glutamina (ATTWELL; LAUGHLIN, 2001). É importante observar que esse valor está relacionado ao consumo de energia cerebral em tarefas de sinalização e, portanto, não inclui 25% de gasto energético estimados em "tarefas de manutenção" cerebral. É também relevante considerar que esse estudo adotou uma perspectiva oxidativa, negligenciando a possibilidade de que alguns processos possam ser predominantemente impulsionados pela glicólise. No entanto, modelar e estimar o uso de energia no cérebro é uma tarefa complexa e ainda não há consenso na literatura. Diferentes resultados foram calculados para regiões como o cerebelo (HOWARTH; PEPPIATT-WILDMAN; ATTWELL, 2010) e outros estudos propuseram valores mais altos para a função glial no córtex humano (LENNIE, 2003).

No que diz respeito ao transporte e consumo de lactato pelos neurônios, um conceito-chave na teoria da ANLS, alguns estudos também propuseram um consumo preferencial de glicose pelos neurônios, em detrimento do lactato (LUNDGAARD; LI; XIE; KANG *et al.*, 2015; PATEL; LAI; CHOWDHURY; HYDER *et al.*, 2014). Além disso, como bem lembrado por Morelli e Panfoli, o uso de grandes quantidades de lactato transportado para os neurônios exigiria grandes quantidades de NAD^+ , o que, em termos bioquímicos, pode ser problemático obter rapidamente e constantemente (BARROS; WEBER, 2018a).

Outro ponto sempre mencionado para refutar a ANLS é a existência de evidências de que o glutamato pode ser oxidado em astrócitos, fornecendo assim a energia necessária para sua própria captação (DIENEL, 2013; DIENEL; BEHAR; ROTHMAN, 2018; MCKENNA, 2013). Como consequência, propõe-se que um aumento na captação de glicose pelos astrócitos em resposta à captação de glutamato não seria necessário. No entanto, a ANLS não postula que aumento na captação de glicose em astrócitos em resposta ao glutamato ocorra para bancar o gasto energético da sua captação. Na realidade, a hipótese mais aceita para a

existência desse mecanismo foi apresentada por Barros e colegas em 2018. Assumindo uma perspectiva evolutiva, acredita-se a ANLS traria uma vantagem crucial para um tecido especializado como o cérebro: economia de oxigênio para os neurônios. Em uma situação de alta demanda energética cerebral, outras células, como os astrócitos, passariam a gerar energia sem uso de oxigênio, através da glicólise aeróbia, dessa forma, economizando oxigênio para os neurônios, células altamente especializadas e muito sensíveis ao estresse oxidativo (FERNANDEZ-MONCADA; RUMINOT; ROBLES-MALDONADO; ALEGRIA *et al.*, 2018).

Para considerações adicionais sobre o tema da ANSL, uma seção CrossTalk recentemente foi proposta no *The Journal of Physiology*, na qual um debate extraordinário sobre esse tema foi realizado por pesquisadores líderes na área (BAK; WALLS, 2018a; b; BARROS; WEBER, 2018a; b).

1.6 A importância de estudar doenças neurológicas

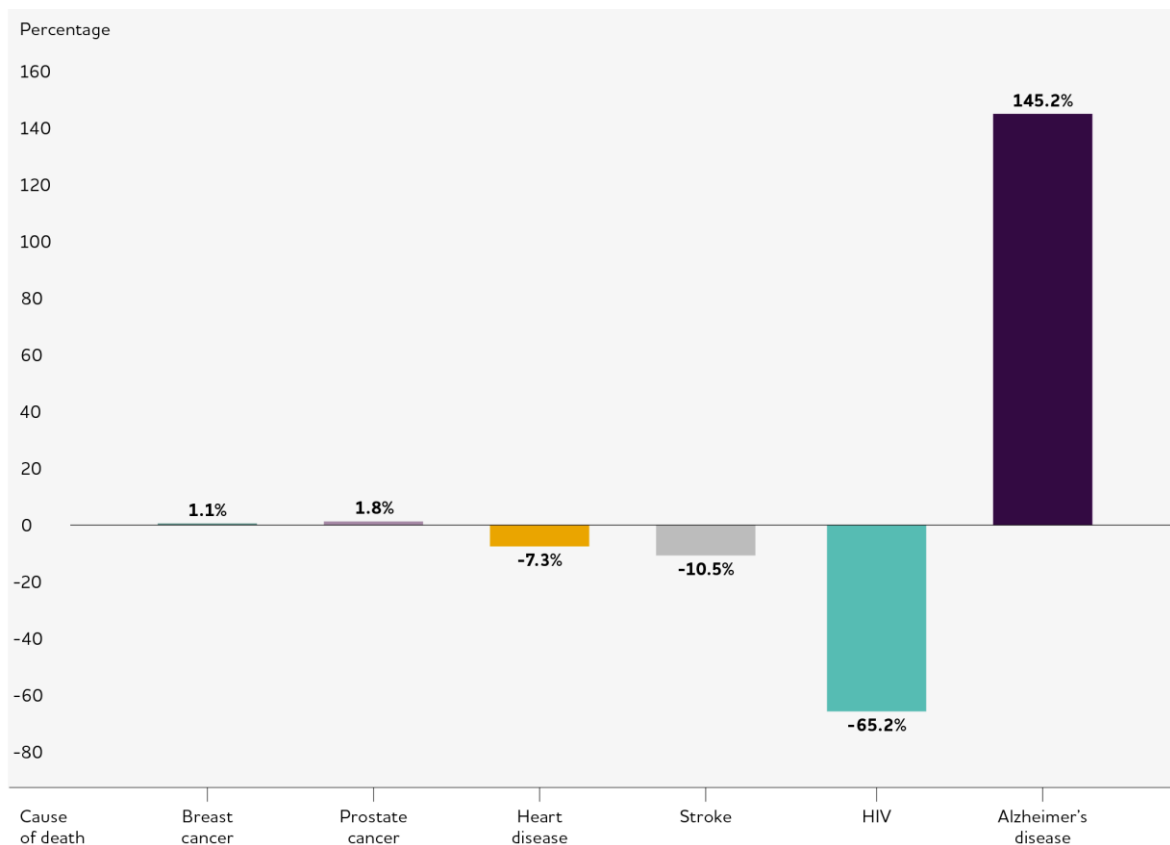
À medida que as taxas de natalidade diminuem e a expectativa de vida aumenta, a população mundial está alcançando um novo marco demográfico, a população com mais de 65 anos triplicará até o ano de 2050, atingindo mais de 1,5 bilhão de pessoas (WAN HE, 2016). Essa mudança demográfica já vem gerando um impacto substancial na saúde pública. No início do século XX, doenças infecciosas e parasitárias eram as causas de alta mortalidade. Neste século, as doenças que têm o maior impacto na saúde de adultos e idosos, com maior relevância social e econômica, são as doenças do sistema nervoso central (COLLABORATORS, 2019).

Os distúrbios neurológicos são fonte de sofrimento para um número crescente de indivíduos e famílias, e um fardo para a sociedade. Estudos epidemiológicos internacionais recentes mostram que os distúrbios neurológicos são a segunda principal causa de morte e a principal causa de incapacidade em todo o mundo. Entre os distúrbios neurológicos, a DA e outras demências ocupam a segunda posição tanto em termos de causas de incapacidade quanto de mortes, ficando atrás apenas dos distúrbios cerebrovasculares (FEIGIN; VOS; NICHOLS; OWOLABI *et al.*, 2020).

No entanto, o impacto das mudanças demográficas, entre outros fatores, parece ter sido maior nas demências do que nas doenças cerebrovasculares. Entre 1990 e 2016 ocorreu um aumento de 161% nas mortes atribuíveis à DA e outras demências. Já as incapacidades causadas por essas doenças aumentaram em 148%.

Comparativamente, as doenças cerebrovasculares tiveram um aumento de apenas 28% nas mortes e 22% nas incapacidades (COLLABORATORS, 2019). Ademais, o relatório “*Facts and Figures*” de 2023 divulgado pela Alzheimer's Association (ASSOCIATION, 2023) também compara outras principais causas de morte e a DA, mostrando um aumento de 145% para a DA, enquanto outras doenças, como HIV e acidente vascular cerebral, apresentaram reduções (**Figura 8**).

As diferenças mencionadas acima refletem não apenas as mudanças no diagnóstico da DA e outras demências ao longo dos anos, mas também evoluções na pesquisa biomédica. Com o avanço nas pesquisas, novos tratamentos médicos e políticas de saúde, visando prevenção e modificação de fatores de risco foram implementados. Essas modificações parecem ter sido eficazes na redução e melhor manejo de outras doenças importantes, mas não tanto para as demências.



Created from data from the National Center for Health Statistics.

Figura 8. Mudanças percentuais nas causas de morte entre 2000 e 2019 nos Estados Unidos. Fonte: Alzheimer's Disease Facts and Figures Report (ASSOCIATION, 2023; LEE; CHO; RYU, 2021).

Esse progresso lento é resultado de diversos fatores, incluindo a complexidade do estudo do encéfalo, que é frequentemente desafiador, e, por consequência, a

dificuldade em compreender a fisiopatologia das demências. Apesar dos esforços contínuos de pesquisa, os principais desencadeadores e mecanismos fisiopatológicos específicos dessas doenças ainda não são plenamente compreendidos. Isso ressalta a importância contínua da pesquisa nessas doenças.

1.6.1 A doença de Alzheimer

Dentre as causas de demência, a DA é a mais prevalente, afetando atualmente cerca de 55 milhões de pessoas em todo o mundo, e estima-se que esse número aumente para 139 milhões até 2050 (GAUTHIER S, 2022). A DA se manifesta como um distúrbio neurodegenerativo progressivo e irreversível, apresentando deterioração cognitiva grave. Os sintomas iniciais da DA costumam incluir perda de memória recente, dificuldade em realizar tarefas cotidianas, desorientação temporal e espacial, alterações de humor e personalidade, bem como dificuldades na linguagem. À medida que a doença progride, os pacientes experimentam uma deterioração cada vez mais acentuada das funções cognitivas, o que resulta em uma significativa perda de autonomia e dependência total de cuidados.

A DA pode ocorrer em duas formas distintas: a forma familiar e a forma esporádica. A forma familiar, também conhecida como DA de início precoce, é menos comum (por volta de 1% dos casos) e está associada a mutações genéticas hereditárias autossomais dominantes específicas. Por outro lado, a forma esporádica, que representa a grande maioria dos casos, ocorre sem uma causa genética direta conhecida. Embora a causa exata da DA esporádica ainda seja objeto de extensa investigação científica, evidências sugerem que uma combinação de fatores genéticos, ambientais e estilo de vida, bem como, o processo de envelhecimento, contribuem para o seu desenvolvimento (MASTERS; BATEMAN; BLENNOW; ROWE *et al.*, 2015; MUSIEK; HOLTZMAN, 2015).

A DA é caracterizada por duas características neuropatológicas específicas: a deposição do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) nas placas amiloides/senis no espaço extracelular cerebral; e a deposição de emaranhados neurofibrilares (NTFs) de proteína TAU hiperfosforilada nos corpos celulares de neurônios (**Figura 9a**). Ademais, a DA apresenta extensa disfunção sináptica, distúrbios no controle energético cerebral, reatividade astrocitária, neuroinflamação, disfunção vascular, morte progressiva de células cerebrais e atrofia cerebral, entre outras características (SCHELTENS; BLENNOW; BRETELER; DE STROOPER *et al.*, 2016)

Entre os desafios para a compreensão da patogênese da DA, e de outras doenças neurológicas, está a dificuldade em examinar o encéfalo in vivo e determinar biomoléculas relacionadas à sua função. Ao contrário de órgãos periféricos, onde a coleta de biópsias de tecido ou a quantificação de biomarcadores em amostras de tecido ou fluidos podem ser mais facilmente realizadas, o exame do encéfalo e a obtenção de seus biomarcadores é muito mais complexo. Como consequência, por muitas décadas, o campo de pesquisa da DA baseou-se em observações de tecido post-mortem, restringindo as descobertas da DA a observações pontuais e desconectadas de um processo contínuo e longo de degeneração cerebral, como "frames" de um "filme longa-metragem".

Felizmente, nas últimas duas décadas, o desenvolvimento de radiofármacos para PET capazes de detectar in vivo de forma não invasiva as alterações no metabolismo da glicose, a deposição de A β e da TAU hiperfosforilada e as respostas neuroinflamatórias, revolucionou o entendimento dessa patologia. Como resultado, atualmente podemos acompanhar longitudinalmente as principais modificações patológicas, quantificá-las e localizá-las espacialmente no encéfalo dos pacientes com DA.

As placas de A β e os NTFs se espalham no encéfalo à medida que a doença progride. Temporalmente, deposição de A β precede as alterações neurofibrilares e neuronais e, em casos típicos de DA, tem uma origem aparente nos lobos frontal e temporal, hipocampo e sistema límbico (**Figura 9b, superior**). Os NTFs e a degeneração neuronal começam nos lobos temporais médios e no hipocampo e se espalham progressivamente para outras áreas do córtex cerebral (**Figura 9b, inferior**). A deposição dos NTFs, as alterações sinápticas e a degeneração neuronal estão mais intimamente relacionadas as alterações cognitivas que a deposição de placas de A β (MASTERS; BATEMAN; BLENNOW; ROWE *et al.*, 2015)

Outro avanço significativo para a DA ocorreu nas tecnologias de quantificação de biomarcadores em fluidos, começando com a detecção de biomarcadores da DA no líquido cefalorraquidiano (LCR) e, mais recentemente, com um foco crescente na detecção de biomarcadores no sangue. Estudos recentes têm apontado que o diagnóstico da DA usando biomarcadores sanguíneos pode ser realizado com valores próximos a 96% de precisão (PALMQVIST; JANELIDZE; QUIROZ; ZETTERBERG *et al.*, 2020).

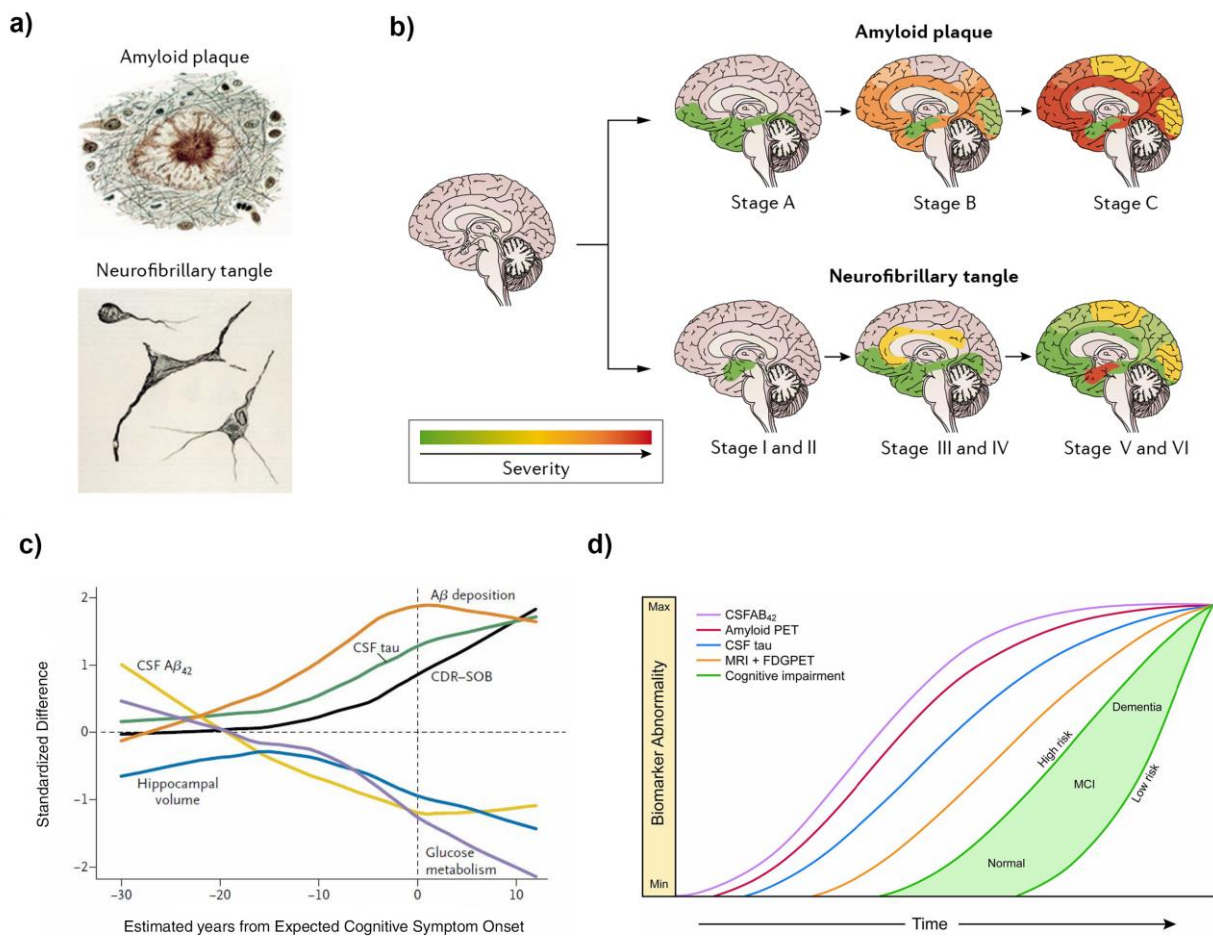


Figura 9: Marcadores histopatológicos e evolução têmporo-espaical da Doença Alzheimer. Imagens ilustrativas dos marcadores histopatológicos da DA: placas de amiloide/senis (depósitos de $A\beta$) e NTFs (depósitos de TAU hiperfosforilada) **(a)**. Imagens representativas da evolução espaciotemporal e de severidade dos dois principais marcadores histopatológicos da DA (placas de $A\beta$ e NTFs de Tau) no encéfalo **(b)**. Gráfico apresentando a evolução temporal das principais alterações patológicas da DA verificadas por exames de imagem (volume hipocampal via ressonância magnética, deposição de $A\beta$ via amiloide-PET, metabolismo de glicose via FDG-PET), biomarcadores de biofluidos (níveis de $A\beta$ e tau no líquido cefalorraquidiano) ou exames cognitivos (escala CDR), indicando que estas iniciam entre 30 e 20 anos antes do sintomas cognitivos **(c)**. "Curva de Jack": Modelo teórico mais amplamente aceito que representa as mudanças dinâmicas nos biomarcadores da DA em função da sua evolução temporal, demonstrando que os biomarcadores se tornam anormais de maneira ordenada no tempo. Fonte: (MASTERS; BATEMAN; BLENNOW; ROWE *et al.*, 2015) e (JACK; KNOPMAN; JAGUST; PETERSEN *et al.*, 2013; LEE; CHO; RYU, 2021).

Os avanços mencionados têm melhorado drasticamente o diagnóstico e o entendimento da DA. Por exemplo, descobriu-se que a patogênese da DA tem início no cérebro dos pacientes mais de 20 anos antes dos sintomas cognitivos aparecerem **(Figura 9c)**. As recentes evidências também já permitem a criação de modelos postulando a ordem temporal com que os biomarcadores se tornam anormais **(Figura 9d)** (JACK; KNOPMAN; JAGUST; PETERSEN *et al.*, 2013). A "curva de Jack", como ficou popularmente conhecida, ordena as principais alterações patofisiológicas identificadas até o momento da DA na seguinte sequência: 1) alterações nos níveis de $A\beta$ no LCR e sua deposição no tecido cerebral na forma de placas; 2) alterações

nos níveis de tau no LCR e sua deposição no tecido cerebral na forma de NTFs; 3) redução no metabolismo de glicose cerebral e perda de volume cerebral em regiões específicas; 4) redução na capacidade cognitiva.

A DA agora é reconhecida como um *continuum* que abrange várias fases. Inicialmente, existe a fase pré-clínica, na qual alterações patológicas começam a se acumular no cérebro, mas sem a presença de sintomas. À medida que a doença progride, inicia-se a fase de comprometimento cognitivo leve (CCL), na qual o indivíduo apresenta alterações cognitivas objetivas sutis, mas que ainda não interferem significativamente em suas atividades diárias. Nessa fase, os sintomas podem ser negligenciados ou atribuídos ao envelhecimento normal, dificultando o diagnóstico precoce. Finalmente, chega-se às fases sintomática da DA. Nessa etapa, os sintomas característicos, como perda de memória, desorientação e alterações de personalidade, se tornam evidentes e afetam significativamente a qualidade de vida do indivíduo. Compreender esse *continuum* tem sido crucial para o entendimento da doença, para intervenções precoces e para pesquisas em busca de tratamentos mais eficazes.

No entanto, em comparação à grande evolução na compreensão e no diagnóstico da DA, a busca por tratamentos eficazes ainda tem sido bastante lenta e infrutífera. Apesar de tentativas promissoras recentes e dois novos medicamentos aprovados, ainda não foi confirmada a existência de um tratamento capaz de impedir a progressão da DA. O número de ensaios clínicos investigando tratamentos para a DA que fracassaram já ultrapassou os quatrocentos. Os poucos medicamentos disponíveis para a DA são capazes apenas de amenizar os sintomas por um período, sem capacidade de prevenir, reverter ou mesmo retardar o progresso da doença. Para corrigir essa situação, é essencial entender melhor os mecanismos bioquímicos subjacentes às perturbações patológicas observadas nessa doença (KHOURY; PATEL; GOLD; HINDS *et al.*, 2017).

1.6.1.1 O diagnóstico da Doença de Alzheimer

O diagnóstico clínico da DA tem sido historicamente desafiador, pois muitas vezes é difícil distinguir seus sintomas iniciais de simples lapsos de memória relacionados ao envelhecimento normal ou diferenciá-la de outras demências, como as demências frontotemporais. No entanto, avanços recentes no campo da neurociência e da medicina têm levado a uma mudança fundamental no diagnóstico

da DA, passando de um diagnóstico clínico cognitivo (MCKHANN; DRACHMAN; FOLSTEIN; KATZMAN *et al.*, 1984) para um diagnóstico biológico (JACK; BENNETT; BLENNOW; CARRILLO *et al.*, 2018).

O diagnóstico tradicional da DA dependia de uma avaliação clínica cuidadosa dos sintomas cognitivos apresentados pelo paciente. Avaliações neuropsicológicas, como o *Mini-Mental State Examination* (MMSE) e o *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA), são utilizados para avaliar a presença e a gravidade desses sintomas. No entanto, essa abordagem clínica tem suas limitações, uma vez que os sintomas cognitivos têm início mais tardio no *continuum* da DA, podem variar consideravelmente entre os indivíduos e podem ser influenciados por outros fatores, como nível de educação, presença de outras patologias e estado emocional. Sendo assim, o diagnóstico clínico cognitivo tradicional só poderia ser confirmado definitivamente com uma avaliação histológica *post-mortem*.

Com os avanços tecnológicos e na compreensão da DA, biomarcadores específicos que pudessem auxiliar no desenvolvimento de diagnóstico precoce e mais preciso passaram a ser explorados. Essa nova abordagem possibilita não apenas um diagnóstico mais assertivo ainda em vida, mas também em estágios mais precoces, mesmo em indivíduos assintomáticos em fase pré-clínica. Permitindo, dessa forma, pesquisas e intervenções terapêuticas em estágios mais iniciais da doença, proporcionando maiores chances de sucesso.

Os primeiros estudos sugerindo uso de biomarcadores para auxiliar no diagnóstico da DA surgiram entre o final da década de 70 e meados da década de 80. Alterações de volume em regiões cerebrais específicas, como o córtex temporal e, depois, o hipocampo, foram detectadas com o uso da tomografia computadorizada (DE LEON; FERRIS; BLAU; GEORGE *et al.*, 1979; DE LEON; GEORGE; STYLOPOULOS; SMITH *et al.*, 1989). Posteriormente, o uso da tomografia computadorizada para verificar atrofia cerebral na DA foi substituído pelo uso da ressonância magnética (DUBOIS; FELDMAN; JACOVA; DEKOSKY *et al.*, 2007), que é capaz de gerar imagens com maior resolução.

O segundo biomarcador identificado foi o [¹⁸F]FDG-PET (FERRIS; DE LEON; WOLF; FARKAS *et al.*, 1980) com a observação da ocorrência de hipometabolismo cerebral de glicose nesses pacientes. Essa redução no metabolismo do [¹⁸F]FDG-PET tem sido atribuída a disfunção neuronal que ocorre nessa patologia. No entanto, pelos

custos altos associados a produção de radiofármacos, o $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET demorou algumas décadas para ser utilizado em ampla escala na clínica. Felizmente, a aplicabilidade do $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET na detecção do câncer acabou incentivando a difusão dessa técnica. Dessa forma, o $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET passou a ser efetivamente utilizado na

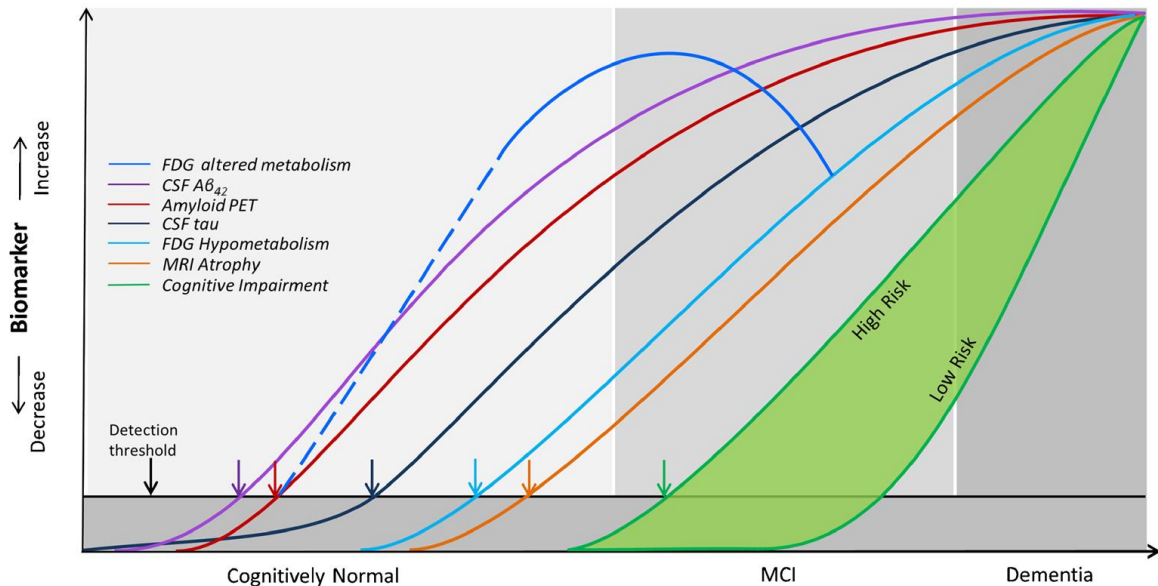


Figura 10: Alterações propostas na curva de metabolismo de glicose cerebral no modelo teórico da DA. Inclusão de um possível novo período de alteração no metabolismo de glicose cerebral no modelo teórico de evolução temporal da DA. Fonte: modificado de (ASHRAF; FAN; BROOKS; EDISON, 2015; KIM; CHAE; LEE; CHROMY *et al.*, 2003)

clínica para o diagnóstico de DA e outras demências no início dos anos 2000 (DUBOIS; FELDMAN; JACOVA; DEKOSKY *et al.*, 2007). Interessantemente, estudos recentes têm apontado também a existência de um outro período de significativas alterações no metabolismo de glicose cerebral na DA verificado pelo $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET, que ocorreria em uma fase mais inicial da doença, ainda no estágio pré-clínico ou prodromal (ASHRAF; FAN; BROOKS; EDISON, 2015; BENZINGER; BLAZEY; JACK; KOEPPE *et al.*, 2013; RUBINSKI; FRANZMEIER; NEITZEL; EWERS *et al.*, 2020) (**Figura 10**). Ainda estão em andamento investigações para determinar se essas alterações metabólicas precoces ocorrem de maneira consistente em todos os casos da DA, bem como para compreender as causas subjacentes desse achado.

No início da década de 90 surgiram também os primeiros biomarcadores da DA em fluídos. Investigações do LCR de pacientes com DA identificaram redução nos níveis de Aβ₁₋₄₂ (forma do peptídeo com 42 aminoácidos) e elevação nos níveis da proteína tau total (t-tau) (MOTTER; VIGO-PELFREY; KHOLODENKO; BARBOUR *et al.*, 1995; VANDERMEEREN; MERCKEN; VANMECHELEN; SIX *et al.*, 1993). Nos

anos seguintes, novos biomarcadores e combinações de biomarcadores no LCR foram testados, como níveis de $A\beta_{1-40}$, de $A\beta_{1-38}$ e de tau fosforilada (p-tau). Por fim, os mais aceitos e que passaram a serem utilizados amplamente na prática clínica para auxiliar no diagnóstico da DA foram os seguintes: redução em $A\beta_{1-42}$; redução na razão $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$; elevação de t-tau; elevação de p-tau, elevação da razão de tau/p-tau (DUBOIS; FELDMAN; JACOVA; DEKOSKY *et al.*, 2007; DUBOIS; FELDMAN; JACOVA; HAMPEL *et al.*, 2014; FRISONI; WINBLAD; O'BRIEN, 2011).

A área de neuroimagem não ficou para trás, e no início dos anos 2000 inovações nesse campo passaram a surgir, iniciando com a descoberta do primeiro radiofármaco de PET capaz de marcar as placas de amiloide, o [^{11}C]Pittsburgh Compound-B (KLUNK; ENGLER; NORDBERG; WANG *et al.*, 2004). Hoje, existe uma série de radiofármacos de PET aprovados por agências regulatórias internacionais para marcar as placas de amiloide. No Brasil, desde setembro de 2022, o radiofármaco [^{18}F]florbetabeno está aprovado como para a detecção de placas de amiloide em pacientes com características clínicas da DA. Mais recentemente, radiofármacos capazes de marcar os depósitos da proteína Tau, bem como, marcadores de neuroinflamação e reatividade astrocitária, também foram desenvolvidos e estão começando a ser utilizados na pesquisa clínica (BAO; XIE; ZUO; GUAN *et al.*, 2021). No entanto, o uso clínico desses radiofármacos ainda não é aprovado em muitos países e o seu uso até o momento não é tão difundido quanto o do [^{18}F]FDG-PET.

Por fim, o mais recente desenvolvimento na área de diagnóstico da DA são os biomarcadores plasmáticos. Os mais promissores até o momento incluem a proteína tau fosforilada em sítios específicos (p-tau181, p-tau217, p-tau231) (LEUZY; JANELIDZE; MATTSSON-CARLGREN; PALMQVIST *et al.*, 2021) e o marcador astrocitário GFAP (BENEDET; MILA-ALOMA; VRILLON; ASHTON *et al.*, 2021). Entretanto, novos marcadores, como proteínas sinápticas e microgliais, têm sido investigados (KLYUCHEREV; OLSZEWSKI; SHALIMOVA; CHUBAREV *et al.*, 2022).

1.6.1.2 As espécies da proteína β -amiloide

A hipótese mais aceita sobre o desenvolvimento e causas da DA surgiu em 1992, conhecida como hipótese da cascata amiloide. Essa hipótese inicialmente postulava que a neurodegeneração na DA era causada pelo acúmulo anormal de

placas de A β em várias áreas do cérebro e mais recentemente foi atualizada para incluir outros tipos de agregados da proteína A β . A descoberta de mutações patogênicas na proteína precursora da A β (APP) em casos de DA familiar, juntamente com o conhecimento de que a A β é o principal componente proteico das placas senis (marcador histopatológicos específicos da DA), levou ao estabelecimento dessa hipótese (HARDY; HIGGINS, 1992).

A APP é uma glicoproteína transmembrana encontrada em altas concentrações no cérebro e pode ser processada por diferentes vias metabólicas. Essa proteína é inicialmente sintetizada no retículo endoplasmático e posteriormente transportada para o complexo de Golgi, onde sofre modificações pós-traducionais. Posteriormente, a APP pode ser clivada e dar origem a outros peptídeos. É nesse processo que acaba por ocorrer a formação da A β . Existem duas principais vias de clivagem da APP: a via amiloidogênica e a via não amiloidogênica.

Na via amiloidogênica, a APP é clivada inicialmente pela enzima β -secretase, resultando na formação de dois fragmentos, a proteína precursora solúvel β (sAPP β) e fragmento C-terminal 99 (β CTF99) ligado à membrana celular. A clivagem subsequente do β CTF99 pela γ -secretase acaba por gerar o peptídeo A β e o domínio intracelular da APP (AICD). Já na via não-amiloidogênica, a APP é clivada inicialmente pela α -secretase resultando na formação de dois fragmentos, a proteína precursora solúvel α (sAPP α) e fragmento C-terminal 83 (α CTF83) ligado à membrana celular. A clivagem subsequente do fragmento α CTF83 também pela γ -secretase, gera novamente o AICD e um pequeno fragmento p3 (**Figura 11a**).

Após a formação dos peptídeos A β pelas clivagens sequenciais da APP na amiloidogênica, esses monômeros solúveis podem passar a se agregar gerando oligômeros (A β Os), protofibrilas e, por fim, fibrilas maduras, que são grandes agregados insolúveis que encontramos em abundância depositadas nas placas amiloide/senis (LAMBERT; BARLOW; CHROMY; EDWARDS *et al.*, 1998) (**Figura 11b-c**). Apesar da hipótese da cascata amiloide inicialmente atribuir a culpa pela neurodegeneração encontrada na DA às placas senis, evidências mais recentes tem apontado que as formas solúveis da A β , as protofibrilas e, principalmente, os A β Os, sejam, na verdade, as forma mais tóxicas dessa molécula.

Nos últimos anos houve um acúmulo de evidências demonstrando que os A β Os possuem propriedades neurotóxicas e neuroinflamatórias. Estudos apontam que

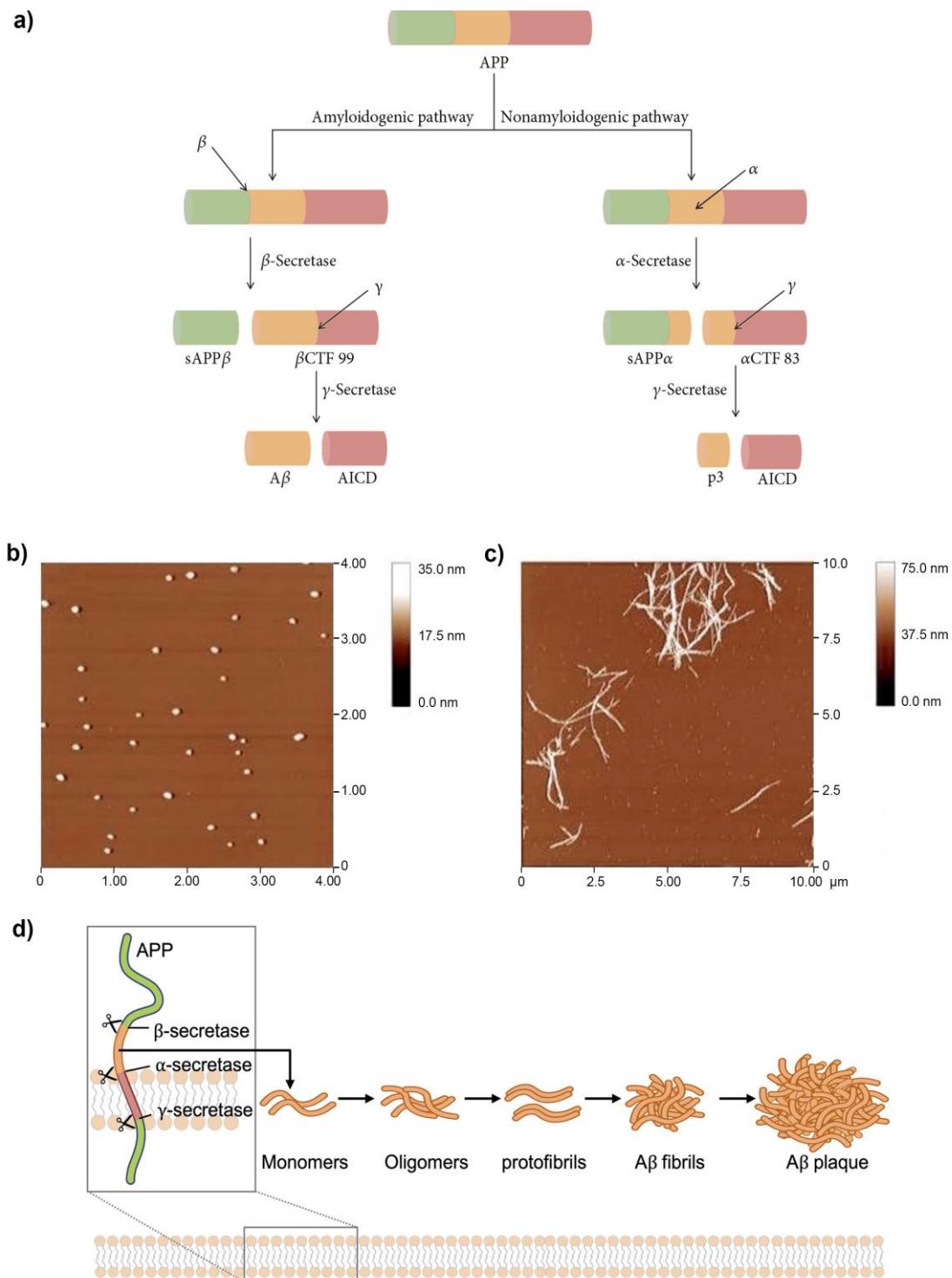


Figura 11: Produção e agregação do peptídeo β -amiloide. Esquema representativo das vias amiloidogênica e não-amiloidogênica do processamento da proteína precursora de amiloide **(a)**. Imagens de microscopia de força atômica de oligômeros **(b)** e fibrilas de A β **(c)**. Esquema representativo simplificado da agregação dos monômeros de A β podendo gerar oligômeros, protofibrilas, fibrilas e, eventualmente, placas de A β . Fonte: modificado de (UDDIN; KABIR; JEANDET; MATHEW *et al.*, 2020) (KIM; CHAE; LEE; CHROMY *et al.*, 2003) (LEE; CHO; RYU, 2021)

estes pequenos agregados de A β tem a capacidade de se ligar a receptores nas células neuronais e gliais, desencadeando uma série de eventos prejudiciais, como geração de espécies reativas e produção de moduladores inflamatórios, que levam à

disfunção sináptica, inflamação e morte neuronal. Além disso, os A β Os são altamente solúveis e têm a capacidade de se disseminar pelo cérebro, propagando a toxicidade para regiões saudáveis. Essa disseminação é sugerida como um mecanismo importante na progressão da DA (CLINE; BICCA; VIOLA; KLEIN, 2018).

Atualmente, a hipótese da cascata amiloide atualizada postula que a A β , em suas diversas formas de agregação, mas principalmente na forma de A β Os, desencadeia uma cascata de sinalização que prejudica sinapses, células gliais e neurônios, produzindo as manifestações patológicas encontradas na DA, como depósitos de tau, perda de sinapses e neurodegeneração, levando à demência. Nessa hipótese, o acúmulo e a difusão de A β Os seria o evento primário na DA.

1.6.1.3 Modelos da Doença de Alzheimer em Roedores

Os modelos animais da DA são ferramentas cruciais na pesquisa biomédica, permitindo a investigação das características patológicas da doença e a avaliação de intervenções terapêuticas. Estes modelos são desenvolvidos para recapitular as principais características da DA humana, incluindo acúmulo de placas de A β e depósitos de tau, perda de neurônios e déficits de memória. A maioria dos modelos hoje disponíveis foi desenvolvido em roedores, primariamente camundongos e, mais recentemente, alguns ratos (lista completa disponível em: www.alzforum.org/research-models) (GOTZ; BODEA; GOEDERT, 2018).

Existem essencialmente dois principais tipos de modelos em roedores para estudar a DA: modelos induzidos por administração de substâncias químicas e modelos transgênicos. Os modelos induzidos implicam na administração de substâncias tóxicas, como a estreptozotocina, ou na infusão de proteínas associadas à fisiopatologia da DA, como a A β ou Tau, diretamente no cérebro dos roedores. Por outro lado, os modelos transgênicos são desenvolvidos pela inserção de genes humanos com mutações ligadas à forma hereditária da DA, como APP, presenilina-1 (PSEN1, parte do complexo da γ -secretase) e presenilina-2 (PSEN2, parte do complexo da γ -secretase), no genoma dos roedores. Isso resulta em produção diferenciada de proteínas mutadas, incluindo a A β , o que leva à formação de placas de A β , bem como a alterações cognitivas e outros achados relacionados à doença (MYERS; MCGONIGLE, 2019).

Aproximadamente 200 modelos transgênicos murinos da DA já foram desenvolvidos desde a descoberta da primeira mutação familiar da DA em 1991 (GOATE; CHARTIER-HARLIN; MULLAN; BROWN *et al.*, 1991). Diversas combinações foram criadas, modelos com apenas uma mutação em APP (APP23, Tg2576, APPSwe), modelos com várias mutações em APP (APPSweLon, TgCRND8), modelos com mutações simultâneas em APP e PSENs (5xFAD, APP-PS1, PS2APP). No entanto, embora reproduzam os depósitos da A β e demonstrem algumas alterações gliais, comportamentais e até sinápticas, nenhum desses modelos conseguiu replicar os outros dois achados mais cruciais da DA: os NTFs de proteína Tau e a extensa neurodegeneração. Na tentativa de superar essa limitação, mutações no gene da proteína tau (MAPT), encontradas na forma familiar hereditária de outras doenças neurodegenerativas, como as demências frontotemporais, também passaram a ser incorporadas ao genoma dos roedores, em conjunto com as mutações em APP e PSENs, resultando na criação de modelos como o 3xTg e o PLB1-triple. Porém, devido à introdução de mutações de outras patologias, esses modelos não são considerados representativos da DA em sua totalidade (ESQUERDA-CANALS; MONTOLIU-GAYA; GUELL-BOSCH; VILLEGAS, 2017; MYERS; MCGONIGLE, 2019).

A situação permaneceu assim até 2013, quando o rato TgF344-AD foi criado, o primeiro modelo animal de DA, utilizando apenas mutações da forma familiar da DA, a apresentar os dois marcadores neuropatológicos característicos - placas de A β e NTFs - associados a uma extensa atrofia cerebral de maneira dependente da idade (COHEN; REZAI-ZADEH; WEITZ; RENTSENDORJ *et al.*, 2013).

Os animais TgF344-AD possuem duas mutações: gene da proteína precursora β -amiloide humana (hAPP) com a mutação sueca (K595N / M596L) dirigida pelo promotor priônico de camundongo (Prp); gene da presenilina 1 humana (PS1) com uma deleção do exon 9, também dirigida pelo promotor do príon do camundongo (Prp). Esse novo modelo apresenta as características clássicas da doença, incluindo amiloidose cerebral dependente da idade e deposição dos NFTs da proteína Tau, inflamação crônica, pronunciada perda neuronal no córtex e hipocampo, comprometimento cognitivo e redução nos níveis de alguns neurotransmissores. As modificações patológicas identificadas parecem iniciar aos 6 meses de idade e se agravar entre 10 e 24 meses, seguindo uma evolução dependente da idade que

inicialmente reproduz o período cognitivamente assintomático da doença visto em humanos (COHEN; REZAI-ZADEH; WEITZ; RENTSENDORJ *et al.*, 2013).

Mais recentemente, graças a evoluções nas tecnologias de edição genética, uma nova classe de modelos murinos transgênicos da DA têm sido desenvolvidos: os modelos *knock-in*. Muitos desses modelos empregam as mesmas mutações na APP e PSENs que foram utilizadas anteriormente. A grande diferença desses modelos em relação aos modelos transgênicos convencionais está nos padrões de expressão do gene adicionado. Nos modelos *knock-in* a inserção gênica é direcionada, com o gene sendo inserido em um local específico no genoma-alvo por meio de recombinação homóloga. Como resultado, a expressão da APP e PSENs mutadas acaba sendo próxima dos níveis normais de expressão. Em contrapartida, os modelos transgênicos convencionais usam integração aleatória: o gene pode se inserir em qualquer parte do genoma hospedeiro, levando, muitas vezes, a níveis elevados de expressão. Conseqüentemente, esses modelos tendem a superexpressar os genes mutados, resultando em um fenótipo mais agressivo e, portanto, menos comparável à DA humana (YOKOYAMA; KOBAYASHI; TATSUMI; TOMITA, 2022).

Por fim, um último subgrupo de modelos geneticamente modificados também passou a ser criado mais recentemente, os chamados “modelos da DA esporádica”. Que são modelos que variam desde apenas a inserção da forma humanizada do gene APP, como o camundongo App^{em1Bdes}, até a inserção de diversos genes e mutações que são fatores de risco para o desenvolvimento da DA esporádica, como APOE4, TREM2 e ABCA7 (YOKOYAMA; KOBAYASHI; TATSUMI; TOMITA, 2022).

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é explorar a contribuição astrocitária no metabolismo cerebral de glicose mensurado via [¹⁸F]FDG-PET e investigar metabolismo cerebral de glicose em modelos murinos da doença de Alzheimer, com ênfase em fases iniciais da patologia e na compreensão dos diferentes tipos celulares envolvidos.

2.1 Objetivos Específicos

- I. Investigar a influência do transporte astrocitário de glutamato, via GLT-1, no metabolismo cerebral de glicose in vivo via [¹⁸F]FDG-PET;
- II. Analisar, ex vivo, o impacto da redução dos níveis de GLT-1 no transporte de glutamato;
- III. Analisar, in vitro, os efeitos da redução dos níveis de GLT-1 na captação de glicose, na captação de glutamato e nos níveis de transportadores de glutamato em culturas primárias de astrócitos e de neurônios.
- IV. Investigar os efeitos dos oligômeros de A β (A β Os) no metabolismo cerebral da glicose in vivo via [¹⁸F]FDG-PET em camundongos.
- V. Investigar alterações no metabolismo cerebral da glicose in vivo via [¹⁸F]FDG-PET na fase pré-placas amiloides em dois modelos animais transgênicos de amiloidose.
- VI. Investigar alterações no metabolismo cerebral da glicose in vivo via [¹⁸F]FDG-PET na fase pré-placas amiloides em humanos.
- VII. Investigar longitudinalmente (3, 6, 9 e 12 meses) o metabolismo cerebral de glicose, os níveis de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (LCR) e o desempenho em testes de memória nos ratos TgF344-AD;
- VIII. Avaliar transversalmente a deposição de placas de A β , o conteúdo de proteínas celulares específicas e a captação de glutamato no tecido cerebral de ratos TgF344-AD em quatro diferentes idades (3, 6, 9 e 12 meses);

PARTE II

Nesta seção serão apresentados os principais artigos científicos produzidos durante o período de doutoramento. Os capítulos são compostos por um breve prefácio seguido do artigo científico.

Capítulo I. *Clozapine induces astrocyte-dependent FDG-PET hypometabolism.*

No **capítulo I** apresentamos o artigo publicado no periódico *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*

Neste estudo investigamos o envolvimento dos astrócitos no metabolismo cerebral de glicose indexado pelo [¹⁸F]FDG-PET. Para isto, realizamos uma intervenção farmacológica com clozapina, visando reduzir uma importante função astrocitária, o transporte de glutamato, e avaliamos os efeitos dessa redução no [¹⁸F]FDG-PET. O tratamento com clozapina resultou em uma diminuição significativa do metabolismo de [¹⁸F]FDG em regiões cerebrais específicas, como o córtex cerebral, o hipocampo e o estriado, em ratos adultos. Além disso, verificamos uma redução do transporte de glutamato no córtex cerebral, bem como uma diminuição do imunoconteúdo e da expressão de GLT-1, o principal transportador de glutamato em astrócitos. Em culturas de astrócitos tratadas com clozapina, também observamos uma redução na densidade de GLT-1 e GLAST, na captação de glutamato e glicose. No entanto, as culturas neuronais não apresentaram alterações significativas.

Com base nessas descobertas, sugerimos que os astrócitos desempenham um papel relevante no sinal obtido pelo [¹⁸F]FDG-PET, um exame de diagnóstico e pesquisa amplamente utilizado em diversas doenças neuropsiquiátricas, contrariando a interpretação mais estabelecida de que esse exame reflete apenas a função neuronal.



Clozapine induces astrocyte-dependent FDG-PET hypometabolism

Andréia Rocha¹ · Bruna Bellaver¹ · Débora G. Souza¹ · Guilherme Schu^{1,2} · Igor C. Fontana¹ · Gianina T. Venturin³ · Samuel Greggio³ · Fernanda U. Fontella¹ · Manoela L. Schiavenin¹ · Luiza S. Machado¹ · Diogo Miron⁴ · Jaderson C. da Costa³ · Pedro Rosa-Neto^{5,6} · Diogo O. Souza^{1,7} · Luc Pellerin⁸ · Eduardo R. Zimmer^{1,9,10}

Received: 1 October 2021 / Accepted: 9 January 2022 / Published online: 5 February 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Purpose Advances in functional imaging allowed us to visualize brain glucose metabolism in vivo and non-invasively with [¹⁸F]fluoro-2-deoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) imaging. In the past decades, FDG-PET has been instrumental in the understanding of brain function in health and disease. The source of the FDG-PET signal has been attributed to neuronal uptake, with hypometabolism being considered as a direct index of neuronal dysfunction or death. However, other brain cells are also metabolically active, including astrocytes. Based on the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis, the activation of the glutamate transporter 1 (GLT-1) acts as a trigger for glucose uptake by astrocytes. With this in mind, we investigated glucose utilization changes after pharmacologically downregulating GLT-1 with clozapine (CLO), an anti-psychotic drug.

Methods Adult male Wistar rats (control, $n = 14$; CLO, $n = 12$) received CLO (25/35 mg kg⁻¹) for 6 weeks. CLO effects were evaluated in vivo with FDG-PET and cortical tissue was used to evaluate glutamate uptake and GLT-1 and GLAST levels. CLO treatment effects were also assessed in cortical astrocyte cultures (glucose and glutamate uptake, GLT-1 and GLAST levels) and in cortical neuronal cultures (glucose uptake).

Results CLO markedly reduced in vivo brain glucose metabolism in several brain areas, especially in the cortex. Ex vivo analyses demonstrated decreased cortical glutamate transport along with GLT-1 mRNA and protein downregulation. In astrocyte cultures, CLO decreased GLT-1 density as well as glutamate and glucose uptake. By contrast, in cortical neuronal cultures, CLO did not affect glucose uptake.

Conclusion This work provides in vivo demonstration that GLT-1 downregulation induces astrocyte-dependent cortical FDG-PET hypometabolism—mimicking the hypometabolic signature seen in people developing dementia—and adds further evidence that astrocytes are key contributors of the FDG-PET signal.

Keywords FDG-PET · Astrocytes · GLT-1 · Glucose · Glutamate · Clozapine

Introduction

Regulation of brain glucose metabolism is key for supporting high-energy demands during neuronal firing and it involves multiple enzymes and transporters. Beyond neurons, other brain cells are also metabolically active such as the astrocytes. Indeed, astrocytes are known for their highly glycolytic metabolism (Itoh et al. 2003; Bouzier-Sore et al. 2006; Supplie et al. 2017) and positioning of their end-feet

all around blood capillaries, which favors the uptake of glucose from the bloodstream (Leino et al. 1997).

Astrocytes take up glucose, via the glucose transporter 1 (GLUT1), and metabolize a substantial fraction into pyruvate through glycolysis. Then, pyruvate is converted to lactate, which is shuttled to feed neurons. This biochemical model is termed the astrocyte-to-neuron lactate shuttle (ANLS), a widely debated theoretical framework (Pellerin and Magistretti 2012; Pellerin et al. 1998; Pellerin and Magistretti 1994). The ANLS model has been corroborated by a series of in vitro and in vivo studies (Pellerin and Magistretti 1994; Takahashi et al. 1995; Pellerin and Magistretti 1997; Schurr et al. 1999; Bouzier-Sore et al. 2003; Nehlig et al. 2004; Barros et al. 2009; Chuquet et al.

This article is part of the Topical Collection on Neurology

✉ Eduardo R. Zimmer
eduardo.zimmer@ufrgs.br

Extended author information available on the last page of the article

2010; Bittner et al. 2011; Jakoby et al. 2014). Additionally, it was observed a neuronal preference for lactate oxidation and a predominant glycolytic metabolism of glucose by astrocytes in cellular models (Itoh et al. 2003; Bouzier-Sore et al. 2006). In vivo studies have also unraveled that reduced astrocytic glutamate transport diminishes astrocyte glucose uptake (Cholet et al. 2001; Voutsinos-Porche et al. 2003). The glutamate transporter 1 (GLT-1) is the most abundant glutamate transporter in the mammalian brain, in which it has a dominant role in glutamate uptake (around 90%) (Danbolt 2001) and is predominantly located on astrocytes (Zhou and Danbolt 2013). Interestingly, glutamate transport via GLT-1 is considered as a triggering signal for glucose uptake by astrocytes (Pellerin and Magistretti 1994), this biological process being vital for brain energetics. It is important to mention that there are reports challenging the ANLS concept (Dienel 2019), which makes this topic controversial and requiring further experimental evidence.

Based on the aforementioned data, the question whether astrocyte glucose metabolism contributes to functional imaging signals, such as for positron emission tomography (PET) imaging with [¹⁸F]fluoro-2-deoxyglucose (FDG) (Reivich et al. 1977; Phelps et al. 1979), has been raised. Specifically, in 1996, Pellerin and Magistretti put forward a hypothesis based on compelling evidence supporting the notion of astrocytes as contributors of FDG-PET signal (Magistretti and Pellerin 1996). In the following years, additional findings have corroborated this proposal (Magistretti and Pellerin 1999; Bonvento et al. 2002; Figley and Stroman 2011). Still, for over 40 years, the FDG-PET signal has been used as an index of neuronal activity (Sestini 2007). Recently, however, it has been demonstrated that targeting astrocytes alters the FDG-PET signal. More specifically, deletion of insulin receptors on astrocytes reduces FDG-PET signal (Garcia-Caceres et al. 2016), and activation of glutamate transport via GLT-1 on astrocytes causes widespread but graded increases in FDG-PET signal (Zimmer et al. 2017).

Recent important theoretical articles are already acknowledging the role of astrocytes in the brain FDG-PET signal (Iaccarino 2017; Zetterberg and Bendlin 2021; Perani 2019; Chetelat et al. 2020). Still, whether a reduction of glutamate uptake by astrocytes would cause in vivo FDG-PET hypometabolism—recapitulating what is seen in neurodegenerative disorders—remains unexplored. On the basis of the evidence presented above, we hypothesized that astrocyte GLT-1 downregulation would cause FDG-PET hypometabolism. To further test this hypothesis, we conducted in vivo and in vitro pharmacological challenges with CLO, a well-known anti-psychotic drug that reduces GLT-1 density (Melone et al. 2001) and glutamate transport

(Vallejo-Illarramendi et al. 2005), to assess its effects on cerebral FDG-PET signal in rats.

Materials and methods

Animals

Adult male Wistar rats, 90 days old, were maintained under a 12-h light–dark cycle (lights on at 7 A.M.), at a controlled room temperature (22 ± 1 °C) and with free access to food and water. Animals' weight was measured once a week and volume of liquid ingestion was measured three times a week.

Pharmacological treatment

Rats were randomly divided into two groups: control and CLO. Rats in the CLO group received the drug CLO (Cristália, Itapira/Brazil) in free drinking water ($25\text{--}35$ mg kg⁻¹ day⁻¹) for 6 weeks, starting at postnatal day (PND) 91, until euthanasia. The CLO solution was prepared as previously described by Terry et al. (Terry et al. 2003). Treatment regimen, dose, and length of treatment followed the procedure described by Melone et al. (Melone et al. 2001). CLO was selected for these experiments because it specifically reduces GLT-1 (without affecting other glutamatergic transporters) (Melone et al. 2003) and substantially crosses the BBB, allowing for oral administration (Cremers et al. 2012; Naheed and Green 2001).

[¹⁸F]FDG-microPET scanning

Rats were scanned longitudinally before treatment (Baseline), at PND 90, and after 6 weeks of treatment (Follow-up), at PND 136, as previously described (Bellaver et al. 2019). Briefly, after overnight fasting, animals received an intravenous injection (0.4 mL) of FDG (mean \pm s.d.: 1.03 ± 0.07 mCi) into the tail vein. Then, each rat returned to its home cage for a 40-min period of awake uptake of FDG. After, they immediately underwent a 10-min static acquisition under anesthesia (2% isoflurane at 0.5 L/min oxygen flow) (see supplementary material for detailed methodology).

Metabolic networks

Cross-correlation maps were built as previously described (Bellaver et al. 2019), using a mask containing 14 volumes of interest (VOIs): left (L)-right (R) frontal cortex (FtC),

L-R temporoparietal cortex (TmPtC), L-R thalamus (Th), L-R hypothalamus (Ht), L-R striatum (St), L-R hippocampus (Hip), and L-R cerebellum (Cer). No voxel-wise network analysis was conducted due to rat brain size and PET limited resolution. Stable metabolic brain networks, using an innovative multiple sampling scheme (Schu 2021), were constructed by computing Pearson's correlation coefficients based on 2000 bootstrap samples. Graph theoretical measures such as density, global efficiency, assortativity coefficient, average degree, and average clustering coefficient were calculated for each of the bootstrap samples. Networks were corrected for multiple comparisons using the false discovery rate ($P < 0.005$) (Rubinov and Sporns 2010).

Synaptosomal preparation and L-[³H]glutamate (L-[³H]Glu) potassium-stimulated release

This procedure was performed as previously described (Almeida et al. 2017) using the whole cortex (left hemisphere) from 137 to 140 PND rats (see supplementary material for detailed methodology).

Primary cortical astrocyte cultures

Newborn (1–2 days old) male Wistar rats' cortices were aseptically resected out. The tissue was dissociated enzymatically—with trypsin 0.05% (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) and DNase 0.003% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)—and mechanically (Pasteur pipet). Samples were incubated for 15 min at 37 °C for enzymatic action, followed by the addition of 10% fetal bovine serum (FBS) and centrifugation at 100 g for 5 min. Pellet was resuspended in HBSS (Gibco®) containing DNase 0.003% and centrifuged for 7 min at 100 g. The cell pellet was resuspended in DMEM (Gibco®) supplemented with 10% FBS, 15 mM HEPES, 14.3 mM NaHCO₃, 1% Fungizone, and 0.04% gentamicin, and plated onto 24-well plates at a density of $3\text{--}5 \times 10^5$ cells/cm². Cells were cultured at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. The first medium exchange occurred 24 h after plating cells. The following medium changes occurred once every 4 days. After cells reached confluence, the protocol followed Vallejo-Illarramendi et al. (Vallejo-Illarramendi et al. 2005). First, 0.2 mM dibutyryl-cAMP (dBcAMP) was added for 6 days to induce GLT-1 expression. Subsequently, dBcAMP was removed and astrocytes were treated with 50 μM CLO (Sigma-Aldrich), in a medium supplemented with 1% FBS, for 48 h and used for immunofluorescence, western blot, or uptake procedures.

Primary cortical neuronal cultures

Neuronal cultures were prepared as previously described (Nunez 2008) with modifications. Newborn (0–1 day old) male Wistar rats' cortices were aseptically resected out. Tissue was dissociated enzymatically—with trypsin 0.05% (Gibco®) and DNase 0.006% (Sigma-Aldrich)—and mechanically (Pasteur pipet). Samples were incubated for 20 min at 37 °C for enzymatic action and again mechanically dissociated for 5 min. After, 20% FBS was added and samples were centrifuged at 150 g for 5 min. The pellet was resuspended in Neurobasal medium (Gibco®) supplemented with 0.5% B27 (Gibco®), 10 mM glutamine, and 0.02% penicillin/streptomycin (10,000 U/mL—Gibco®). Cells were plated at a density of $3\text{--}5 \times 10^5$ cells/cm² into 24-well plates pre-coated with poly-L-lysine and cultured at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. Half of the medium was replaced 1 h after plating cells. Medium changes, also of half of the medium volume, occurred once every 4 days. After cells reached confluence, neurons were treated with 50 μM CLO (Sigma-Aldrich) for 48 h and used for immunofluorescence or uptake procedures.

Sodium-dependent D-[2,3-³H]-aspartate (D-[³H]Asp) uptake

D-[³H]Asp is a substrate for the high-affinity sodium-dependent glutamate transport system; therefore, its uptake was used as a proxy of glutamate uptake (Taxt and Storm-Mathisen 1984; Davies and Johnston 1976). The sodium-dependent D-[³H]Asp uptake was assessed in adult cortical slices (137–140 PND rats) incubated with 100-μM L-glutamate and in primary cultured astrocytes (P1–2 rats) incubated with 10 μM (basal) or 100 μM (stimulated) L-glutamate. The procedures followed protocols previously described (Davies and Johnston 1976; Debernardi et al. 1999) with modifications (see supplementary material for detailed methodology).

2-Deoxy-D-[³H]glucose ([³H]2DG) uptake

[³H]2DG uptake was assessed in neuronal (P0–1 rats) and astrocyte (P1–2 rats) cultures incubated with 10 μM (basal) or 100 μM (stimulated) L-glutamate. The procedures followed protocols previously described (Bellaver et al. 2019) with modifications (see supplementary material for detailed methodology).

SDS-PAGE

The whole cortex (left hemisphere) from 137 to 140 PND rats or astrocyte cultures were analyzed by SDS-PAGE,

as previously described (Bellaver et al. 2019). The following antibodies were used: GLT-1; glutamate-aspartate transporter (GLAST); Glucose transporter 1 (GLUT1); β -actin; and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (see supplementary material for detailed methodology).

RNA extraction and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

The whole cortex (right hemisphere) from 137 to 140 PND rats was used for the qRT-PCR analysis on which the

mRNAs of GLT-1 and GLAST were quantified as previously described (Bellaver et al. 2018) (see supplementary material for detailed methodology).

High-performance liquid chromatography (HPLC) procedures

High-performance liquid chromatography (HPLC) procedure was performed as previously described (Souza et al. 2016) using cerebrospinal fluid (CSF) to quantify three amino acids: glutamate (Glu), aspartate (Asp), and glutamine (Gln). Additionally, a HPLC with ultraviolet (UV)

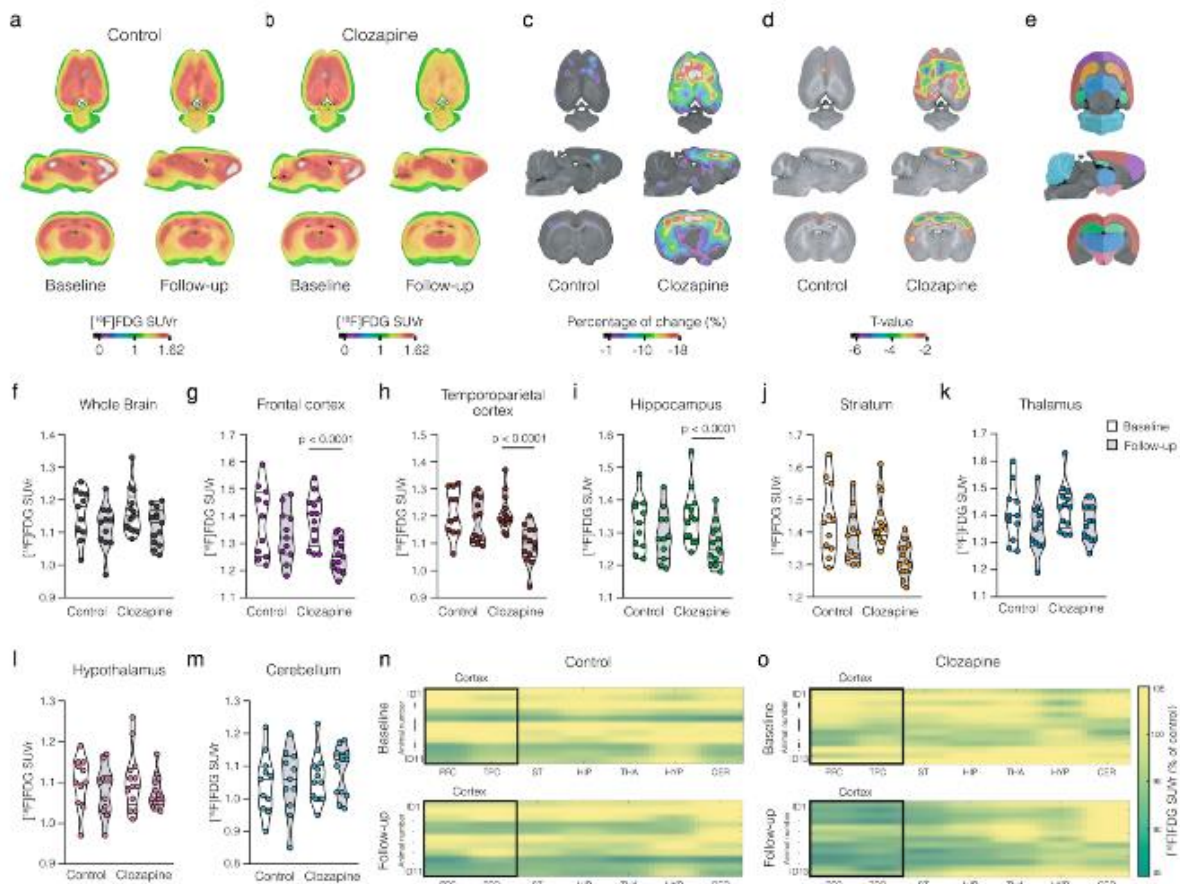


Fig. 1 Effects of CLO treatment on brain glucose metabolism assessed by [18 F]FDG-microPET. Brain metabolic maps showing the mean standardized uptake value reference (SUVR) of the control (a) and CLO (b) groups at Baseline and after the treatment period. Voxel-wise images representing the percentage of change difference (c) and *t*-statistical maps (d) between Baseline and Follow-up of control and CLO groups. Brain mask showing the volumes of interest (VOIs) (e). Control and CLO group mean regional FDG SUVR values in the whole brain (f), frontal (g) and temporoparietal cortices (h),

hippocampus (i), striatum (j), thalamus (k), hypothalamus (l), and cerebellum (m) at Baseline and Follow-up. Dynamic raster plots displaying individual FDG SUVR regional means in the control (n) and CLO (o) groups. a–d Images are projected into a standard magnetic resonance imaging (MRI) in axial, sagittal, and coronal planes (control, $n = 11$; CLO, $n = 13$). Data represented as violin plots indicating the mean, interquartile range, and the minimum and maximum values. Two-way ANOVA with repeated measures, followed by Sidak's

detection method was applied to verify CLO presence and stability in the animals' drinking solution (see supplementary material for detailed methodology).

Behavioral analysis

At the end of the 6 weeks of treatment, animals were submitted to the open-field and the novel object recognition (NOR) tasks (see supplementary material for detailed methodology).

Results

CLO treatment causes brain glucose hypometabolism in vivo

The microPET analysis after CLO pharmacological intervention showed a clear FDG SUVr reduction mainly in cortical brain regions (Fig. 1a, b). Specifically, the CLO group ($n = 13$) presented a widespread FDG cortical hypometabolism, ranging from 10 to 20% (Fig. 1c). By contrast, the control group ($n = 11$) presented only a few small clusters of glucose metabolism reduction, comprising values between 1 and 6% (Fig. 1c). A voxel-wise *t*-statistical analysis showed a significant glucose hypometabolism mostly in the cortical regions of the CLO group, with a peak effect in the parietal cortex (peak, $t_{(23)} = 7.62$, $p < 0.0001$; Fig. 1d). On the other side, the control group presented only negligible reductions in a few isolated voxels (Fig. 1d). The two-way ANOVA of the whole brain FDG mean SUVr showed significant time effect ($p = 0.0029$; $F(1, 22) = 11.2$; Fig. 1f) but no group ($p = 0.86$; $F(1, 22) = 0.035$) or interaction ($p = 0.89$; $F(1, 22) = 0.016$), which indicates that time (Follow-up) affected the whole brain metabolism in both groups if compared to their own Baseline. A brain mask with 14 VOIs (Fig. 1e), based on the Paxinos and Watson Rat Brain Atlas, was used to obtain mean regional FDG SUVr values. In the regional analysis, a two-way ANOVA identified a significant effect of time and an interaction in the frontal cortex (time, $p < 0.0001$; interaction, $p = 0.02$; Fig. 1g), temporoparietal cortex (time, $p < 0.0001$; interaction, $p = 0.003$; Fig. 1h), and hippocampus (time, $p < 0.0001$; interaction, $p = 0.04$; Fig. 1i). The striatum (Fig. 1j) and thalamus (Fig. 1k) presented only an effect of time (striatum, $p = 0.008$; thalamus, $p = 0.007$). The hypothalamus (Fig. 1l) and cerebellum (Fig. 1m) showed no significant differences in the two-way ANOVA. Following the two-way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test showed FDG hypometabolism in the frontal cortex ($p < 0.0001$; $t_{(22)} = 5.8$), temporoparietal cortex ($p < 0.0001$; $t_{(22)} = 6.6$), and hippocampus ($p < 0.0001$; $t_{(22)} = 5.49$) on the follow-up CLO group in comparison to

its baseline. By contrast, no regional changes were found in the control group (Baseline vs. Follow-up). The individual dynamic raster plot reinforces the observation that CLO-induced FDG hypometabolism is more pronounced in cortical areas, and that FDG metabolism remains stable in the control group (Fig. 1n, o). Furthermore, a multiple sampling scheme metabolic network analysis was performed to identify brain reorganization patterns in response to CLO. In comparison to the control group (Fig. 2a), the CLO group showed multiple altered connections within the metabolic network, presenting a widespread hyposynchronicity ($p < 0.005$, FDR-corrected, Fig. 2b). These findings were corroborated by consistent changes in graph measures, including reduced global efficiency ($p < 0.0001$, Fig. 2c), density ($p < 0.0001$, Fig. 2d), degree ($p < 0.0001$, Fig. 2e), and clustering coefficient ($p < 0.0001$, Fig. 2f). The assortativity coefficient was not significantly different between groups ($p = 0.31$, Fig. 2g).

Cortical GLT-1 and D-[3H]Asp uptake are reduced after CLO treatment

The astrocyte glutamate transporter immunoreduction analysis on the cortical tissue revealed a significant reduction, around 18%, of GLT-1 levels ($p = 0.0043$; $t_{(24)} = 3.16$, Fig. 3a, b) in the CLO group (control, $n = 14$; CLO $n = 12$), but no differences on GLAST levels ($p = 0.74$; $t_{(24)} = 0.33$; Fig. 3d, e). In addition, GLT-1 mRNA expression was also reduced ($p = 0.025$; $t_{(13)} = 2.53$; control, $n = 7$ and CLO = 8; Fig. 3c). Consistently, GLAST expression was not altered ($p = 0.27$; $t_{(13)} = 1.15$; Fig. 3f). Glutamatergic transport was also evaluated by using a D-[3H]Asp uptake assay on fresh cortical brain slices. The CLO group ($n = 5$) showed a significant reduction ($p = 0.048$; $t_{(9)} = 2.27$; Fig. 3g) of D-[3H]Asp uptake when compared to the control group ($n = 6$). In parallel, potassium-stimulated L-[3H]Glut release was assessed in synaptosomal preparations and no differences were observed ($p = 0.76$; $t_{(14)} = 0.29$; Fig. 3h). Finally, cerebrospinal fluid (CSF) levels of glutamate ($p = 0.62$; $t_{(19)} = 0.49$), aspartate ($p = 0.48$; $t_{(19)} = 0.71$), and glutamine ($p = 0.19$; $t_{(11)} = 1.38$) were not altered as well (Fig. 3i–k). Furthermore, no changes in GLUT1 immunorecontent, the glucose transporter expressed in astrocytes, were identified ($p = 0.25$; $t_{(11)} = 1.20$; Supplementary Fig. 1a, b).

Effects of CLO on primary cultures of cortical astrocytes

To assess CLO-specific effects on astrocytes, we treated cortical astrocyte cultures with 50 M CLO for 48 h. Primary astrocyte cultures were immunostained with anti-GFAP (red) and DAPI (blue) (Fig. 4a). We found

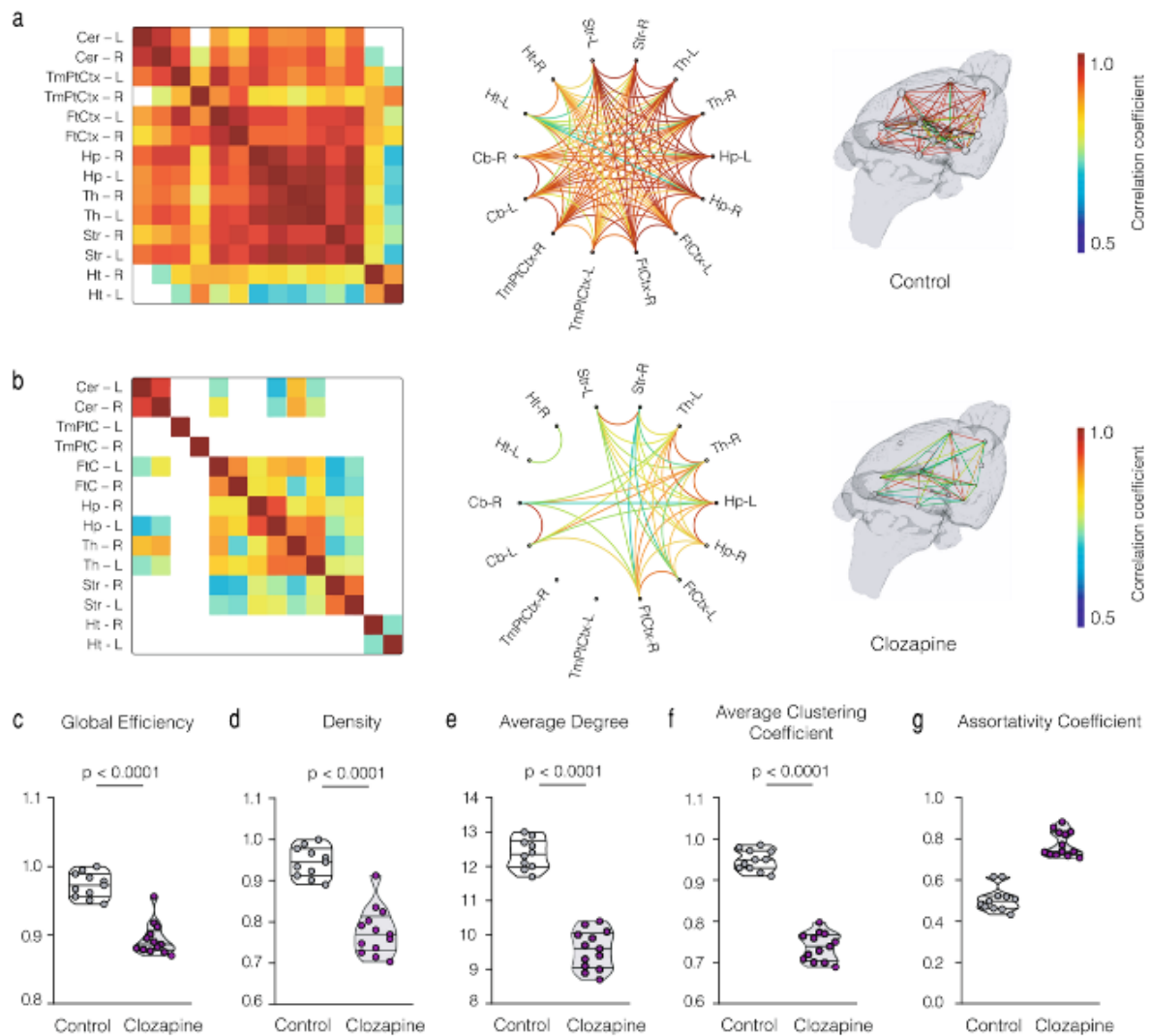


Fig. 2 [^{18}F]FDG derived metabolic networks graph measures. FDG derived metabolic networks: cross-correlation matrices (left), circular plots (middle), and brain maps (right) displaying inter-subject cross-correlation region-to-region (VOIs) associations in control (**a**) and CLO (**b**) groups at Follow-up. Data presented as correlation values with FDR-corrected threshold at $p < 0.05$. Cross-correlation matrices

graph measures of global efficiency (**c**), density (**d**), average degree (**e**), average clustering coefficient (**f**), and assortativity coefficient (**g**) (control, $n = 11$; CLO, $n = 13$). Data represented as violin plots indicating the mean, interquartile range, and the minimum and maximum values. Unpaired two-tailed Student's t test

a significant decrease of GLT-1 ($\sim 36\%$, $p = 0.0019$; $t_{(7)} = 4.81$; Fig. 4b, c) and GLAST ($\sim 18\%$, $p = 0.011$; $t_{(7)} = 3.38$; Fig. 4d, e) immunocentents in the CLO group ($n = 8$, per group). In parallel, the CLO group showed a reduction of [^3H]D-Asp uptake in basal ($p = 0.0005$; $t_{(5)} = 7.97$; Fig. 4f) and stimulated assays ($p = 0.023$; $t_{(5)} = 3.21$; Fig. 4g). When comparing basal and stimulated [^3H]D-Asp uptake from control and CLO groups (Fig. 4h), we identified significant effects of treatment ($p = 0.0002$;

$F(1, 24) = 18.91$) and glutamate levels ($p < 0.0001$; $F(1, 24) = 48.14$) but no interaction ($p = 0.12$; $F(1, 24) = 2.49$). Sidak's multiple comparisons analysis demonstrated that the control group-stimulated [^3H]D-Asp uptake was higher than the basal uptake for both control ($p < 0.0001$; $t_{(8)} = 5.36$) and CLO groups ($p = 0.005$; $t_{(8)} = 5.45$). In contrast, the CLO group-stimulated [^3H]D-Asp uptake did not differ in comparison to the basal uptake (vs. basal control, $p = 0.77$; vs. basal CLO, $p = 0.82$) and was lower than the control group-stimulated [^3H]D-Asp uptake ($p = 0.003$;

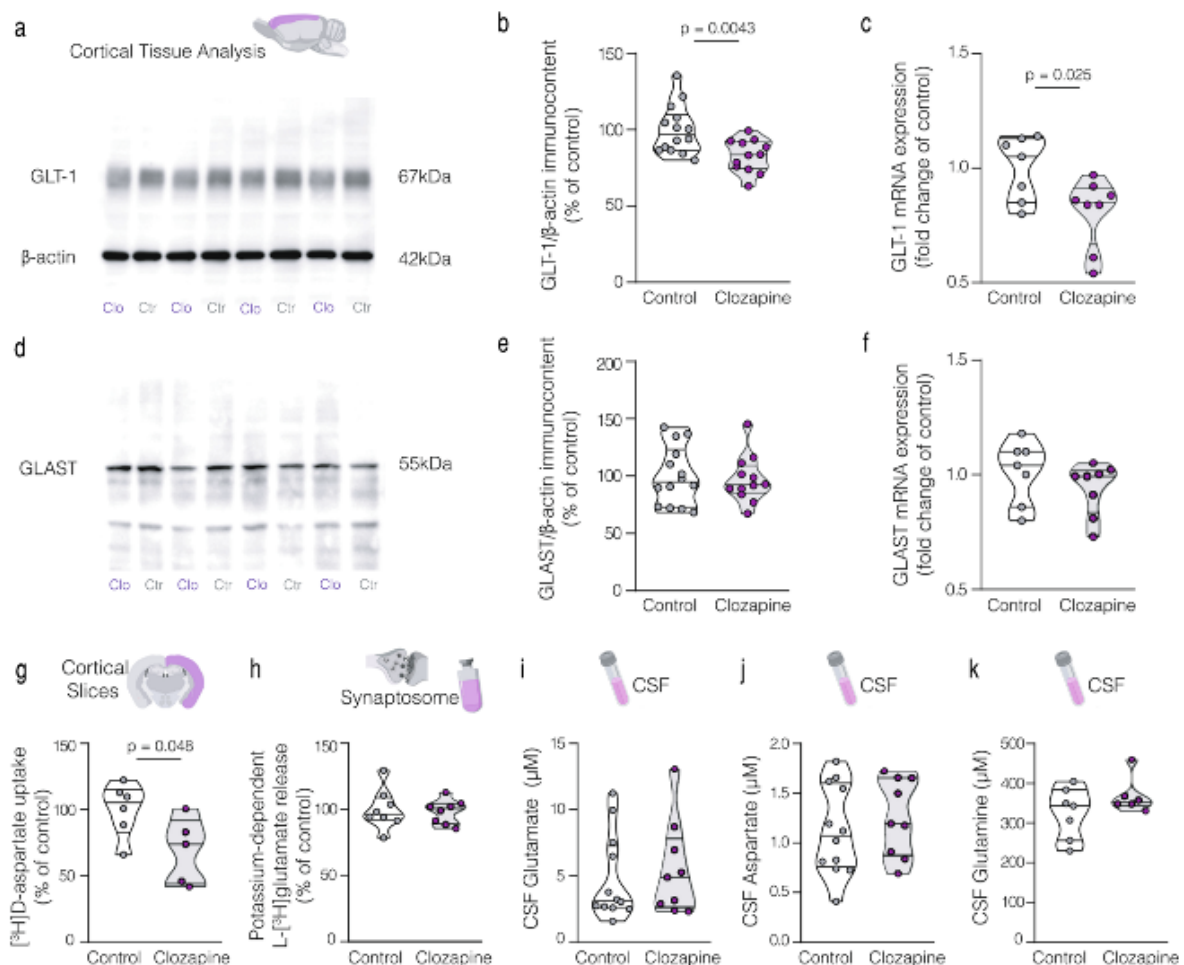


Fig. 3 Effects of CLO treatment on cortical glutamate transporter expression and activity, synaptosomal glutamate release, as well as glutamate, aspartate, and glutamine CSF levels. Cortical immunoccontent (normalized by the β -actin immunoccontent) of the glutamate transporters GLT-1 (**a, b**) and GLAST (**d, e**) in the control and CLO groups, after a 6-week treatment period (control, $n = 14$; CLO, $n = 12$). Cortical mRNA expression of GLT-1 (**c**) and GLAST (**f**) in the control and CLO groups, after a 6-week treatment period. PCR results are expressed as fold change in comparison to the control

group (control, $n = 7$; CLO, $n = 8$). D-[3 H]Asp uptake in cortical brain slices at the groups control and CLO (control, $n = 6$; CLO, $n = 5$) (**g**). L-[3 H]Glu release from cortical synaptosomal preparations of control and CLO groups ($n = 8$ for each group) (**h**). Glutamate (control, $n = 12$; CLO, $n = 9$) (**i**). Aspartate (control, $n = 12$; CLO, $n = 9$) (**j**). Glutamine (control, $n = 7$; CLO, $n = 6$) (**k**) cerebrospinal fluid concentrations in control and CLO groups. Data represented as violin plots indicating the mean, interquartile range, and the minimum and maximum values. Unpaired two-tailed Student's t test

$t_{(8)} = 6.623$). Also, results of [3 H]2DG uptake revealed no differences for basal uptake ($p = 0.6054$; $t_{(7)} = 0.54$; Fig. 4j) but a decrease of stimulated uptake for the CLO group ($p = 0.0002$; $t_{(7)} = 7.19$; Fig. 4j). An analysis comparing [3 H]2DG uptake in these four experimental conditions (Fig. 4k) showed effects of treatment ($p < 0.0001$; $F(1, 28) = 22.54$), glutamate level ($p = 0.0061$; $F(1, 28) = 8.79$), and an interaction ($p < 0.0001$; $F(1, 28) = 21.34$). Sidak's multiple comparisons analysis demonstrated that the control group-stimulated [3 H]2DG uptake was higher than the control and CLO groups in the basal condition

($p < 0.0001$). Also, the CLO group-stimulated [3 H]2DG uptake was reduced if compared to the stimulated control group ($p < 0.0001$). Furthermore, no changes in the GLUT1 immunoccontent were identified ($p = 0.71$; $t_{(3)} = 0.39$; Supplementary Fig. 1c, d).

Effects of CLO treatment on primary cultures of cortical neurons

Additionally, we evaluated the effect of CLO on neuronal cultures. Primary neuronal cultures were immunostained

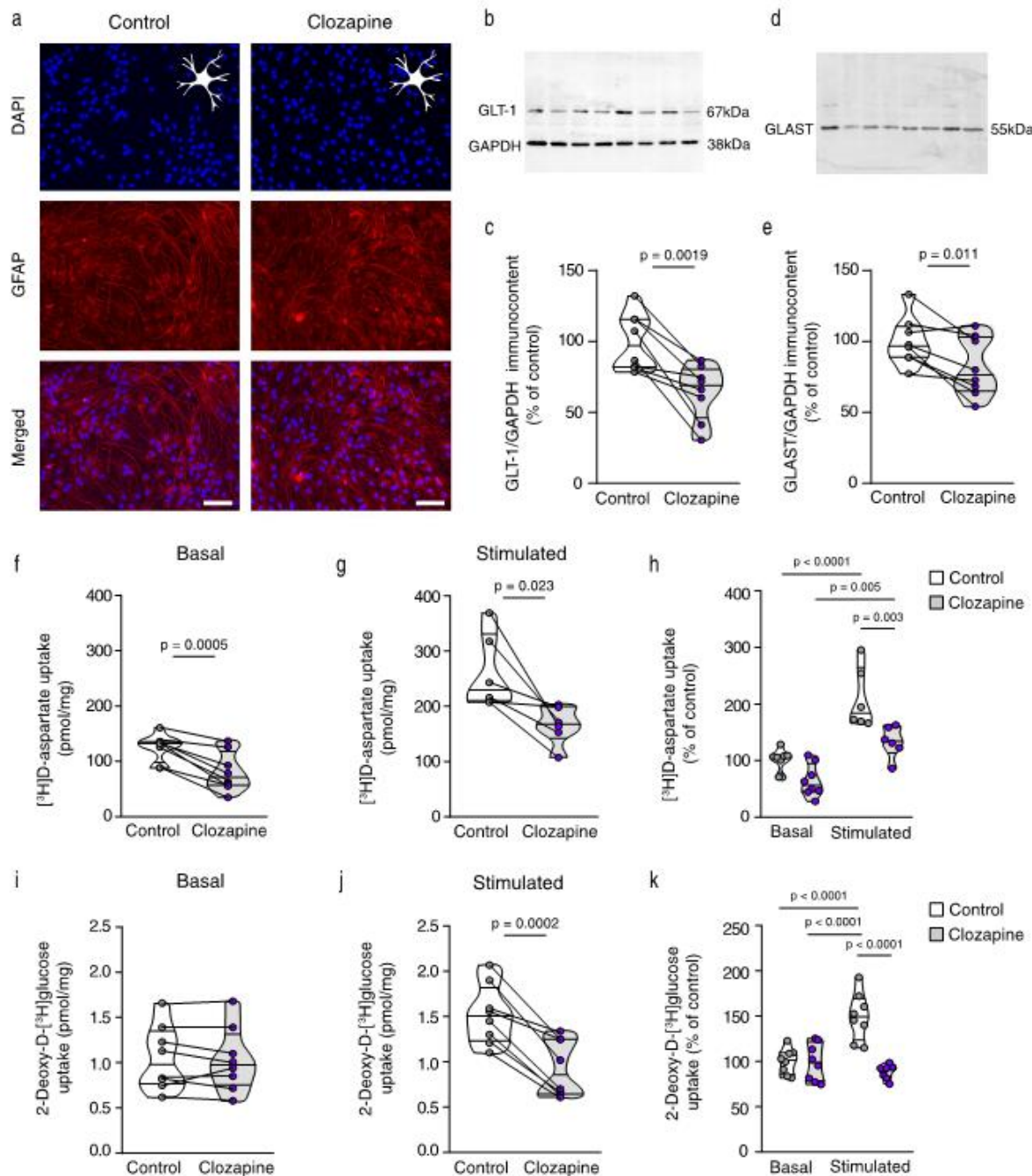


Fig. 4 Evaluation of CLO treatment effects on $[^3\text{H}]\text{D-Asp}$ and $[^3\text{H}]\text{2DG}$ uptake in cortical astrocyte cultures. Representative images of primary cortical astrocyte cultures stained with anti-GFAP (red) and DAPI (blue); $\times 200$ magnification and scale bar = $50\ \mu\text{m}$ (a). Immunoccontent of glutamate transporters GLUT-1 (b, c) and GLAST (d, e) in primary cortical astrocyte cultures (normalized by GAPDH immunoreactivity). Basal ($10\ \mu\text{M}$ glutamate) ($n = 6$ for each group) (f) and stimulated ($100\ \mu\text{M}$ glutamate) (g) $[^3\text{H}]\text{D-Asp}$ uptake in astrocyte cultures. Basal ($10\ \mu\text{M}$ glutamate) (i) and stimulated ($100\ \mu\text{M}$

glutamate) (j) $[^3\text{H}]\text{2DG}$ uptake in astrocyte cultures. Comparisons of $[^3\text{H}]\text{D-Asp}$ (h) and $[^3\text{H}]\text{2DG}$ (k) uptake results in both conditions (basal and stimulated) for control and CLO groups. Uptake values expressed as percentage of control basal results ($n = 8$ for each group). Data represented as violin plots indicating the mean, interquartile range, and the minimum and maximum values. Paired two-tailed Student's t test or two-way ANOVA; two-way ANOVA followed by Sidak's

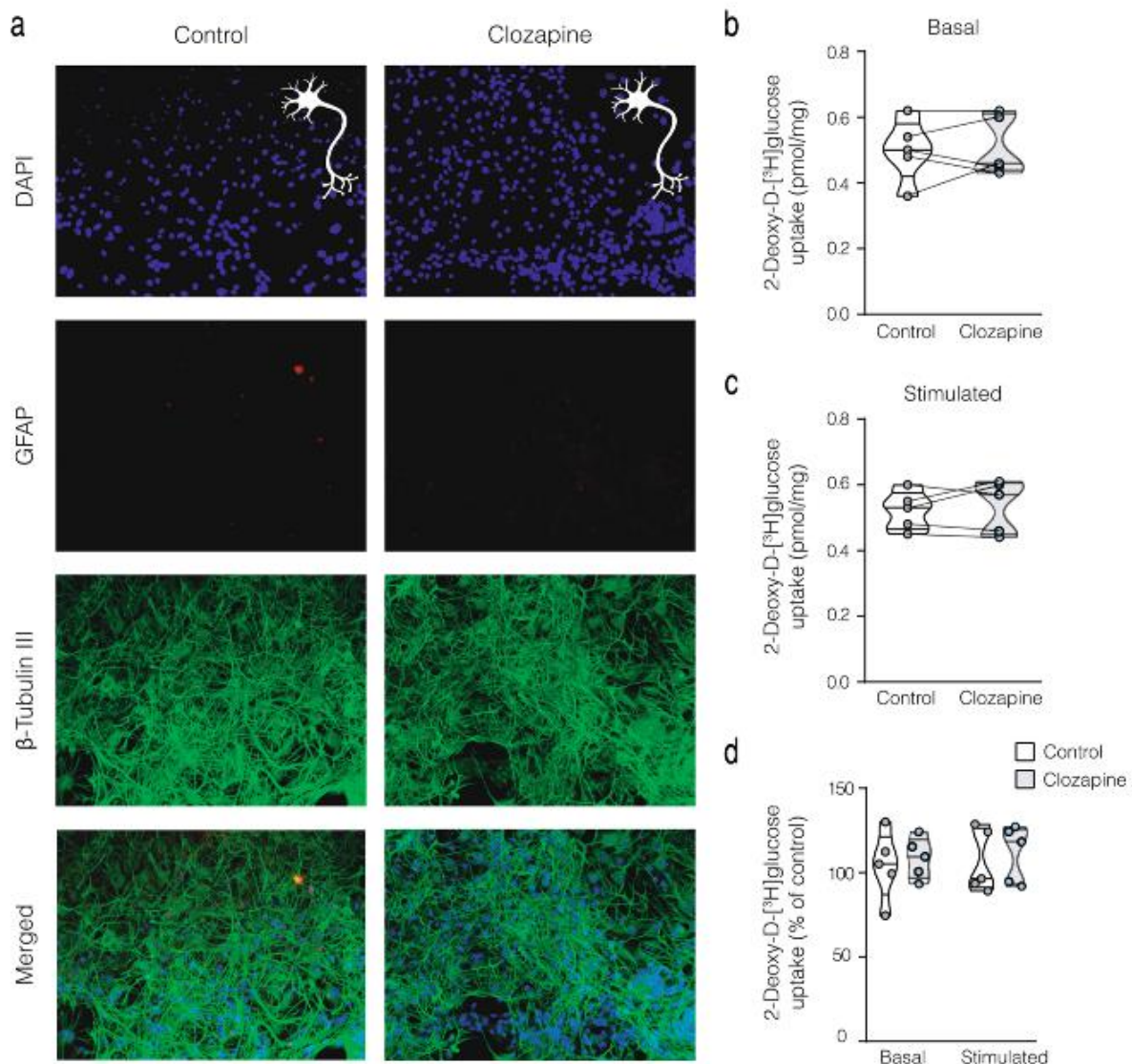


Fig. 5 Evaluation of CLO treatment effects on 3 H]2DG uptake in cortical neuron cultures. Representative images of the primary cortical neuronal cultures stained with anti-GFAP (red), anti- β -Tubulin III (green), and DAPI (blue); $\times 100$ magnification and scale bar = 100 μ m (a). Basal (10 μ M glutamate) (b) and stimulated (100 μ M glutamate) (c) 3 H]2DG uptake in neuronal cultures. Comparisons of 3 H]2DG

uptake results in both conditions (basal and stimulated) for control and CLO groups (d). Uptake values expressed as percentage of control basal results ($n = 5$ for each group). Data represented as violin plots indicating the mean, interquartile range, and the minimum and maximum values. Two-way ANOVA followed by Sidak's

with anti-GFAP (red), anti- β -Tubulin III (green), and DAPI (blue) (Fig. 5a). We found no differences between the control and CLO groups for 3 H]2DG uptake under basal ($p = 0.70$; $t_{(4)} = 0.40$; Fig. 5b) and stimulated conditions ($p = 0.54$; $t_{(4)} = 0.66$; Fig. 5c). An analysis comparing 3 H]2DG uptake in these four experimental conditions (Fig. 5d) showed no effects of treatment ($p = 0.7284$; $F(1,$

$16) = 0.12$), glutamate levels ($p = 0.5407$; $F(1, 16) = 0.39$), or interaction ($p = 0.9787$; $F(1, 16) = 0.0007$).

Behavioral effects and treatment measures

Total distance traveled ($p = 0.17$; $t_{(26)} = 1.42$) and total immobile time ($p = 0.13$; $t_{(26)} = 1.56$) during the open-field task were not different between groups (control,

$n = 14$; CLO, $n = 12$), therefore, suggesting no sedative side effects of CLO (Prut and Belzung 2003) (Supplementary Fig. 2a–c). Analysis of the time spent exploring objects during the NOR task revealed that both groups (control, $n = 7$; CLO, $n = 5$) equally explored the two identical objects during the training session and spent more time exploring the new object during the test session (control, $p = 0.0004$; $t_{(6)} = 7.22$; CLO, $p = 0.0004$; $t_{(4)} = 10.86$), indicating no impairment of short-term recognition memory (Supplementary Fig. 2d–f). Animals' body weight was measured once a week during treatment. Results showed time effect, as animals gained weight due to age-dependent normal body growth ($p < 0.0001$; $F(7, 196) = 336.6$; Supplementary Fig. 3a), but no group effect ($p = 0.35$; $F(1, 28) = 0.89$). The liquid intake showed an increase over time ($p < 0.0001$; $F(11, 121) = 7.85$; Supplementary Fig. 3b), and a lower volume intake for the CLO group (group effect, $p = 0.036$; $F(1, 11) = 11.73$), probably due to differences in the drinking water palatability. In future experiments, the addition of small quantities of a compound such as sucrose, in order to make the drinking water containing the experimental drug more palatable, should be considered. Finally, a high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis confirmed that the animals' drinking solution preparation was yielding the expected concentration with high reproducibility, presenting a relative standard deviation (RSD) of 1.86% (Supplementary Fig. 3c). The experimental drinking solution also showed a high stability, with no noticeable modifications of CLO concentration in a 24-h period at room temperature (Supplementary Fig. 3d).

Discussion

In this study, we demonstrated that CLO causes in vivo brain glucose hypometabolism and alters the brain metabolic network. We also found that CLO decreases GLT-1 immunoccontent and mRNA expression along with functional changes, including a reduction in glutamate uptake in cortical slices, and a decline in glucose and glutamate uptake in astrocyte cortical cultures. Importantly, no differences were found in cultures of cortical neurons.

Animals treated with CLO exhibited a significant widespread reduction in FDG-PET signal in the cortex (~20%) and hippocampus. Consistently, those brain regions are the ones presenting a high content of GLT-1 (Lehre et al. 1995). Additionally, we found that CLO selectively reduced cortical GLT-1 protein levels, but did not alter GLAST levels, confirming the effect originally seen by Melone et al. (Melone et al. 2003). We also identified a reduction in cortical GLT-1 mRNA expression, suggesting that CLO may act at

the transcriptional level. In parallel, CLO reduced GLT-1 and GLAST protein levels in cortical astrocyte cultures. Quite importantly, we corroborated these findings with the functional reduction of astroglial glutamate transport, measured by D- ^3H Asp uptake, in cortical slices and astrocyte primary cultures. We did not find changes in synaptosomal glutamate release from cortical preparations, or in glutamate, aspartate, and glutamine concentrations in the CSF, which suggests that the glutamate-glutamine recycling process remains functional.

The in vitro evaluation using primary astrocyte cultures treated with CLO also showed a reduction of glucose uptake, while no difference was found in cultures of cortical neurons. These results suggest that astrocytes, not neurons, are the main target cells responsible for the phenomenon observed in vivo, i.e., CLO-induced FDG-PET signal reduction. Importantly, the reduction of ^3H 2DG uptake by CLO in cortical astrocyte cultures was only observed when stimulated by glutamate. Astrocytes increase their glucose uptake in situations of neuronal activation (Pellerin and Magistretti 2012), i.e., during high energetic demand. Accordingly, a similar outcome was also demonstrated in vivo in a two-photon microscopy study in mice, which also showed that glucose uptake is elevated in astrocytes during activation but remains close to basal levels in neurons (Chuquet et al. 2010). Our data showing that reducing GLT-1 expression decreases activity-dependent ^3H 2DG accumulation is also in agreement with another study performed with GLT-1 KO mice showing that invalidation of GLT-1 prevents the whisker-stimulated increase in ^{14}C -2-deoxyglucose accumulation in the somatosensory cortex of developing animals (Voutsinos-Porche et al. 2003).

It is important to emphasize that the FDG-PET uptake phase in our experiments was conducted in freely moving animals and, thus, the FDG-PET signal here represents glucose metabolism in an awake brain. Our present data should be also put in perspective with previous results obtained with a completely different drug. Ceftriaxone is an antibiotic that was shown to cause an increase in astrocyte GLT-1 expression and activity (Rothstein et al. 2005). Treatment of primary cultures of cortical astrocytes with ceftriaxone was shown to enhance both glutamate transport and glutamate-stimulated glucose uptake through its effect on GLT-1 (Zimmer et al. 2017). But quite strikingly, ceftriaxone increased brain FDG-PET signal in rats proportionately to the density of GLT-1 expression in different brain regions (Zimmer et al. 2017). These results are simply a mirror image of the data obtained with CLO. Altogether, results with CLO and ceftriaxone reinforce the notion that astrocytes, through glutamate-stimulated glucose uptake, represent an important source of the FDG-PET signal in vivo, as postulated exactly 25 years ago (Magistretti and Pellerin 1996). Additionally, a recent study demonstrated that the modulation of microglial

cells also contributes to the FDG-PET signal (Xiang 2021). Since microglial cells account for less than 10% of brain cells in mammals, the microglia-induced effect on FDG-PET probably has the astrocytic and/or the neuronal compartment as the cellular source. In fact, it was previously demonstrated that IL-1 α , IL-1 β , and TNF α , classically secreted by activated microglia, enhance glucose uptake in astrocytes (Gavillet et al. 2008).

Besides its effects on glutamate transport presented above, it is also known that CLO interacts with serotonin, muscarinic, dopamine, and histamine receptors (Miyamoto et al. 2005; Stepnicki 2018). However, the direct contribution of these neurotransmission systems to brain energetics is small (Sibson et al. 1998; Scremin and Jenden 1993). Therefore, it is very unlikely that changes in glucose uptake result from these interactions. In fact, there are several studies showing that brain energy metabolism is driven predominantly by glutamatergic and, to a minor extent, GABAergic systems (for review, see (Rothman et al. 1999; Rothman et al. 2003)), with contributions of other neurotransmitters being so small that it can be disregarded in the overall scenario. However, we could not ignore the possibility of a modulatory effect on neuronal metabolism. To rule out a direct effect on neuronal energy metabolism, we tested CLO impact on neuronal cortical cultures under resting and stimulated conditions. Clearly, CLO did not change neuronal glucose metabolism in both situations, thus, strengthening the conclusion of astrocytes being at the origin of the observed hypometabolism. It is important to mention that cortical FDG-PET hypometabolism is a signature of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and frontotemporal dementia, which is interpreted as an index of neurodegeneration (Chetelat et al. 2020). Since CLO does not induce neuronal death (Chen and Nasrallah 2019; Lundberg 2020; Bastianetto et al. 2006; Stanisavljevic et al. 2019), one could argue we recapitulated cortical FDG-PET hypometabolism seen in people with dementia by only reducing glutamate transport in astrocytes.

A potential limitation to this conclusion would pertain to behavioral changes such as sedation or freezing that could have contributed to the effects observed with CLO and might jeopardize our interpretation of the cellular origin of the FDG-PET signal (Berti et al. 2014). However, we did not observe changes either in the open-field task or in a more complex behavioral task such as the NOR. Thus, it seems that CLO-induced FDG hypometabolism is not related to major behavioral changes.

In summary, our results provide microPET evidence that a treatment with CLO causes a reduction in FDG-PET signal. Primary culture data indicate that astrocytes, not neurons, are the cells responsible for this phenomenon. These results corroborate the notion that the FDG-PET

signal might reflect not only neuronal activity but also astrocyte metabolism. These findings reinforce the need for a renewed interpretation of FDG-PET data in brain imaging studies. Finally, from a clinical perspective, CLO is an important anti-psychotic drug widely used in patients with schizophrenia who are either intolerant or refractory to classical neuroleptics (Conley and Kelly 2001). CLO mechanisms of action are yet not fully understood; therefore, the effect on brain energetics observed in our study might be of importance and should be better studied in this perspective. As a matter of fact, a FDG-PET hypometabolism in the frontal cortex of CLO-responsive patients has been reported a few years ago (Cohen et al. 1997; Molina et al. 2007; Molina et al. 2005). We believe this phenomenon deserves further investigation in clinical research.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05682-3>.

Acknowledgements We would like to thank Prof. Dr. Elaine Elisabet-sky for donating CLO for cell cultures and HPLC experiments.

Author contribution AR, BB, DGS, DS, and ERZ participated in the conceptualization, design, and interpretation of the experiments. DGS, BB, and AR carried out the culture preparation and maintenance. BB performed the qRT-PCR procedure. GTV and SG performed the PET imaging procedure. GS performed the metabolic network analysis. FUF and DM performed the HPLC procedures. AR carried out all the remaining experiments with ICF, MLS, and LSM assistance. AR and ERZ wrote the manuscript. All authors critically revised and approved the final version of the manuscript.

Funding ASR is supported by CNPq [165626/2017–8 and 141254/2019–0] and Fulbright 2021 DDRA Award. BB receives financial support from CAPES [88887.336490/2019–00]. DGS is supported by CNPq [152189/2020–3]. ICF is supported by CAPES [88887.185806/2018–00]. LSM is supported by CAPES [88887.481222/2020–00]. DOS is supported by CNPq/INCT [465671/2014–4], CNPQ/ZIKA [440763/2016–9], CNPQ/FAPERGS/PRONEX [16/2551–0000475–7], FAPERGS [19/2551–0000700–0], and CAPES [88887.507218/2020–00] [88887.507161/2020–00]. LP is supported by Inserm and Université de Poitiers. ERZ is supported by CNPq (#435642/2018–9 and #312410/2018–2), Instituto Serrapilheira (#Serra-1912-31365), Brazilian National Institute of Science and Technology in Excitotoxicity and Neuroprotection (#465671/2014–4), FAPERGS/MS/CNPq/SESRS-PPSUS (#30786.434.24734.231120170), and ARD/FAPERGS (#54392.632.30451.05032021) and Alzheimer's Association [AARGD-21-850670].

Declarations

Ethics approval All the experimental procedures were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (approval number 32983).

Conflict of interest The authors declare no competing interests.


References

- Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufman E, et al. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4879–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831078100>.
- Bouzier-Sore AK, Voisin P, Bouchaud V, Bezancon E, Franconi JM, Pellerin L. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur J Neurosci*. 2006;24:1687–94. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x>.
- Supplie LM, Duking T, Campbell G, Diaz F, Moraes CT, Gotz M, et al. Respiration-deficient astrocytes survive as glycolytic cells in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017;37:4231–42. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0756-16.2017>.
- Leino RL, Gerhart DZ, van Bueren AM, McCall AL, Drewes LR. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J Neurosci Res*. 1997;49:617–26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970901\)49:5%3c617::AID-JNR12%3c3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970901)49:5%3c617::AID-JNR12%3c3.0.CO;2-S).
- Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32:1152–66. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149>.
- Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, et al. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci*. 1998;20:291–9.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:10625–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625>.
- Takahashi S, Driscoll BF, Law MJ, Sokoloff L. Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:4616–20.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake stimulates Na⁺, K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *J Neurochem*. 1997;69:2132–7. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69052132.x>.
- Schurr A, Miller JJ, Payne RS, Rigor BM. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19:34–9.
- Bouzier-Sore AK, Voisin P, Canioni P, Magistretti PJ, Pellerin L. Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2003;23:1298–306. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000091761.61714.25>.
- Nehlig A, Wittendorp-Rechenmann E, Lam CD. Selective uptake of [¹⁴C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular ¹⁴C-tracerography combined with immunohistochemistry. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2004;24:1004–14. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000128533.84196.D8>.
- Barros LF, Courjaret R, Jakoby P, Loaiza A, Lohr C, Deitmer JW. Preferential transport and metabolism of glucose in Bergmann glia over Purkinje cells: a multiphoton study of cerebellar slices. *Glia*. 2009;57:962–70. <https://doi.org/10.1002/glia.20820>.
- Chuquet J, Quilichini P, Nimchinsky EA, Buzsaki G. Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30:15298–303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0762-10.2010>.
- Bittner CX, Valdebenito R, Ruminot I, Loaiza A, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, et al. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K⁺ and a delayed and persistent effect of glutamate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31:4709–13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5311-10.2011>.
- Jakoby P, Schmidt E, Ruminot I, Gutierrez R, Barros LF, Deitmer JW. Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared with neurons: a multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *Cereb Cortex*. 2014;24:222–31. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs309>.
- Cholet N, Pellerin L, Welker E, Lacombe P, Seylaz J, Magistretti P, et al. Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2001;21:404–12. <https://doi.org/10.1097/00004647-200104000-00009>.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, et al. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron*. 2003;37:275–86. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01170-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01170-4).
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 2001;65:1–105.
- Zhou Y, Danbolt NC. GABA and glutamate transporters in brain. *Front Endocrinol*. 2013;4:165. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>.
- Dienel GA. Brain glucose metabolism: integration of energetics with function. *Physiol Rev*. 2019;99:949–1045. <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>.
- Reivich M, Kuhl D, Wolf A, Greenberg J, Phelps M, Ido T, et al. Measurement of local cerebral glucose metabolism in man with ¹⁸F-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1977;64:190–1.
- Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol*. 1979;6:371–88. <https://doi.org/10.1002/ana.410060502>.
- Magistretti PJ, Pellerin L. The contribution of astrocytes to the ¹⁸F-2-deoxyglucose signal in PET activation studies. *Mol Psychiatry*. 1996;1:445–52.
- Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999;354:1155–63. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0471>.
- Bonvento G, Sibson N, Pellerin L. Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci*. 2002;25:359–64. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02168-9](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02168-9).
- Figley CR, Stroman PW. The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals. *Eur J Neurosci*. 2011;33:577–88. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07584.x>.
- Sestini S. The neural basis of functional neuroimaging signal with positron and single-photon emission tomography. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64:1778–84. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7056-4>.
- Garcia-Caceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, Legutko B, et al. Astrocytic insulin signaling couples brain glucose uptake with nutrient availability. *Cell*. 2016;166:867–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.028>.
- Zimmer ER, Parent MJ, Souza DG, Leuzy A, Lecrux C, Kim HI, et al. [¹⁸F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nat Neurosci*. 2017;20:393–5. <https://doi.org/10.1038/nn.4492>.

- Iaccarino L, Sala A, Caminiti SP, Perani D. The emerging role of PET imaging in dementia. *F1000Res*. 2017;6:1830. doi:<https://doi.org/10.12688/f1000research.11603.1>.
- Zetterberg H, Bendlin BB. Biomarkers for Alzheimer's disease—preparing for a new era of disease-modifying therapies. *Mol Psychiatry*. 2021;26:296–308. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0721-9>.
- Perani D, Iaccarino L, Jacobs AH, Group IBIW. Application of advanced brain positron emission tomography-based molecular imaging for a biological framework in neurodegenerative proteinopathies. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2019;11:327–32. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.02.004>.
- Chetelat G, Arbizu J, Barthel H, Garibotto V, Law I, Morbelli S, et al. Amyloid-PET and (18)F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. *The Lancet Neurology*. 2020;19:951–62. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30314-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30314-8).
- Melone M, Vitellaro-Zuccarello L, Vallejo-Illarramendi A, Perez-Samartin A, Matute C, Cozzi A, et al. The expression of glutamate transporter GLT-1 in the rat cerebral cortex is down-regulated by the antipsychotic drug clozapine. *Mol Psychiatry*. 2001;6:380–6. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000880>.
- Vallejo-Illarramendi A, Torres-Ramos M, Melone M, Conti F, Matute C. Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. *Glia*. 2005;50:276–9. <https://doi.org/10.1002/glia.20172>.
- Terry AV Jr, Hill WD, Parikh V, Waller JL, Evans DR, Mahadik SP. Differential effects of haloperidol, risperidone, and clozapine exposure on cholinergic markers and spatial learning performance in rats. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2003;28:300–9. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300039>.
- Melone M, Bragina L, Conti F. Clozapine-induced reduction of glutamate transport in the frontal cortex is not mediated by GLAST and EAAC1. *Mol Psychiatry*. 2003;8:12–3. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001193>.
- Cremers TT, Flik G, Hofland C, Stratford RE Jr. Microdialysis evaluation of clozapine and N-desmethylclozapine pharmacokinetics in rat brain. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2012;40:1909–16. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.045682>.
- Naheed M, Green B. Focus on clozapine. *Curr Med Res Opin*. 2001;17:223–9. <https://doi.org/10.1185/0300799039117069>.
- Bellaver B, Rocha AS, Souza DG, Leffa DT, De Bastiani MA, Schu G, et al. Activated peripheral blood mononuclear cell mediators trigger astrocyte reactivity. *Brain Behav Immun*. 2019;80:879–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.041>.
- Schu G, Brum WS, Rodrigues YE, Cesar de Azeredo J, Pascoal TA, Benedet AL, et al. Stable brain PET metabolic networks using a multiple sampling scheme. *bioRxiv*. 2021:2021.03.16.435674. doi:<https://doi.org/10.1101/2021.03.16.435674>.
- Rubinov M, Sporns O. Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. *Neuroimage*. 2010;52:1059–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.003>.
- Almeida RF, Comassetto DD, Ramos DB, Hansel G, Zimmer ER, Loureiro SO, et al. Guanosine anxiolytic-like effect involves adenosinergic and glutamatergic neurotransmitter systems. *Mol Neurobiol*. 2017;54:423–36. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9660-x>.
- Nunez J. Primary culture of hippocampal neurons from P0 newborn rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2008. doi:<https://doi.org/10.3791/895>
- Taxt T, Storm-Mathisen J. Uptake of D-aspartate and L-glutamate in excitatory axon terminals in hippocampus: autoradiographic and biochemical comparison with gamma-aminobutyrate and other amino acids in normal rats and in rats with lesions. *Neuroscience*. 1984;11:79–100.
- Davies LP, Johnston GA. Uptake and release of D- and L-aspartate by rat brain slices. *J Neurochem*. 1976;26:1007–14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1976.tb06485.x>.
- Debernardi R, Magistretti PJ, Pellerin L. Trans-inhibition of glutamate transport prevents excitatory amino acid-induced glycolysis in astrocytes. *Brain Res*. 1999;850:39–46. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02022-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02022-3).
- Bellaver B, Dos Santos JP, Leffa DT, Bobermin LD, Roppa PHA, da Silva Torres IL, et al. Systemic inflammation as a driver of brain injury: the astrocyte as an emerging player. *Mol Neurobiol*. 2018;55:2685–95. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0526-2>.
- Souza DG, Bellaver B, Hansel G, Arus BA, Bellaver G, Longoni A, et al. Characterization of amino acid profile and enzymatic activity in adult rat astrocyte cultures. *Neurochem Res*. 2016;41:1578–86. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1871-7>.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003;463:3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X).
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15:1835–53.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*. 2005;433:73–7. <https://doi.org/10.1038/nature03180>.
- Xiang X, Wind K, Wiedemann T, Blume T, Shi Y, Briel N, et al. Microglial activation states drive glucose uptake and FDG-PET alterations in neurodegenerative diseases. *Science translational medicine*. 2021;13:eabe5640. doi:<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc5640>.
- Gavillet M, Allaman I, Magistretti PJ. Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia*. 2008;56:975–89. <https://doi.org/10.1002/glia.20671>.
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry*. 2005;10:79–104. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001556>.
- Stepnicki P, Kondej M, Kaczor AA. Current concepts and treatments of schizophrenia. *Molecules*. 2018;23. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules23082087>.
- Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:316–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.316>.
- Scremin OU, Jenden DJ. Acetylcholine turnover and release: the influence of energy metabolism and systemic choline availability. *Prog Brain Res*. 1993;98:191–5. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62398-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62398-5).
- Rothman DL, Sibson NR, Hyder F, Shen J, Behar KL, Shulman RG. In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999;354:1165–77. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0472>.
- Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Shulman RG. In vivo NMR studies of the glutamate neurotransmitter flux and neuroenergetics: implications for brain function. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:401–27. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142131>.
- Chen AT, Nasrallah HA. Neuroprotective effects of the second generation antipsychotics. *Schizophr Res*. 2019;208:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.04.009>.
- Lundberg M, Curbo S, Bohman H, Agartz I, Ogren SO, Patrone C, et al. Clozapine protects adult neural stem cells from ketamine-induced

- cell death in correlation with decreased apoptosis and autophagy. *Bioscience reports*. 2020;40. 10.1042/BSR20193156.
- Bastianetto S, Danik M, Mennicken F, Williams S, Quirion R. Prototypical antipsychotic drugs protect hippocampal neuronal cultures against cell death induced by growth medium deprivation. *BMC Neurosci*. 2006;7:28. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-28>.
- Stanisavljevic A, Peric I, Bernardi RE, Gass P, Filipovic D. Clozapine increased c-Fos protein expression in several brain subregions of socially isolated rats. *Brain Res Bull*. 2019;152:35–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.07.005>.
- Berti V, Mosconi L, Pupi A. Brain: normal variations and benign findings in fluorodeoxyglucose-PET/computed tomography imaging. *PET Clin*. 2014;9:129–40. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2013.10.006>.
- Conley RR, Kelly DL. Management of treatment resistance in schizophrenia. *Biol Psychiat*. 2001;50:898–911. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01271-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01271-9).
- Cohen RM, Nordahl TE, Semple WE, Andreason P, Litman RE, Pickar D. The brain metabolic patterns of clozapine- and fluphenazine-treated patients with schizophrenia during a continuous performance task. *Arch Gen Psychiatry*. 1997;54:481–6.
- Molina V, Sanz J, Sarramea F, Palomo T. Marked hypofrontality in clozapine-responsive patients. *Pharmacopsychiatry*. 2007;40:157–62. <https://doi.org/10.1055/s-2007-984399>.
- Molina V, Gisbert JD, Reig S, Sanz J, Pascau J, Santos A, et al. Cerebral metabolic changes induced by clozapine in schizophrenia and related to clinical improvement. *Psychopharmacology*. 2005;178:17–26. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1981-9>.
- Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Andréia Rocha¹ · Bruna Bellaver¹ · Débora G. Souza¹ · Guilherme Schu^{1,2} · Igor C. Fontana¹ · Gianina T. Venturin³ · Samuel Greggio³ · Fernanda U. Fontella¹ · Manoela L. Schiavenin¹ · Luiza S. Machado¹ · Diogo Miron⁴ · Jaderson C. da Costa³ · Pedro Rosa-Neto^{5,6} · Diogo O. Souza^{1,7} · Luc Pellerin⁸ · Eduardo R. Zimmer^{1,9,10} 

¹ Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Proaction Laboratory, Faculty of Psychology and Education Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

³ Preclinical Research Center, Brain Institute (BraIns) of Rio Grande Do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande Do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

⁴ Faculty of Pharmacy, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁵ Translational Neuroimaging Laboratory, McGill University Research Centre for Studies in Aging, Douglas Research Institute, Le Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSSS) de l'Ouest-de-l'Île-de-Montréal, Montreal, Canada

⁶ Department of Neurology and Neurosurgery, Psychiatry and Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Canada

⁷ Department of Biochemistry, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil

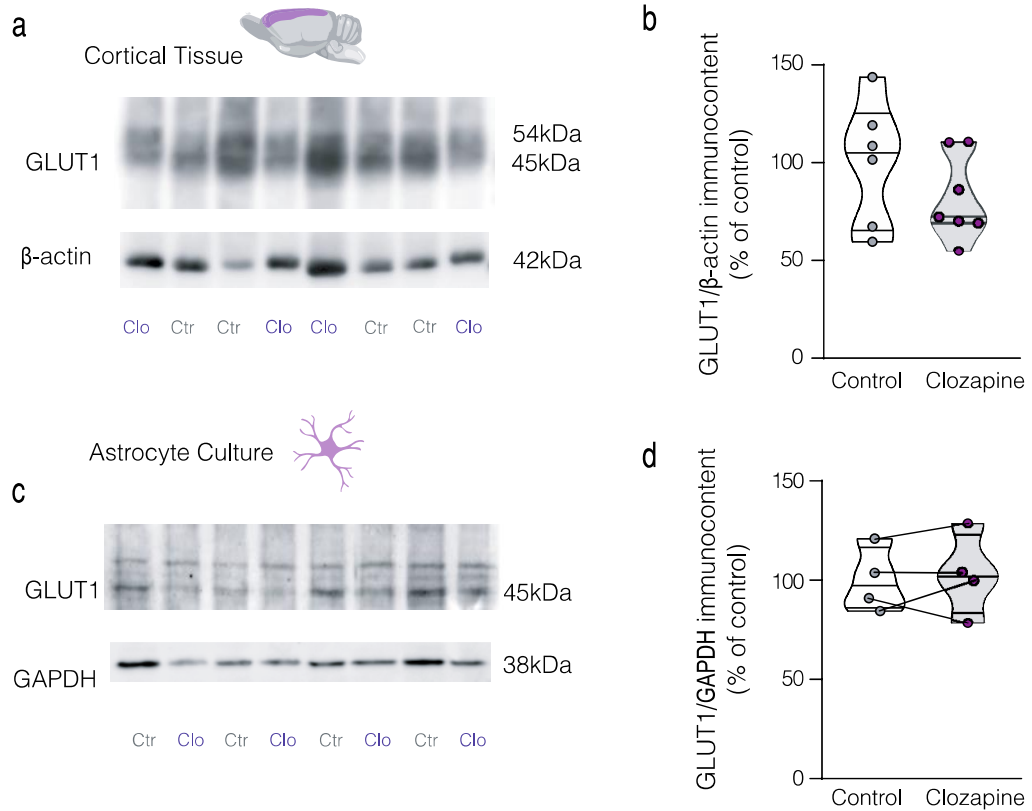
⁸ Inserm U1313, Université et CHU de Poitiers, Poitiers, France

⁹ Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil

¹⁰ Department of Pharmacology, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, (UFRGS), 2600 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

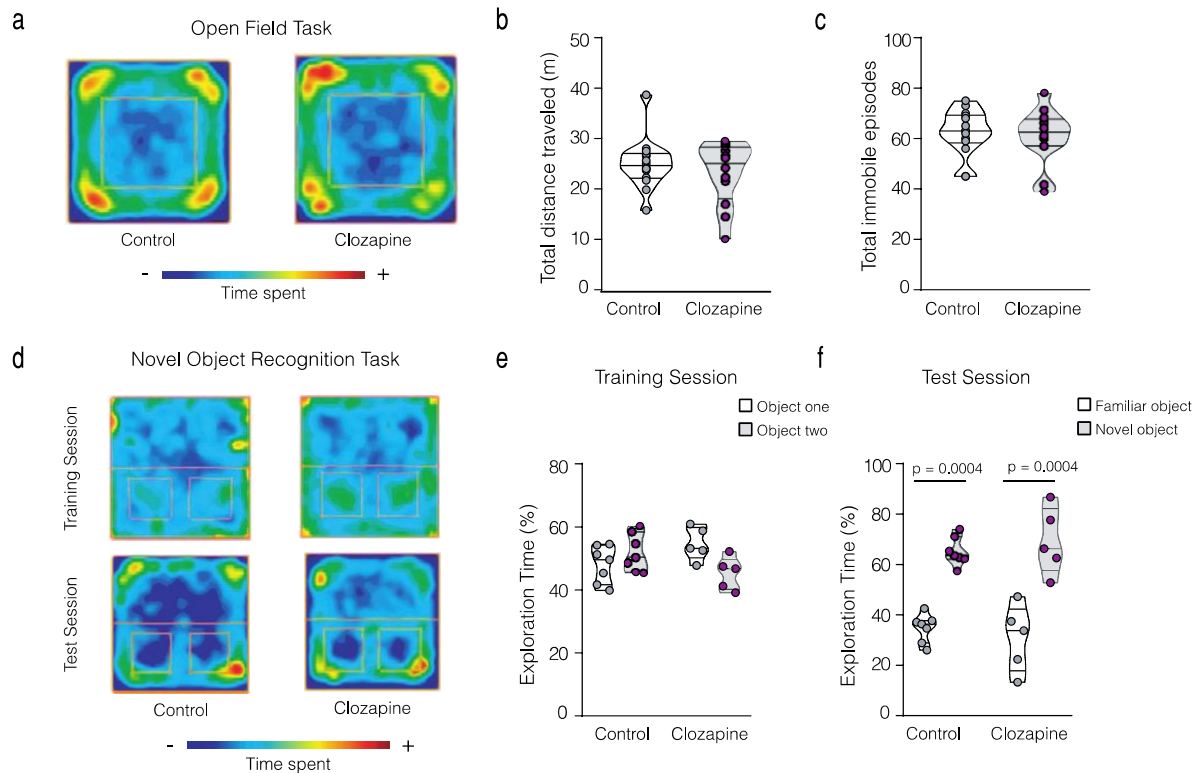
Supplemental Data

1. Supplementary Figures



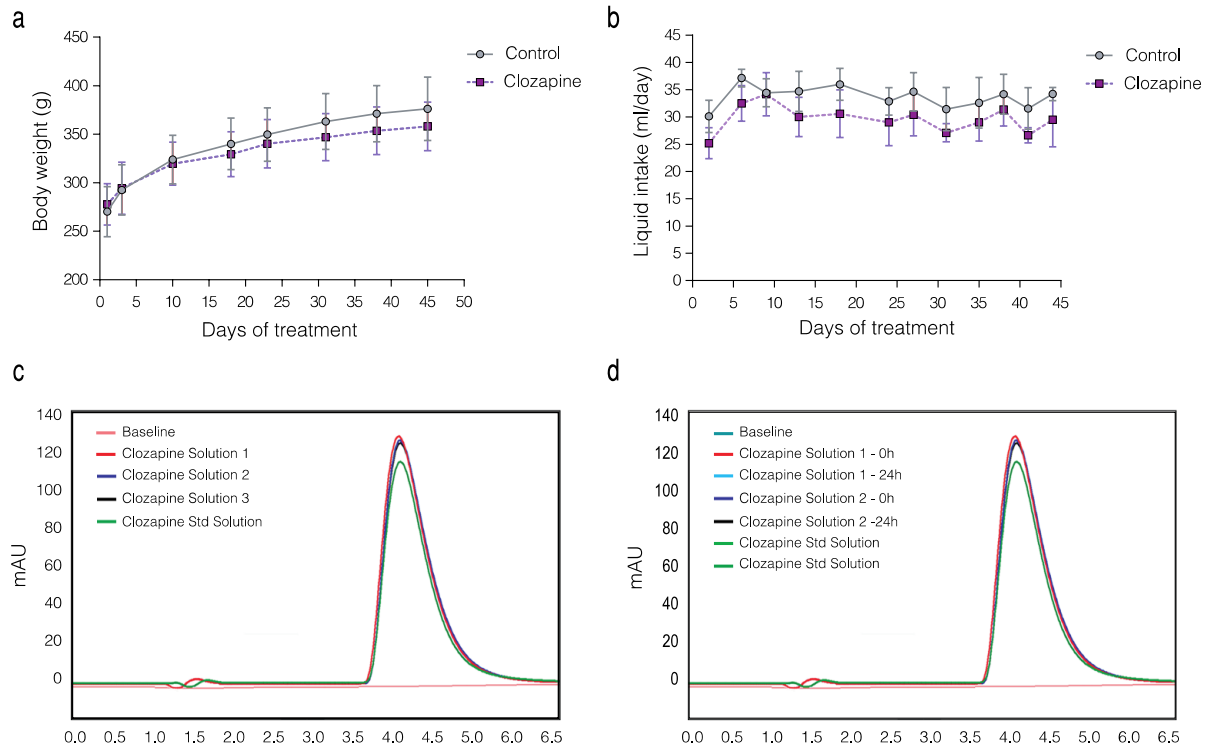
Supplementary Figure 1: GLUT1 immunocontent in tissue and culture samples.

Glucose transporter GLUT1 immunocontent in the cortical tissue (normalized by the β -actin immunocontent; control, n = 6; CLO, n = 7) (**a, b**) and in primary cortical astrocyte cultures (normalized by GAPDH immunoreactivity; n = 4 for each group) (**c, d**). Data represented as violin plots indicating the mean interquartile range and, the minimum and maximum values. Unpaired or paired two-tailed *student's t-test*.



Supplementary Figure 2: Behavioral analysis following CLO treatment.

(A) Representative occupancy plot of control and CLO groups in the Open Field task after the treatment period. **(B)** Total distance traveled in the Open Field task. **(C)** Total immobile time in the Open Field task; (control, $n = 14$; CLO, $n = 12$). **(D)** Representative occupancy plot in the NOR task of control and CLO groups for the training and test sessions. **(E)** Percentage of time exploring the objects for the training session of the NOR task. **(F)** Percentage of time exploring the objects for the test session of the NOR task; (control, $n = 7$; CLO, $n = 5$). Data are represented as violin plots indicating the mean, interquartile range, and minimum and maximum values. One-sample t-test with hypothetical value = 50%.



Supplementary Figure 3: Body weight, volume intake, and CLO stability

(A) Body weight in control and CLO groups across the treatment period. **(B)** Volume intake across the treatment period in control and CLO groups (control, $n = 12$; CLO, $n = 14$). Data presented as mean \pm S.D. **(C)** High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) chromatogram showing the homogeneity of CLO preparations compared to a standard sample. **(D)** HPLC Chromatogram showing the stability of the CLO solutions after a 24 h period at room temperature.

2. Supplementary Methods

2.1 [¹⁸F]FDG microPET scanning

Rats were scanned longitudinally before treatment (Baseline), at PND 90, and after 6 weeks of treatment (Follow-up), at PND 136. After overnight fasting, animals were anesthetized using a mixture of isoflurane and medical oxygen (3–4% induction dose) and received an intravenous injection (0.4 mL) of [¹⁸F]FDG (mean \pm s.d.: 1.03 ± 0.07 mCi) into the tail vein. Then, each rat was returned to its home cage for a 40 min period of conscious (awake) uptake of [¹⁸F]FDG, which was followed by a 10 min static acquisition under anesthesia (2% isoflurane at 0.5 L/min oxygen flow). PET measurements were performed on a Triumph™ micro-PET [LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA (for LabPET-4 technical information see Bergeron et al [1])]. The brain was positioned in the center of the field of view (FOV; 3.75 cm) and body temperature was maintained at 36.5 ± 1 °C. All data were reconstructed using the maximum likelihood estimation method (MLEM-3D) algorithm with 20 iterations. Each micro-PET image was reconstructed with a voxel size of $0.2 \times 0.2 \times 0.2$ mm and spatially normalized into an [¹⁸F]FDG template using brain normalization in PMOD v3.8 and the Fuse It Tool (PFUSEIT) (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland) [2]. The subsequent imaging analysis was conducted using the minc-tools software (developed at McGill University and available at <http://www.bic.mni.mcgill.ca/ServicesSoftware/MINC>). Standardized uptake value reference (SUVr) was calculated using the pons as the reference region. Mean SUVrs of 14 brain regions and whole brain were extracted using a predefined volume of interest (VOI) template.

2.2 Synaptosomal preparation and L-[³H]glutamate (L-[³H]Glut) the potassium-stimulated release

This procedure was performed as previously described [3]. Whole cortex (left hemisphere) tissue samples were homogenized in a buffer sucrose solution (0.32 M sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA and, 1 mM DTT; pH = 7.4). Homogenates were centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was centrifuged at 11000 g for 20 min at 4 °C. The synaptosomal-enriched pellet was then washed three times with HBSS-low K⁺ (in mM: 133 NaCl, 2.4 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.0 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 27.7 HEPES and 12 glucose, pH 7.4) by centrifugation at 14,000 g

for 10 min at 4 °C, to remove excess sucrose. The final pellet was resuspended in HBSS-low K⁺ containing 0.33 µCi/mL L-[³H]Glut and 100 µM of L-glutamate, followed by a 15 min incubation at 37 °C, for glutamate uptake. Then, synaptosomal preparations were immediately put on ice and washed three times with ice-cold HBSS-low K⁺, by centrifugation at 16,000 g for 10 min at 4 °C. This final pellet was resuspended in HBSS-low K⁺ and divided into tubes containing HBSS-low K⁺ and tubes containing HBSS-high K⁺ (in mM: 95.5 NaCl, 40.4 KCl, 1.20 KH₂PO₄, 1.0 CaCl₂, 1.20 MgSO₄, 27.7 HEPES and 12 glucose, pH 7.4). The HBSS-low K⁺ and HBSS-high K⁺ tubes were incubated for 1 min at 37 °C for release. The release process was slowed down by immediately putting the tubes on ice, followed by centrifugation at 16,000 g for 1 min at 4 °C. Supernatant radioactivity was measured using a liquid scintillation counter. Protein content was determined using the bicinchoninic acid assay (Thermo Fischer Scientific, Waltham-MA/USA). Experiments were performed in triplicate.

2.3 Sodium-dependent D-[2,3-³H]-aspartate (D-[³H]Asp) uptake

D-[³H]Asp is a substrate for the high-affinity sodium-dependent glutamate transport system, however, its main advantage is that, unlike L-glutamate or L-aspartate, D-aspartate does not undergo rapid metabolism, therefore, its uptake was used as a proxy of glutamate uptake [4, 5]. The sodium-dependent D-[³H]Asp uptake was assessed in adult cortical slices (137-140 PND rats) and primary cultured astrocytes (P1-2 rats). For ex-vivo experiments, slices (300 µm) of the whole cortex (right hemisphere), from 137-140 PND rats, were rapidly obtained using a McIlwain Tissue Chopper. For in vitro experiments, cells were rinsed once with a modified HBSS Hanks' balanced salt solution (HBSS; in mM: 137 NaCl, 0.63 Na₂HPO₄, 4.17 NaHCO₃, 5.36 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂ and 5.55 glucose, pH 7.2). Cortical slices were preincubated with HBSS at 37 °C for 30 min. Following, slices were incubated with HBSS containing 0.33 µCi/mL of D-[³H]Asp in presence of 100 µM of L-glutamate, while astrocyte cell cultures were incubated with HBSS containing 0.33 µCi/mL of D-[³H]Asp in presence of 10 µM (basal) or 100 µM of L-glutamate (stimulated). Incubation was stopped after 7 min with three washes with ice-cold HBSS and slices or cells were lysed overnight with NaOH 0.5 M. To determine the Na⁺-independent uptake, the same procedure was repeated using the aforementioned protocol with modifications in the temperature (4 °C) and composition of the HBSS

medium (in mM: 137 N-methyl-D-glucamine-HCl, 0.82 N-methyl-D-glucamine-HEPES, 5.36 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂ and 5.55 glucose, pH 7.2). The Na⁺-dependent uptake was calculated as the difference between the total uptake and the Na⁺-independent uptake. Incorporated radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Hidex 300 SL, Mikrotek Labor system, Overath/Germany). Protein content was determined using the bicinchoninic acid assay (Thermo Fischer Scientific, Waltham/USA). Experiments were performed in quadruplicate.

2.4 2-Deoxy-D-[³H]glucose ([³H]2DG) uptake

[³H]2DG uptake was assessed in neuronal (P0-1 rats) and astrocyte (P1-2 rats) cultures as previously described [6] with modifications. Briefly, cells were rinsed once with HBSS and incubated with DMEM 1 % FBS or Neurobasal medium containing 1 µCi/mL [³H]2DG in the absence (Basal) or in the presence of 100 µM glutamate (Stimulated) for 20 min at 37 °C. After incubation, cells were immediately rinsed three times with cold HBSS and lysed overnight with NaOH 0.5 M. Incorporated radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Hidex 300 SL, Mikrotek Laborsysteme, Overath, Germany). Protein content was determined using the bicinchoninic acid assay (Thermo Fischer Scientific, Waltham/USA). Experiments were performed in triplicate.

2.5 SDS-PAGE

Whole cortex (left hemisphere) from 137-140 PND rats or astrocyte cultures were immediately solubilized in RIPA buffer (Bio-Rad, Hercules-CA/USA) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich). Samples were standardized in sample buffer (Bio-Rad), separated by SDS-PAGE (10 µg or 20 µg protein/well) and transferred to a nitrocellulose membrane. Subsequently, membranes were incubated overnight at 4 °C with the following antibodies: GLT-1 (1:1000 dilution, Alpha diagnostic, San Antonio-TX/USA), glutamate-aspartate transporter (GLAST, 1:2000 dilution, Alpha diagnostic), Glucose transporter 1 (GLUT1, 1:800 dilution, cell signaling, Danvers-MA/US), β-actin (1:10000 dilution, abcam, Cambridge/UK or GE Healthcare, Amersham/UK) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, 1:4000 dilution, abcam). Then, membranes were incubated with horseradish peroxidase conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG (1:5000 dilution, GE Healthcare)

secondary antibody for 2 h at RT. Chemiluminescent bands were detected in the ImageQuant LAS4000 system (GE Healthcare) using an Immobilon™ Western chemiluminescence kit (Merck Millipore, Burlington-MA/USA). Results are expressed in percent of control levels after normalization using β -actin or GAPDH as an internal standard.

2.6 RNA extraction and quantitative real time PCR (qRT-PCR)

The whole cortex (right hemisphere) was dissected out from 137-140 PND rats. Total RNA was extracted using TRIzol Reagent according to manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad-CA/USA). The concentration and purity of RNA were spectrophotometrically determined at a ratio of 260/280 nm. Subsequently, 1 μ g of total RNA was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City-CA/USA) in a 20 μ L reaction, according to the manufacturer's instructions. The mRNAs of GLT-1 and GLAST were quantified using the TaqMan qRT-PCR system with inventory primers and probes purchased from Applied Biosystem. β -actin mRNA levels (primers 5'-CAACGAGCGGTTCCGAT-3' and 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3') were also quantified using the TaqMan real-time qRT-PCR system. Target mRNA levels were normalized to β -actin levels using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [7]. Experiments were performed in triplicate.

2.7 High-performance liquid chromatography (HPLC) procedure

High-performance liquid chromatography (HPLC) procedure was performed as previously described [8] using cerebrospinal fluid (CSF) to quantify three amino acids: glutamate (Glu), aspartate (Asp) and glutamine (Gln). The CSF was filtered (0.22 μ m pore) and the analysis was performed in a Shimadzu Class-VP chromatography system with fluorescence detector using a Supelco Supelcosil LC-18 column (250 x 4.6 mm, 5 μ m particle size) Chromatographic parameters were set as follows: flow rate 1.4 mL/min; temperature 24 °C; injection volume 40 μ L; mobile phase consisting of: buffer A = H_4NaO_5P pH 5.5 (0.04 mol/L): methanol (20:80); buffer B = H_4NaO_5P pH 5.5 (0.01 mol/L) : methanol (80:20). The gradient profile was modified according to the content of buffer B in the mobile phase:100% at 0.10min, 90% at 15min, 48% at 10min, 100% at 60min. Detection was performed at 360nm and 455nm, excitation and emission respectively. For glutamine determination, samples were diluted 10x. The experiments were performed in duplicates.

2.8 Immunofluorescence analysis

Immunofluorescence was performed as described previously by our group [31]. Cell cultures were fixed with 4% paraformaldehyde for 20min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min at RT. After blocking overnight with 4% albumin, cells were incubated overnight with anti- β -Tubulin III (1:500 dilution, Abcam, Cambridge/UK) and/or anti-GFAP (1:400 dilution, Dako, Carpinteria/USA) at 4°C, followed by PBS washes and incubation with a specific secondary antibody conjugated with Alexa Fluor® 488 or 594 (Thermo Fischer Scientific, Waltham/USA) for 1h at RT. For all immunostaining-negative control reactions, the primary antibody was omitted. No reactivity was observed when the primary antibody was excluded. Cell nuclei were stained with 0.2 mg/mL of 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI; Merck Millipore, Billerica/USA) for 10 min.

2.9 Open Field

At the end of the six weeks of treatment, two days before the final imaging procedure, at PND 134, rats were submitted to an open field task to evaluate locomotion, sedative and freezing behavior [9]. The apparatus was made of black-painted Plexiglas measuring 50×50 cm and was surrounded by 50 cm high walls. Each rat was placed in the center of the arena and allowed to walk and explore it for 10 min. Experiments were conducted in a sound-attenuated room under low-intensity light. The rat's activity was recorded with a video camera positioned above the arena. Locomotion was analyzed using a computer-operated tracking system (Any-maze, Stoelting, Woods Dala/USA).

2.10 Novel Object Recognition Task

The novel object recognition (NOR) task was carried out 24hs after the OF as previously described [10]. Rats underwent a training session in which two identical objects were placed in parallel on one side of the arena. Rats were placed individually into the open field facing the center of the opposite wall and allowed to explore the objects for 10 min. The test session was performed 90min after training and two dissimilar objects were presented, a familiar one and a novel one. Rats' activity was recorded with a video camera positioned above the arena and analyzed by an observer blind to the treatment of animals. Exploration was defined as directing the nose toward

the object at a distance of at least 2 cm and/or touching the object with the nose or forepaws. Rearing on the object was not considered exploratory behavior. Animals that exhibited a total exploration time of less than 10 seconds or showed an evident preference for an object in the training session were excluded from the analysis.

2.11 CLO high-performance liquid chromatography

An HPLC with ultraviolet detection (UV) method was applied to verify CLO presence and stability in the animals drinking solution. Chromatographic separation was conducted on an Agilent Zorbax SB-C18 column (2.1 x 50 mm, 1.8 μ m, particle size) with a C-18 pre-column. Chromatographic parameters were set as follows: flow rate 0.2 mL/min; temperature 25 °C; injection volume 2 μ L; mobile phase consisting of phosphate buffer pH 3.5 (0.5% KH_2PO_4 , 5% H_3PO_4):acetonitrile:methanol (63:25:12 v/v); UV detection at 292 nm. Three independent solutions of CLO were prepared as previously described in section 2.2 of the article and analyzed concerning reproducibility and expected concentration. To assess stability, the same solutions were left at room temperature and analyzed 24h later.

2.12 Statistical Analysis

A Two-way ANOVA with repeated measures analysis was used for whole brain and regional SUVr data. A two-tailed unpaired Student's t-test was used for statistical analysis of the tissue SDS-PAGE, qRT-PCR, cerebrospinal fluid (CSF) amino acids, brain slices D- ^3H Asp uptake, L- ^3H Glut release and OF. A two-tailed paired Student's t-test was used for astrocytes and neurons culture data: SDS-PAGE, basal and stimulated D- ^3H Asp uptake, basal and stimulated ^3H 2DG uptake. The percentage of control data of the D- ^3H Asp and ^3H 2DG uptake in cell assays was analyzed by Two-way ANOVA. One-sample t-test (hypothetical value = 50 %) was used to evaluate the novel object recognition test. Two-way ANOVA with repeated measures was used for the weight and volume intake data analysis. Normality was evaluated using histograms and quantile plots. Data represented as violin plots indicating the mean, interquartile range and, the minimum and maximum values. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. GraphPad Prism 8 was used for statistical analysis.

References

1. Bergeron M, Cadorette J, Tetrault MA, Beaudoin JF, Leroux JD, Fontaine R, et al. Imaging performance of LabPET APD-based digital PET scanners for pre-clinical research. *Physics in medicine and biology*. 2014;59:661-78. doi:10.1088/0031-9155/59/3/661.
2. Bellaver B, Rocha AS, Souza DG, Leffa DT, De Bastiani MA, Schu G, et al. Activated peripheral blood mononuclear cell mediators trigger astrocyte reactivity. *Brain, behavior, and immunity*. 2019;80:879-88. doi:10.1016/j.bbi.2019.05.041.
3. Almeida RF, Comasseto DD, Ramos DB, Hansel G, Zimmer ER, Loureiro SO, et al. Guanosine Anxiolytic-Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems. *Molecular neurobiology*. 2017;54:423-36. doi:10.1007/s12035-015-9660-x.
4. Taxt T, Storm-Mathisen J. Uptake of D-aspartate and L-glutamate in excitatory axon terminals in hippocampus: autoradiographic and biochemical comparison with gamma-aminobutyrate and other amino acids in normal rats and in rats with lesions. *Neuroscience*. 1984;11:79-100.
5. Davies LP, Johnston GA. Uptake and release of D- and L-aspartate by rat brain slices. *Journal of neurochemistry*. 1976;26:1007-14. doi:10.1111/j.1471-4159.1976.tb06485.x.
6. Pellerin L, Magistretti PJ. 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*. 1994;91:10625-9. doi:10.1073/pnas.91.22.10625.
7. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25:402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
8. Souza DG, Bellaver B, Hansel G, Arus BA, Bellaver G, Longoni A, et al. Characterization of Amino Acid Profile and Enzymatic Activity in Adult Rat Astrocyte Cultures. *Neurochemical research*. 2016;41:1578-86. doi:10.1007/s11064-016-1871-7.
9. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. 2003;463:3-33. doi:10.1016/s0014-2999(03)01272-x.
10. Espinosa J, Rocha A, Nunes F, Costa MS, Schein V, Kazlauckas V, et al. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2013;34:509-18. doi:10.3233/JAD-111982.

Capítulo II. *Soluble amyloid- β oligomers trigger brain glucose hypometabolism and network abnormalities*

No **capítulo II** apresentamos o artigo submetido para revisão no periódico *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS).

No capítulo I demonstramos que a redução em uma importante função astrocitária, a captação de glutamato, é capaz de gerar uma diminuição significativa no metabolismo cerebral de glicose e alterar o sinal do [^{18}F]FDG-PET, recapitulando o hipometabolismo de glicose visto em muitas doenças neurodegenerativas, como a DA. Este achado contraria a suposição de que a disfunção e morte neuronal são necessárias para gerar uma redução significativa no metabolismo cerebral de glicose e alterar o sinal do [^{18}F]FDG-PET.

Neste estudo, nosso objetivo foi investigar se os oligômeros de β -amiloide (A β Os), uma importante alteração patofisiológica inicial no *continuum* da DA, tem o potencial de alterar significativamente o metabolismo cerebral de glicose e o sinal do [^{18}F]FDG-PET. Atualmente, acredita-se que alterações importantes no metabolismo cerebral de glicose são um acontecimento tardio na DA, ocorrendo apenas muitos anos após a deposição das placas amiloides.

Em camundongos, a infusão de A β Os foi capaz de desencadear, de forma dose-dependente, alterações no [^{18}F]FDG-PET. Ao analisar as redes metabólicas derivadas do [^{18}F]FDG-PET, constatamos uma resposta dinâmica dos A β Os: hiperconectividade em doses baixas e hipoconectividade em doses altas. Essa hiperconectividade foi confirmada na fase pré-placa em modelos animais transgênicos de DA e em pacientes no *continuum* da DA. Esses achados indicam que as alterações no metabolismo da glicose podem ocorrer nas fases iniciais da DA, desafiando o modelo de biomarcadores atual da evolução da doença.

Capítulo III. Early metabolic and glial changes in a transgenic rat model of amyloidosis

No **capítulo III** apresentamos o artigo **Early metabolic and glial changes in a transgenic rat model of amyloidosis** em preparação para submissão no periódico *Progress in Neurobiology* no formato de *original research article*.

No **capítulo II** demonstramos que A β Os são capazes de desencadear, de forma dose-dependente, alterações no [^{18}F]FDG-PET e gerar um reposta dual na rede metabólica cerebral: hiperconectividade em doses baixas e hipoconectividade em doses altas. A hiperconectividade foi corroborada na fase pré-placas em dois modelos animais transgênicos da DA e em indivíduos no continuum da DA. Essas descobertas sugerem que as mudanças no metabolismo da glicose podem ocorrer nas fases iniciais da DA, desafiando o paradigma atual sobre a progressão da doença.

Sendo assim, decidimos investigar o metabolismo cerebral de glicose via [^{18}F]FDG-PET longitudinalmente em um modelo mais recente da DA: os ratos TgF344-AD. Em paralelo, avaliamos o comportamento, marcadores gliais, neuronais e inflamatórios específicos, bem como, a captação de glutamato nesses animais nas mesmas idades.

Nosso estudo é o primeiro a investigar longitudinalmente o metabolismo cerebral de glicose in vivo no rato TgF344-AD. Nossos resultados sugerem que esse modelo apresenta um hipermetabolismo precoce no metabolismo da glicose, que pode estar relacionado à reatividade astrócitaria e ao aumento da captação de glutamato por essas células.

PARTE III

4. Conclusão

Nessa tese de doutorado, nossa pesquisa se concentrou na utilização do [^{18}F]FDG-PET para analisar o metabolismo cerebral de glicose em relação a três aspectos cruciais: a influência dos astrócitos na interpretação desse exame, o impacto das A β Os no metabolismo cerebral de glicose e a potencial identificação de alterações no metabolismo cerebral de glicose durante a fase inicial da DA.

Em relação ao estudo apresentado no **capítulo I**, identificamos importantes evidências que corroboram a significativa contribuição dos astrócitos no metabolismo cerebral de glicose e nos resultados apresentados no [^{18}F]FDG-PET, um ponto já sugerido previamente em outros estudos (CARTER; CHIOTIS; NORDBERG; RODRIGUEZ-VIEITEZ, 2019; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015; NEHLIG; COLES, 2007; PELLERIN; MAGISTRETTI, 2012; XIANG; WIND; WIEDEMANN; BLUME *et al.*, 2021; ZIMMER; PARENT; SOUZA; LEUZY *et al.*, 2017).

Esperamos que nossos achados sejam um ponto de partida para investigações mais sofisticadas sobre a contribuição dos astrócitos, e outras células gliais, no sinal do [^{18}F]FDG-PET. Para corroborar nossos achados, outros fármacos inibidores do transporte astrocitário de glutamato, como o DHK e o WAY-855, poderiam ser testados para verificar se são capazes de reproduzir o efeito da clozapina. Além disso, para obter mais especificidade, intervenções genéticas focando na redução da expressão ou funcionamento de GLT-1 e GLAST seriam importantes para confirmar estes resultados. De fato, esforços nesse sentido já estão em andamento em nosso laboratório. RNAs de interferência que tem como o alvo o GLT-1 estão sendo testados em culturas astrocitárias. No entanto, ainda estamos nas fases preliminares desse trabalho.

Ainda no contexto do estudo do **capítulo I**, é importante ressaltar que não estamos propondo que os neurônios sejam irrelevantes no [^{18}F]FDG-PET, nem que a atividade sináptica, direta ou indiretamente, não seja o principal fator impulsionador do sinal. Os nossos dados, entretanto, apontam que os neurônios não sejam os únicos responsáveis pelo sinal do exame, uma vez que outras células no cérebro também tem a habilidade de captar e metabolizar glicose. Com base em estudos anteriores e em nossas observações, sugerimos que os astrócitos podem influenciar significativamente o metabolismo cerebral e, como consequência, o [^{18}F]FDG-PET. Acreditamos que esse seja um ponto importante a ser incluído na interpretação desse

exame, pois implicaria que uma disfunção exclusivamente astrocitária poderia afetar independentemente os seus resultados. Esperamos que nossa pesquisa, em conjunto com outros trabalhos, contribua para o esclarecimento das bases celulares desse procedimento e permita uma melhor compreensão dos fascinantes resultados que essa técnica oferece.

No que diz respeito ao estudo apresentado no **capítulo II**, de acordo com nosso conhecimento, está é a primeira vez que efeito de A β O_s no metabolismo cerebral de glicose são investigados in vivo. Portanto, nosso trabalho fornece uma nova evidência do impacto dos A β O_s no metabolismo de glicose, uma associação previamente sugerida apenas por estudos in vitro e ex vivo (PEARSON-LEARY; MCNAY, 2012; SEIXAS DA SILVA; MELO; LOURENCO; LYRA *et al.*, 2017; TARCZYLUK; NAGEL; RHEIN PARRI; TSE *et al.*, 2015). Ademais, em nosso trabalho, a presença de alterações no metabolismo cerebral de glicose detectáveis com o uso do [¹⁸F]FDG-PET na ausência de placas de amiloide foi identificada em outros modelos animais e em indivíduos negativos para o exame de PET amiloide. Esses resultados trazem uma nova perspectiva a ser considerada nos modelos teóricos da evolução temporal de biomarcadores na DA.

Com isso em mente, decidimos investigar longitudinalmente o metabolismo cerebral de glicose em um modelo transgênico da DA, buscando entender quando as primeiras alterações nesse processo acontecem, como elas evoluem e quais eventos fisiopatológicos estariam associados com essas alterações, especialmente, em quais tipos celulares. Para isso, realizamos o trabalho apresentado no **capítulo III**, onde ratos TgF344-AD foram acompanhados longitudinalmente e escaneados com [¹⁸F]FDG-PET em quatro diferentes idades (3, 6, 9 e 12 meses). Paralelamente, também examinamos, longitudinalmente, o comportamento e monitoramos os níveis de biomarcadores de fluido associados a células gliais e processos inflamatórios em ratos TgF344-AD nas mesmas idades. Além disso, realizamos análises transversais para investigar a deposição de placas de A β , os níveis de proteínas celulares específicas e a captação de glutamato no córtex temporal e hipocampo desses animais. Nesse trabalho, encontramos novamente indícios de alteração no metabolismo cerebral de glicose em fases iniciais da amiloidose. Os ratos TgF344-AD apresentaram hipermetabolismo de glicose cerebral aos 9 meses de idade, apenas três meses após os primeiros depósitos de placas de A β aparecerem.

Além disso, as alterações no metabolismo cerebral de glicose não ocorreram isoladamente; elas foram acompanhadas por modificações nos níveis de marcadores astrocitários e de uma importante função dessas células, a captação de glutamato - o mesmo mecanismo indicado no trabalho do **capítulo I**. Essa associação sugere a possibilidade de uma relação intrincada entre esses eventos. Futuros estudos que sejam capazes de bloquear a reatividade astrocitária e a captação de glutamato nesse modelo e verificar o efeito metabolismo de glicose serão importantes para confirmar se existe correlação entre estes fenômenos.

Acreditamos que a identificação dessas interações possa ser de grande relevância para o entendimento dos mecanismos subjacentes à progressão da DA. Por exemplo, um estudo recente, com uso de biomarcadores de fluido e de imagem, em indivíduos na fase pré-clínica da DA, identificou que existe uma associação entre os níveis de A β com tau em pacientes que apresentam positividade para biomarcadores de reatividade astrocitária (PASCOAL; BELLAVER; POVALA; FERREIRA *et al.*, 2023). Sugerindo que essa resposta inicial dos astrócitos possa ser um passo crucial para que pacientes progridam do estágio amiloide para o estágio de tau na DA. Nesse contexto, acreditamos que futuras investigações bloqueando a reatividade astrocitária poderiam ajudar a elucidar se esse fenômeno tem participação nos processos biológicos que tornam os ratos TgF344-AD o único modelo de DA, sem a inserção de mutações na MAPT, a progredir para essa próxima fase da doença e apresentar depósitos NFT-like e extensa neurodegeneração.

Por fim, quando analisamos todas essas descobertas de forma abrangente, torna-se evidente que elas têm implicações de grande relevância para a interpretação dos resultados obtidos por meio do [^{18}F]FDG-PET, para o seu potencial uso clínico como um biomarcador precoce e também para o entendimento da progressão fisiopatológica da DA. Essa compreensão mais aprofundada do metabolismo cerebral de glicose e das funções astrocitárias poderia contribuir significativamente para a compreensão, detecção e tratamento precoces da DA, oferecendo esperança para um melhor manejo dessa condição devastadora.

REFERÊNCIAS

- ALAVI, A. Functional and anatomic studies of head injury. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, 1, n. 1, p. S45-50, Winter 1989.
- ALTAMURA, A. C.; BERTOLDO, A.; MAROTTA, G.; PAOLI, R. A. *et al.* White matter metabolism differentiates schizophrenia and bipolar disorder: a preliminary PET study. **Psychiatry Res**, 214, n. 3, p. 410-414, Dec 30 2013.
- ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, 32, n. 1, p. 1-14, Oct 2000.
- ASHRAF, A.; FAN, Z.; BROOKS, D. J.; EDISON, P. Cortical hypermetabolism in MCI subjects: a compensatory mechanism? **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 42, n. 3, p. 447-458, Mar 2015.
- ASSOCIATION, A. s. 2023 Alzheimer's disease Facts and Figures. **Alzheimers Dement**, 19, n. 4, p. 1598-1695, Apr 2023.
- ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, 21, n. 10, p. 1133-1145, Oct 2001.
- BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **J Neurochem**, 98, n. 3, p. 641-653, Aug 2006.
- BAK, L. K.; WALLS, A. B. CrossTalk opposing view: lack of evidence supporting an astrocyte-to-neuron lactate shuttle coupling neuronal activity to glucose utilisation in the brain. **J Physiol**, 596, n. 3, p. 351-353, Feb 1 2018a.
- BAK, L. K.; WALLS, A. B. Rebuttal from Lasse K. Bak and Anne B. Walls. **J Physiol**, 596, n. 3, p. 357, Feb 1 2018b.
- BAO, W.; XIE, F.; ZUO, C.; GUAN, Y. *et al.* PET Neuroimaging of Alzheimer's Disease: Radiotracers and Their Utility in Clinical Research. **Front Aging Neurosci**, 13, p. 624330, 2021.
- BARROS, L. F.; SAN MARTIN, A.; RUMINOT, I.; SANDOVAL, P. Y. *et al.* Fluid Brain Glycolysis: Limits, Speed, Location, Moonlighting, and the Fates of Glycogen and Lactate. **Neurochem Res**, 45, n. 6, p. 1328-1334, Jun 2020.
- BARROS, L. F.; WEBER, B. CrossTalk proposal: an important astrocyte-to-neuron lactate shuttle couples neuronal activity to glucose utilisation in the brain. **J Physiol**, 596, n. 3, p. 347-350, Feb 1 2018a.
- BARROS, L. F.; WEBER, B. Rebuttal from L. F. Barros and B. Weber. **J Physiol**, 596, n. 3, p. 355-356, Feb 1 2018b.
- BELANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metab**, 14, n. 6, p. 724-738, Dec 7 2011.
- BENEDET, A. L.; MILA-ALOMA, M.; VRILLON, A.; ASHTON, N. J. *et al.* Differences Between Plasma and Cerebrospinal Fluid Glial Fibrillary Acidic Protein Levels Across the Alzheimer Disease Continuum. **JAMA Neurol**, 78, n. 12, p. 1471-1483, Dec 1 2021.

BENZINGER, T. L.; BLAZEY, T.; JACK, C. R., Jr.; KOEPPE, R. A. *et al.* Regional variability of imaging biomarkers in autosomal dominant Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 47, p. E4502-4509, Nov 19 2013.

BIRNBAUMER, L.; CAMPBELL, K. P.; CATTERALL, W. A.; HARPOLD, M. M. *et al.* The naming of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, 13, n. 3, p. 505-506, Sep 1994.

BITTNER, C. X.; VALDEBENITO, R.; RUMINOT, I.; LOAIZA, A. *et al.* Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K⁺ and a delayed and persistent effect of glutamate. **J Neurosci**, 31, n. 12, p. 4709-4713, Mar 23 2011.

BLINKENBERG, M.; JENSEN, C. V.; HOLM, S.; PAULSON, O. B. *et al.* A longitudinal study of cerebral glucose metabolism, MRI, and disability in patients with MS. **Neurology**, 53, n. 1, p. 149-153, Jul 13 1999.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361, n. 6407, p. 31-39, Jan 7 1993.

BROWN, R. K.; BOHNEN, N. I.; WONG, K. K.; MINOSHIMA, S. *et al.* Brain PET in suspected dementia: patterns of altered FDG metabolism. **Radiographics**, 34, n. 3, p. 684-701, May-Jun 2014.

CARTER, S. F.; CHIOTIS, K.; NORDBERG, A.; RODRIGUEZ-VIEITEZ, E. Longitudinal association between astrocyte function and glucose metabolism in autosomal dominant Alzheimer's disease. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 46, n. 2, p. 348-356, Feb 2019.

CHERRY, S. R.; DAHLBOM, M. PET: Physics, Instrumentation, and Scanners. *In*: PHELPS, M. E. (Ed.). **PET: Physics, Instrumentation, and Scanners**. New York, NY: Springer New York, 2006. p. 1-117.

CHERRY, S. R.; GAMBHIR, S. S. Use of Positron Emission Tomography in Animal Research. **ILAR Journal**, 42, n. 3, p. 219-232, 2001.

CHOI, D. W. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. **Prog Brain Res**, 100, p. 47-51, 1994.

CHOLET, N.; PELLERIN, L.; WELKER, E.; LACOMBE, P. *et al.* Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation. **J Cereb Blood Flow Metab**, 21, n. 4, p. 404-412, Apr 2001.

CHUQUET, J.; QUILICHINI, P.; NIMCHINSKY, E. A.; BUZSAKI, G. Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. **J Neurosci**, 30, n. 45, p. 15298-15303, Nov 10 2010.

CLINE, E. N.; BICCA, M. A.; VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L. The Amyloid-beta Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. **J Alzheimers Dis**, 64, n. s1, p. S567-S610, 2018.

COHEN, R. M.; REZAI-ZADEH, K.; WEITZ, T. M.; RENTSENDORJ, A. *et al.* A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric abeta, and frank neuronal loss. **J Neurosci**, 33, n. 15, p. 6245-6256, Apr 10 2013.

COLLABORATORS, G. B. D. N. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurol**, 18, n. 5, p. 459-480, May 2019.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001.

DANBOLT, N. C.; FURNESS, D. N.; ZHOU, Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. **Neurochem Int**, 98, p. 29-45, Sep 2016.

DE LEON, M. J.; FERRIS, S. H.; BLAU, I.; GEORGE, A. E. *et al.* Correlations between computerised tomographic changes and behavioural deficits in senile dementia. **Lancet**, 2, n. 8147, p. 859-860, Oct 20 1979.

DE LEON, M. J.; GEORGE, A. E.; STYLOPOULOS, L. A.; SMITH, G. *et al.* Early marker for Alzheimer's disease: the atrophic hippocampus. **Lancet**, 2, n. 8664, p. 672-673, Sep 16 1989.

DIENEL, G. A. Astrocytic energetics during excitatory neurotransmission: What are contributions of glutamate oxidation and glycolysis? **Neurochem Int**, 63, n. 4, p. 244-258, Oct 2013.

DIENEL, G. A. Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte-neuron lactate shuttle in brain. **J Neurosci Res**, 95, n. 11, p. 2103-2125, Nov 2017.

DIENEL, G. A. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. **Physiol Rev**, 99, n. 1, p. 949-1045, Jan 1 2019.

DIENEL, G. A.; BEHAR, K. L.; ROTHMAN, D. L. Cellular Origin of [(18)F]FDG-PET Imaging Signals During Ceftriaxone-Stimulated Glutamate Uptake: Astrocytes and Neurons. **Neuroscientist**, 24, n. 4, p. 316-328, Aug 2018.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, 51, n. 1, p. 7-61, Mar 1999.

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. **Pharmacol Ther**, 81, n. 3, p. 163-221, Mar 1999.

DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; JACOVA, C.; DEKOSKY, S. T. *et al.* Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. **Lancet Neurol**, 6, n. 8, p. 734-746, Aug 2007.

DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; JACOVA, C.; HAMPEL, H. *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. **Lancet Neurol**, 13, n. 6, p. 614-629, Jun 2014.

DUELLI, R.; KUSCHINSKY, W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. **News Physiol Sci**, 16, p. 71-76, Apr 2001.

DUNLOP, J.; ELIASOF, S.; STACK, G.; MCILVAIN, H. B. *et al.* WAY-855 (3-amino-tricyclo[2.2.1.0^{2,6}]heptane-1,3-dicarboxylic acid): a novel, EAAT2-preferring, nonsubstrate inhibitor of high-affinity glutamate uptake. **Br J Pharmacol**, 140, n. 5, p. 839-846, Nov 2003.

DURAN, J.; GRUART, A.; LOPEZ-RAMOS, J. C.; DELGADO-GARCIA, J. M. *et al.* Glycogen in Astrocytes and Neurons: Physiological and Pathological Aspects. **Adv Neurobiol**, 23, p. 311-329, 2019.

ERBSLOH, F.; BERNSMEIER, A.; HILLESHEIM, H. [The glucose consumption of the brain & its dependence on the liver]. **Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr**, 196, n. 6, p. 611-626, 1958.

ERIKSSON, G.; PETERSON, A.; IVERFELDT, K.; WALUM, E. Sodium-dependent glutamate uptake as an activator of oxidative metabolism in primary astrocyte cultures from newborn rat. **Glia**, 15, n. 2, p. 152-156, Oct 1995.

ESQUERDA-CANALS, G.; MONTOLIU-GAYA, L.; GUELL-BOSCH, J.; VILLEGAS, S. Mouse Models of Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 57, n. 4, p. 1171-1183, 2017.

ESSLINGER, C. S.; AGARWAL, S.; GERDES, J.; WILSON, P. A. *et al.* The substituted aspartate analogue L-beta-threo-benzyl-aspartate preferentially inhibits the neuronal excitatory amino acid transporter EAAT3. **Neuropharmacology**, 49, n. 6, p. 850-861, Nov 2005.

FAIRMAN, W. A.; AMARA, S. G. Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. **Am J Physiol**, 277, n. 4 Pt 2, p. F481-486, Oct 1999.

FEIGIN, A.; LEENDERS, K. L.; MOELLER, J. R.; MISSIMER, J. *et al.* Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: an [(18)F]FDG PET study. **J Nucl Med**, 42, n. 11, p. 1591-1595, Nov 2001.

FEIGIN, V. L.; VOS, T.; NICHOLS, E.; OWOLABI, M. O. *et al.* The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. **Lancet Neurol**, 19, n. 3, p. 255-265, Mar 2020.

FERNANDEZ-MONCADA, I.; RUMINOT, I.; ROBLES-MALDONADO, D.; ALEGRIA, K. *et al.* Neuronal control of astrocytic respiration through a variant of the Crabtree effect. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 7, p. 1623-1628, Feb 13 2018.

FERRIS, S. H.; DE LEON, M. J.; WOLF, A. P.; FARKAS, T. *et al.* Positron emission tomography in the study of aging and senile dementia. **Neurobiol Aging**, 1, n. 2, p. 127-131, Winter 1980.

FONTANA, A. C. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. **J Neurochem**, 134, n. 6, p. 982-1007, Sep 2015.

FOWLER, J. S.; IDO, T. Initial and subsequent approach for the synthesis of 18FDG. **Semin Nucl Med**, 32, n. 1, p. 6-12, Jan 2002.

FRISONI, G. B.; WINBLAD, B.; O'BRIEN, J. T. Revised NIA-AA criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: a step forward but not yet ready for widespread clinical use. **Int Psychogeriatr**, 23, n. 8, p. 1191-1196, Oct 2011.

GAUTHIER S, W. C., Servaes S, Morais JA, Rosa-Neto P. World Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support. **Alzheimer's Disease International**, 2022.

GOATE, A.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; MULLAN, M.; BROWN, J. *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature**, 349, n. 6311, p. 704-706, Feb 21 1991.

GOTZ, J.; BODEA, L. G.; GOEDERT, M. Rodent models for Alzheimer disease. **Nat Rev Neurosci**, 19, n. 10, p. 583-598, Oct 2018.

GREENBERG, J. H.; REIVICH, M.; ALAVI, A.; HAND, P. *et al.* Metabolic mapping of functional activity in human subjects with the [18F]fluorodeoxyglucose technique. **Science**, 212, n. 4495, p. 678-680, May 08 1981.

GYNTHER, M.; PETSALO, A.; HANSEN, S. H.; BUNCH, L. *et al.* Blood-brain barrier permeability and brain uptake mechanism of kainic acid and dihydrokainic acid. **Neurochem Res**, 40, n. 3, p. 542-549, Mar 2015.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, 256, n. 5054, p. 184-185, Apr 10 1992.

HEISS, W. D.; KESSLER, J.; KARBE, H.; FINK, G. R. *et al.* Cerebral glucose metabolism as a predictor of recovery from aphasia in ischemic stroke. **Arch Neurol**, 50, n. 9, p. 958-964, Sep 1993.

HERTZ, L. The astrocyte-neuron lactate shuttle: a challenge of a challenge. **J Cereb Blood Flow Metab**, 24, n. 11, p. 1241-1248, Nov 2004.

HOLMSETH, S.; SCOTT, H. A.; REAL, K.; LEHRE, K. P. *et al.* The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation. **Neuroscience**, 162, n. 4, p. 1055-1071, Sep 15 2009.

HOSLI, L.; ZUEND, M.; BREDELL, G.; ZANKER, H. S. *et al.* Direct vascular contact is a hallmark of cerebral astrocytes. **Cell Rep**, 39, n. 1, p. 110599, Apr 5 2022.

HOWARTH, C.; PEPPIATT-WILDMAN, C. M.; ATTWELL, D. The energy use associated with neural computation in the cerebellum. **J Cereb Blood Flow Metab**, 30, n. 2, p. 403-414, Feb 2010.

IDO, T.; WAN, C.-N.; CASELLA, V.; FOWLER, J. S. *et al.* Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and 14C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, 14, n. 2, p. 175-183, 1978.

ITOH, Y.; ESAKI, T.; SHIMOJI, K.; COOK, M. *et al.* Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 8, p. 4879-4884, Apr 15 2003.

JACK, C. R., Jr.; BENNETT, D. A.; BLENNOW, K.; CARRILLO, M. C. *et al.* NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement**, 14, n. 4, p. 535-562, Apr 2018.

JACK, C. R., Jr.; KNOPMAN, D. S.; JAGUST, W. J.; PETERSEN, R. C. *et al.* Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. **Lancet Neurol**, 12, n. 2, p. 207-216, Feb 2013.

KELLOFF, G. J.; HOFFMAN, J. M.; JOHNSON, B.; SCHER, H. I. *et al.* Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. **Clin Cancer Res**, 11, n. 8, p. 2785-2808, Apr 15 2005.

KENNEDY, C.; DES ROSIERS, M. H.; JEHL, J. W.; REIVICH, M. *et al.* Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rate with (14C)deoxyglucose. **Science**, 187, n. 4179, p. 850-853, Mar 7 1975.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, 179, n. 1, p. 4-29, Apr 2005.

KHOURY, R.; PATEL, K.; GOLD, J.; HINDS, S. *et al.* Recent Progress in the Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease. **Drugs Aging**, 34, n. 11, p. 811-820, Nov 2017.

KIM, H. J.; CHAE, S. C.; LEE, D. K.; CHROMY, B. *et al.* Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein. **FASEB J**, 17, n. 1, p. 118-120, Jan 2003.

KLEINRIDDERS, A.; FERRIS, H. A.; CAI, W.; KAHN, C. R. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. **Diabetes**, 63, n. 7, p. 2232-2243, Jul 2014.

KLUNK, W. E.; ENGLER, H.; NORDBERG, A.; WANG, Y. *et al.* Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. **Ann Neurol**, 55, n. 3, p. 306-319, Mar 2004.

KLYUCHEREV, T. O.; OLSZEWSKI, P.; SHALIMOVA, A. A.; CHUBAREV, V. N. *et al.* Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer's disease. **Transl Neurodegener**, 11, n. 1, p. 25, Apr 21 2022.

LAMBERT, M. P.; BARLOW, A. K.; CHROMY, B. A.; EDWARDS, C. *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 11, p. 6448-6453, May 26 1998.

LEE, S.; CHO, H. J.; RYU, J. H. Innate Immunity and Cell Death in Alzheimer's Disease. **ASN Neuro**, 13, p. 17590914211051908, Jan-Dec 2021.

LEHRE, K. P.; LEVY, L. M.; OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J. *et al.* Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. **J Neurosci**, 15, n. 3 Pt 1, p. 1835-1853, Mar 1995.

LEINO, R. L.; GERHART, D. Z.; VAN BUEREN, A. M.; MCCALL, A. L. *et al.* Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. **J Neurosci Res**, 49, n. 5, p. 617-626, Sep 1 1997.

LENNIE, P. The cost of cortical computation. **Curr Biol**, 13, n. 6, p. 493-497, Mar 18 2003.

LEUZY, A.; JANELIDZE, S.; MATTSSON-CARLGREN, N.; PALMQVIST, S. *et al.* Comparing the Clinical Utility and Diagnostic Performance of CSF P-Tau181, P-Tau217, and P-Tau231 Assays. **Neurology**, 97, n. 17, p. e1681-e1694, Oct 26 2021.

LUNDGAARD, I.; LI, B.; XIE, L.; KANG, H. *et al.* Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. **Nat Commun**, 6, p. 6807, Apr 23 2015.

MACVICAR, B. A.; NEWMAN, E. A. Astrocyte regulation of blood flow in the brain. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 7, n. 5, Mar 27 2015.

MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. **Neuron**, 86, n. 4, p. 883-901, May 20 2015.

MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. The contribution of astrocytes to the 18F-2-deoxyglucose signal in PET activation studies. **Mol Psychiatry**, 1, n. 6, p. 445-452, Dec 1996.

MAKI, R.; ROBINSON, M. B.; DICHTER, M. A. The glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate depresses excitatory synaptic transmission via a presynaptic mechanism in cultured hippocampal neurons. **J Neurosci**, 14, n. 11 Pt 1, p. 6754-6762, Nov 1994.

MARKIEWICZ, I.; LUKOMSKA, B. The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, 66, n. 4, p. 343-358, 2006.

MASTERS, C. L.; BATEMAN, R.; BLENNOW, K.; ROWE, C. C. *et al.* Alzheimer's disease. **Nat Rev Dis Primers**, 1, p. 15056, Oct 15 2015.

MCKENNA, M. C. Glutamate pays its own way in astrocytes. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 4, p. 191, Dec 16 2013.

MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R. *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, 34, n. 7, p. 939-944, Jul 1984.

MELONE, M.; BRAGINA, L.; CONTI, F. Clozapine-induced reduction of glutamate transport in the frontal cortex is not mediated by GLAST and EAAC1. **Mol Psychiatry**, 8, n. 1, p. 12-13, Jan 2003.

MELONE, M.; VITELLARO-ZUCCARELLO, L.; VALLEJO-ILLARRAMENDI, A.; PEREZ-SAMARTIN, A. *et al.* The expression of glutamate transporter GLT-1 in the rat cerebral cortex is down-regulated by the antipsychotic drug clozapine. **Mol Psychiatry**, 6, n. 4, p. 380-386, Jul 2001.

MERGENTHALER, P.; LINDAUER, U.; DIENEL, G. A.; MEISEL, A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. **Trends Neurosci**, 36, n. 10, p. 587-597, Oct 2013.

MINOSHIMA, S.; MOSCI, K.; CROSS, D.; THIENTUNYAKIT, T. Brain [F-18]FDG PET for Clinical Dementia Workup: Differential Diagnosis of Alzheimer's Disease and Other Types of Dementing Disorders. **Semin Nucl Med**, 51, n. 3, p. 230-240, May 2021.

MONTGOMERY, D. L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. **Vet Pathol**, 31, n. 2, p. 145-167, Mar 1994.

MORBELLI, S.; GARIBOTTO, V.; VAN DE GIESSEN, E.; ARBIZU, J. *et al.* A Cochrane review on brain [(1)(8)F]FDG PET in dementia: limitations and future perspectives. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 42, n. 10, p. 1487-1491, Sep 2015.

MOSCONI, L. Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: Methodological and physiological considerations for PET studies. **Clin Transl Imaging**, 1, n. 4, Aug 2013.

MOTTER, R.; VIGO-PELFREY, C.; KHOLODENKO, D.; BARBOUR, R. *et al.* Reduction of beta-amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. **Ann Neurol**, 38, n. 4, p. 643-648, Oct 1995.

MUSIEK, E. S.; HOLTZMAN, D. M. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. **Nat Neurosci**, 18, n. 6, p. 800-806, Jun 2015.

MYERS, A.; MCGONIGLE, P. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. **Curr Protoc Neurosci**, 89, n. 1, p. e81, Sep 2019.

NAHEED, M.; GREEN, B. Focus on clozapine. **Curr Med Res Opin**, 17, n. 3, p. 223-229, 2001.

NEHLIG, A.; COLES, J. A. Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? **Glia**, 55, n. 12, p. 1238-1250, Sep 2007.

NEHLIG, A.; WITTENDORP-RECHENMANN, E.; LAM, C. D. Selective uptake of [¹⁴C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular ¹⁴C-trajectography combined with immunohistochemistry. **J Cereb Blood Flow Metab**, 24, n. 9, p. 1004-1014, Sep 2004.

ORREGO, F.; VILLANUEVA, S. The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. **Neuroscience**, 56, n. 3, p. 539-555, Oct 1993.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, 54, n. 5, p. 581-618, Apr 1998.

PALMQVIST, S.; JANELIDZE, S.; QUIROZ, Y. T.; ZETTERBERG, H. *et al.* Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau₂₁₇ for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. **JAMA**, 324, n. 8, p. 772-781, Aug 25 2020.

PASCOAL, T.; BELLAVAR, B.; POVALA, G.; FERREIRA, P. *et al.* Astrocyte reactivity influences the association of amyloid-beta and tau biomarkers in preclinical Alzheimer's disease. **Res Sq**, Feb 1 2023.

PATEL, A. B.; LAI, J. C.; CHOWDHURY, G. M.; HYDER, F. *et al.* Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 14, p. 5385-5390, Apr 8 2014.

PEARSON-LEARY, J.; MCNAY, E. C. Intrahippocampal administration of amyloid-beta(1-42) oligomers acutely impairs spatial working memory, insulin signaling, and hippocampal metabolism. **J Alzheimers Dis**, 30, n. 2, p. 413-422, 2012.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91, n. 22, p. 10625-10629, Oct 25 1994.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Sweet sixteen for ANLS. **J Cereb Blood Flow Metab**, 32, n. 7, p. 1152-1166, Jul 2012.

PELLERIN, L.; PELLEGGRI, G.; BITTAR, P. G.; CHARNAY, Y. *et al.* Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. **Dev Neurosci**, 20, n. 4-5, p. 291-299, 1998.

PHELPS, M. E.; HOFFMAN, E. J.; MULLANI, N. A.; TER-POGOSSIAN, M. M. Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. **J Nucl Med**, 16, n. 3, p. 210-224, Mar 1975.

PHELPS, M. E.; HUANG, S. C.; HOFFMAN, E. J.; SELIN, C. *et al.* Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. **Ann Neurol**, 6, n. 5, p. 371-388, Nov 1979.

PLATT, S. R. The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. **Vet J**, 173, n. 2, p. 278-286, Mar 2007.

PORTNOW, L. H.; VAILLANCOURT, D. E.; OKUN, M. S. The history of cerebral PET scanning: from physiology to cutting-edge technology. **Neurology**, 80, n. 10, p. 952-956, Mar 5 2013.

POSTON, K. L.; EIDELBERG, D. FDG PET in the Evaluation of Parkinson's Disease. **PET Clin**, 5, n. 1, p. 55-64, Jan 01 2010.

REIVICH, M.; KUHL, D.; WOLF, A.; GREENBERG, J. *et al.* The [18F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man. **Circ Res**, 44, n. 1, p. 127-137, Jan 1979.

ROTHSTEIN, J. D.; PATEL, S.; REGAN, M. R.; HAENGGELI, C. *et al.* Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. **Nature**, 433, n. 7021, p. 73-77, Jan 6 2005.

RUBINSKI, A.; FRANZMEIER, N.; NEITZEL, J.; EWERS, M. *et al.* FDG-PET hypermetabolism is associated with higher tau-PET in mild cognitive impairment at low amyloid-PET levels. **Alzheimers Res Ther**, 12, n. 1, p. 133, Oct 19 2020.

SALVADO, G.; MILA-ALOMA, M.; SHEKARI, M.; ASHTON, N. J. *et al.* Reactive astrogliosis is associated with higher cerebral glucose consumption in the early Alzheimer's continuum. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 49, n. 13, p. 4567-4579, Nov 2022.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, 62, n. 1, p. 63-77, Jan 2012.

SARIKAYA, I. PET studies in epilepsy. **Am J Nucl Med Mol Imaging**, 5, n. 5, p. 416-430, 2015.

SCHELTENS, P.; BLENNOW, K.; BRETELER, M. M.; DE STROOPER, B. *et al.* Alzheimer's disease. **Lancet**, 388, n. 10043, p. 505-517, Jul 30 2016.

SEETHALAKSHMI, R.; PARKAR, S. R.; NAIR, N.; ADARKAR, S. A. *et al.* Regional brain metabolism in schizophrenia: An FDG-PET study. **Indian J Psychiatry**, 48, n. 3, p. 149-153, Jul 2006.

SEIXAS DA SILVA, G. S.; MELO, H. M.; LOURENCO, M. V.; LYRA, E. S. N. M. *et al.* Amyloid-beta oligomers transiently inhibit AMP-activated kinase and cause metabolic defects in hippocampal neurons. **J Biol Chem**, 292, n. 18, p. 7395-7406, May 5 2017.

SHIMAMOTO, K.; LEBRUN, B.; YASUDA-KAMATANI, Y.; SAKAITANI, M. *et al.* DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. **Mol Pharmacol**, 53, n. 2, p. 195-201, Feb 1998.

SILVER, I. A.; ERECINSKA, M. Energetic demands of the Na⁺/K⁺ ATPase in mammalian astrocytes. **Glia**, 21, n. 1, p. 35-45, Sep 1997.

SMAILAGIC, N.; VACANTE, M.; HYDE, C.; MARTIN, S. *et al.* (1)(8)F-FDG PET for the early diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). **Cochrane Database Syst Rev**, 1, p. CD010632, Jan 28 2015.

SOKOLOFF, L.; REIVICH, M.; KENNEDY, C.; DES ROSIERS, M. H. *et al.* The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. **J Neurochem**, 28, n. 5, p. 897-916, May 1977.

SOM, P.; ATKINS, H. L.; BANDOYPADHYAY, D.; FOWLER, J. S. *et al.* A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection. **J Nucl Med**, 21, n. 7, p. 670-675, Jul 1980.

SONI, N.; REDDY, B. V.; KUMAR, P. GLT-1 transporter: an effective pharmacological target for various neurological disorders. **Pharmacol Biochem Behav**, 127, p. 70-81, Dec 2014.

STOESSL, A. J. Glucose utilization: still in the synapse. **Nat Neurosci**, 20, n. 3, p. 382-384, Feb 23 2017.

SU, L.; CAI, Y.; XU, Y.; DUTT, A. *et al.* Cerebral metabolism in major depressive disorder: a voxel-based meta-analysis of positron emission tomography studies. **BMC Psychiatry**, 14, p. 321, Nov 19 2014.

SUOLINNA, E. M.; HAAPARANTA, M.; PAUL, R.; HARKONEN, P. *et al.* Metabolism of 2-[18F]fluoro-2-deoxyglucose in tumor-bearing rats: chromatographic and enzymatic studies. **Int J Rad Appl Instrum B**, 13, n. 5, p. 577-581, 1986.

TAKAHASHI, S.; DRISCOLL, B. F.; LAW, M. J.; SOKOLOFF, L. Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 10, p. 4616-4620, May 9 1995.

TANAKA, K. Functions of glutamate transporters in the brain. **Neurosci Res**, 37, n. 1, p. 15-19, May 2000.

TANG, B. L. Brain activity-induced neuronal glucose uptake/glycolysis: Is the lactate shuttle not required? **Brain Res Bull**, 137, p. 225-228, Mar 2018.

TARCZYLUK, M. A.; NAGEL, D. A.; RHEIN PARRI, H.; TSE, E. H. *et al.* Amyloid beta 1-42 induces hypometabolism in human stem cell-derived neuron and astrocyte networks. **J Cereb Blood Flow Metab**, 35, n. 8, p. 1348-1357, Aug 2015.

UDDIN, M. S.; KABIR, M. T.; JEANDET, P.; MATHEW, B. *et al.* Novel Anti-Alzheimer's Therapeutic Molecules Targeting Amyloid Precursor Protein Processing. **Oxid Med Cell Longev**, 2020, p. 7039138, 2020.

VALLEJO-ILLARRAMENDI, A.; TORRES-RAMOS, M.; MELONE, M.; CONTI, F. *et al.* Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. **Glia**, 50, n. 3, p. 276-279, May 2005.

VANDENBERG, R. J.; RYAN, R. M. Mechanisms of glutamate transport. **Physiol Rev**, 93, n. 4, p. 1621-1657, Oct 2013.

VANDERMEEREN, M.; MERCKEN, M.; VANMECHELEN, E.; SIX, J. *et al.* Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **J Neurochem**, 61, n. 5, p. 1828-1834, Nov 1993.

VOUTSINOS-PORCHE, B.; KNOTT, G.; TANAKA, K.; QUAIRIAUX, C. *et al.* Glial glutamate transporters and maturation of the mouse somatosensory cortex. **Cereb Cortex**, 13, n. 10, p. 1110-1121, Oct 2003.

WAGNER, H. N., Jr. Advancing a molecular theory of disease. **J Nucl Med**, 49, n. 8, p. 15N-34N, Aug 2008.

WAN HE, D. G., and Paul Kowal. An Aging World: 2015, International Population Reports. 2016.

WATKINS, J. C.; EVANS, R. H. Excitatory amino acid transmitters. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 21, p. 165-204, 1981.

WIENHARD, K. Measurement of glucose consumption using [(18)F]fluorodeoxyglucose. **Methods**, 27, n. 3, p. 218-225, Jul 2002.

XIANG, X.; WIND, K.; WIEDEMANN, T.; BLUME, T. *et al.* Microglial activation states drive glucose uptake and FDG-PET alterations in neurodegenerative diseases. **Sci Transl Med**, 13, n. 615, p. eabe5640, Oct 13 2021.

YOKOYAMA, M.; KOBAYASHI, H.; TATSUMI, L.; TOMITA, T. Mouse Models of Alzheimer's Disease. **Front Mol Neurosci**, 15, p. 912995, 2022.

ZAMETKIN, A. J.; NORDAHL, T. E.; GROSS, M.; KING, A. C. *et al.* Cerebral glucose metabolism in adults with hyperactivity of childhood onset. **N Engl J Med**, 323, n. 20, p. 1361-1366, Nov 15 1990.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. GABA and Glutamate Transporters in Brain. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 4, p. 165, 2013.

ZIMMER, E. R.; PARENT, M. J.; SOUZA, D. G.; LEUZY, A. *et al.* [(18)F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. **Nat Neurosci**, 20, n. 3, p. 393-395, Mar 2017.

ANEXOS

ANEXO A: Artigos científicos publicados durante o período de doutoramento que participei como co-autora e que apresentam conteúdo associado ao tema do projeto de doutorado, mas não serão incluídos no corpo principal da tese.

Os dois primeiros artigos, “**Activated peripheral blood mononuclear cell mediators trigger astrocyte reactivity**”, publicado no periódico “**Brain, Behavior, and Immunity**”, e **Antidepressant-Like Effects of Chronic Guanosine in the Olfactory Bulbectomy Mouse Model**” publicado no periódico “**Frontiers in Psychiatry**”, investigam dois diferentes modelos animais, de sepse e de depressão. Ambos modelos exibiram alterações no metabolismo cerebral de glicose identificadas via [¹⁸F]FDG-PET e corroboram nossos achados de perturbações no metabolismo cerebral de glicose associadas a mudanças astrocíticas.

O terceiro artigo, intitulado “**Amyloid- β oligomers in cellular models of Alzheimer’s disease**” e quarto artigo, intitulado “**Guanosine Neuroprotection of Presynaptic Mitochondrial Calcium Homeostasis in a Mouse Study with Amyloid- β Oligomers**” abordam os efeitos dos A β Os.

O quinto artigo, intitulado “**Astrocyte biomarker signatures of amyloid- β and tau pathologies in Alzheimer’s disease**”, o sexto artigo, intitulado “**Hippocampal GFAP-positive astrocyte responses to amyloid and tau pathologies**” e o sétimo artigo, intitulado “**Neuroinflammation Biomarkers in the AT(N) Framework Across the Alzheimer’s Disease Continuum**” abordam o papel das resposta glial, especialmente astrócitos, e uso de biomarcadores associados a estas células na DA.



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Activated peripheral blood mononuclear cell mediators trigger astrocyte reactivity



Bruna Bellaver^a, Andréia S. Rocha^a, Débora G. Souza^a, Douglas T. Leffa^b, Marco Antônio De Bastiani^a, Guilherme Schu^a, Pâmela C. Lukasewicz Ferreira^c, Gianina T. Venturin^d, Samuel Greggio^d, Camila T. Ribeiro^a, Jaderson C. da Costa^d, José Cláudio Fonseca Moreira^{a,e}, Daniel P. Gelain^{a,e}, Iraci Lucena da S. Torres^{b,f,h}, Fábio Klant^{a,g}, Eduardo R. Zimmer^{a,f,h,*}

^a Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^c Graduate Program in Pharmaceutical Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d Preclinical Imaging Center, Brain Institute (Brains) of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^e Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^f Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^g Laboratory of Cellular Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^h Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Astrocyte
Glucose
Glutamate
Energy metabolism
PBMC
Sepsis

ABSTRACT

Sepsis is characterized by a severe and disseminated inflammation. In the central nervous system, sepsis promotes synaptic dysfunction and permanent cognitive impairment. Besides sepsis-induced neuronal dysfunction, glial cell response has been gaining considerable attention with microglial activation as a key player. By contrast, astrocytes' role during acute sepsis is still underexplored. Astrocytes are specialized immunocompetent cells involved in brain surveillance. In this context, the potential communication between the peripheral immune system and astrocytes during acute sepsis still remains unclear. We hypothesized that peripheral blood mononuclear cell (PBMC) mediators are able to affect the brain during an episode of acute sepsis. With this in mind, we first performed a data-driven transcriptome analysis of blood from septic patients to identify common features among independent clinical studies. Our findings evidenced pronounced impairment in energy-related signaling pathways in the blood of septic patients. Since astrocytes are key for brain energy homeostasis, we decided to investigate the communication between PBMC mediators and astrocytes in a rat model of acute sepsis, induced by cecal ligation and perforation (CLP). In the CLP animals, we identified widespread *in vivo* brain glucose hypometabolism. *Ex vivo* analyses demonstrated astrocyte reactivity along with reduced glutamate uptake capacity during sepsis. Also, by exposing cultured astrocytes to mediators released by PBMCs from CLP animals, we reproduced the energetic failure observed *in vivo*. Finally, by pharmacologically inhibiting phosphoinositide 3-kinase (PI3K), a central metabolic pathway downregulated in the blood of septic patients and reduced in the CLP rat brain, we mimicked the PBMC mediators effect on glutamate uptake but not on glucose metabolism. These results suggest that PBMC mediators are capable of directly mediating astrocyte reactivity and contribute to the brain energetic failure observed in acute sepsis. Moreover, the evidence of PI3K participation in this process indicates a potential target for therapeutic modulation.

1. Introduction

Sepsis is characterized by a severe and disseminated systemic

inflammation as a result of a microorganism invasion in the bloodstream. In this inflammatory scenario, the activation of the peripheral immune system also affects brain function. Reports have demonstrated

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2500 Ramiro Barcelos Street, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: eduardo.zimmer@ufrgs.br (E.R. Zimmer).

URL: <http://www.zimmer-lab.org> (E.R. Zimmer).

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.041>

Received 9 January 2019; Received in revised form 28 May 2019; Accepted 30 May 2019

Available online 05 June 2019

0889-1591/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.



Antidepressant-Like Effects of Chronic Guanosine in the Olfactory Bulbectomy Mouse Model

Roberto Farina Almeida^{1*}, Yasmine Nonose², Marcelo Ganzella³, Samanta Oliveira Loureiro², Andréia Rocha², Daniele Guilherme Machado², Bruna Bellaver², Fernanda Urruth Fontella², Douglas T. Leffa⁴, Letícia Ferreira Pettenuzzo², Gianina Teribele Venturin⁵, Samuel Greggio⁵, Jaderson Costa da Costa⁵, Eduardo R. Zimmer^{2,6,7}, Elaine Elisabetsky² and Diogo O. Souza²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil, ² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ³ Neurobiology Department, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany, ⁴ Attention Deficit Hyperactivity Disorder Outpatient Program & Development Psychiatry Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, ⁵ Preclinical Imaging Center, Brain Institute (Brains) of Rio Grande do Sul, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ⁶ Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ⁷ Department of Pharmacology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Nazzareno Cannella,
University of Camerino, Italy

Reviewed by:

Stefania Schiavone,
University of Foggia, Italy
Carla Ines Tasca,
Federal University of Santa
Catarina, Brazil

*Correspondence:

Roberto Farina Almeida
almeida_rf@yahoo.com.br

Specialty section:

This article was submitted to
Psychopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Psychiatry

Received: 27 April 2021

Accepted: 01 July 2021

Published: 04 August 2021

Citation:

Almeida RF, Nonose Y, Ganzella M, Loureiro SO, Rocha A, Machado DG, Bellaver B, Fontella FU, Leffa DT, Pettenuzzo LF, Venturin GT, Greggio S, da Costa JC, Zimmer ER, Elisabetsky E and Souza DO (2021) Antidepressant-Like Effects of Chronic Guanosine in the Olfactory Bulbectomy Mouse Model. *Front. Psychiatry* 12:701408. doi: 10.3389/fpsy.2021.701408

Major depressive disorder (MDD) leads to pervasive changes in the health of afflicted patients. Despite advances in the understanding of MDD and its treatment, profound innovation is needed to develop fast-onset antidepressants with higher effectiveness. When acutely administered, the endogenous nucleoside guanosine (GUO) shows fast-onset antidepressant-like effects in several mouse models, including the olfactory bulbectomy (OBX) rodent model. OBX is advocated to possess translational value and be suitable to assess the time course of depressive-like behavior in rodents. This study aimed at investigating the long-term behavioral and neurochemical effects of GUO in a mouse model of depression induced by bilateral bulbectomy (OBX). Mice were submitted to OBX and, after 14 days of recovery, received daily (ip) administration of 7.5 mg/kg GUO or 40 mg/kg imipramine (IMI) for 45 days. GUO and IMI reversed the OBX-induced hyperlocomotion and recognition memory impairment, hippocampal BDNF increase, and redox imbalance (ROS, NO, and GSH levels). GUO also mitigated the OBX-induced hippocampal neuroinflammation (IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , and IL-10). Brain microPET imaging ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) shows that GUO also prevented the OBX-induced increase in hippocampal FDG metabolism. These results provide additional evidence for GUO antidepressant-like effects, associated with beneficial neurochemical outcomes relevant to counteract depression.

Keywords: major depressive disorder, psychopharmacology, purines (source: MeSH), guanosine, purinergic signaling, olfactory bulbectomy

INTRODUCTION

Major depressive disorder (MDD) is a multifactorial disorder characterized by a complex symptomatology, leading to important changes in the mental and social health of afflicted patients (1, 2). Despite its high prevalence (3), there are no validated biomarkers that can be used for a differential diagnosis (4). Current antidepressants are characterized by delayed clinical



Received: 24 January 2020 | Revised: 21 March 2020 | Accepted: 17 April 2020

DOI: 10.1111/jnc.15030

REVIEW

Journal of Neurochemistry **JNC** WILEYAmyloid- β oligomers in cellular models of Alzheimer's diseaseIgor C. Fontana^{1,2} | Aline R. Zimmer¹ | Andreia S. Rocha² | Grace Gosmann¹ | Diogo O. Souza^{2,3} | Mychael V. Lourenco⁴ | Sergio T. Ferreira^{4,5} | Eduardo R. Zimmer^{2,6,7} ¹Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil²Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil³Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil⁴Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil⁵Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil⁶Department of Pharmacology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil⁷Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Correspondence

Eduardo R. Zimmer, Department of Pharmacology, UFRGS, R. Sarmento Leite, 500 - Farroupilha, Porto Alegre 90040-060, Rio Grande do Sul, Brazil.
Email: eduardo.zimmer@ufrgs.br

Funding information

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Grant/Award Number: 202.817/2016; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Grant/Award Number: ARD/PPP - 16/2551-0000175-8, MS/CNPq/SESR5-PPSUS - 30786.434.24734.23112017 and PRONEX, FAPERGS/CNPq - 16/2551-

Abstract

Amyloid- β (A β) dysmetabolism is tightly associated with pathological processes in Alzheimer's disease (AD). Currently, it is thought that, in addition to A β fibrils that give rise to plaque formation, A β aggregates into non-fibrillar soluble oligomers (A β O). Soluble A β O have been extensively studied for their synaptotoxic and neurotoxic properties. In this review, we discuss physicochemical properties of A β O and their impact on different brain cell types in AD. Additionally, we summarize three decades of studies with A β O, providing a compelling bulk of evidence regarding cell-specific mechanisms of toxicity. Cellular models may lead us to a deeper understanding of the detrimental effects of A β O in neurons and glial cells, putatively shedding light on the development of innovative therapies for AD.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, amyloid-beta, cell cultures, oligomers

Abbreviations: AChE, acetylcholinesterase; ACM, astrocyte conditioned media; AD, Alzheimer's disease; AFM, atomic force microscopy; AICD, APP-intracellular domain; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; AMPK, AMP-activated protein kinase; ApoE, apolipoprotein E; APP, amyloid precursor protein; ATP, adenosine triphosphate; A β , amyloid- β ; A β O, amyloid- β oligomers; Bcl-2, B-cell lymphoma; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BuChE, butyrylcholinesterase; CDNF, cerebral dopamine neurotrophic factor; Cryab, α β -crystallin; EAAT, excitatory amino acid transporter; ER, endoplasmic reticulum; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; ESC, embryonic stem cells; Gal-8, galectin-8; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GLP-1, glucagon-like peptide 1; GLT-1, glutamate transporter 1; GLUT, glucose transporters; GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; hMSCs-EVs, human mesenchymal stem cells - extracellular vesicles; HMW, high molecular weight; IGF-1, insulin-growth factor 1; iGluR, ionotropic glutamate receptor; IL-10, interleukin-10; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-6, interleukin-6; InsP3R, inositol triphosphate receptor; iPSC, induced pluripotent stem cells; IR, insulin receptor; LMW, low molecular weight; LRP-1, LDL-related protein 1; MCP-1, monocyte chemoattractant Protein-1; mGluR, metabotropic glutamate receptor; MRP14, migration inhibitory factor-related protein 14; mZnR, zinc-sensing metabotropic receptor; N2a, neuro 2a; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NB, neuroblastoma; NEP, neprilysin; NGF, neuronal growth factor; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NOX, NADPH-oxidase; NSC, neural stem cells; NTE, N-terminally extended; PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PrPc, prion protein; ROS, reactive oxygen species; RyR, ryanodine receptor; SDS, sodium dodecyl sulfate; SEC-HPLC, size-exclusion high performance liquid chromatography; SIRT, sirtuin; TGF- β 1, transforming growth factor β 1; TNF- α , tumor necrosis factor α ; TrkA, tropomyosin receptor kinase A.



Guanosine Neuroprotection of Presynaptic Mitochondrial Calcium Homeostasis in a Mouse Study with Amyloid- β Oligomers

Jussemara Souza da Silva¹ · Yasmine Nonose¹ · Francieli Rohden¹ · Pâmela C. Lukasewicz Ferreira¹ · Fernanda Urruth Fontella¹ · Andréia Rocha¹ · Andressa Wigner Brochier¹ · Rodrigo Vieira Apel¹ · Thais Martins de Lima¹ · Bianca Seminotti¹ · Alexandre Umpierrez Amaral^{1,2} · Antonio Galina³ · Diogo O. Souza¹

Received: 16 March 2020 / Accepted: 7 August 2020 / Published online: 13 August 2020
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Amyloid- β oligomers (A β O) toxicity causes mitochondrial dysfunction, leading to synaptic failure in Alzheimer's disease (AD). Considering presynaptic high energy demand and tight Ca²⁺ regulation, impairment of mitochondrial function can lead to deteriorated neural activity and cell death. In this study, an AD mouse model induced by ICV (intracerebroventricular) injection of A β O was used to investigate the toxicity of A β O on presynaptic function. As a therapeutic approach, GUO (guanosine) was given by oral route to evaluate the neuroprotective effects on this AD model. Following 24 h and 48 h from the model induction, behavioral tasks and biochemical analyses were performed, respectively. A β O impaired object recognition (OR) short-term memory and reduced glutamate uptake and oxidation in the hippocampus. Moreover, A β O decreased spare respiratory capacity, reduced ATP levels, impaired Ca²⁺ handling, and caused mitochondrial swelling in hippocampal synaptosomes. Guanosine crossed the BBB, recovered OR short-term memory, reestablished glutamate uptake, recovered mitochondrial Ca²⁺ homeostasis, and partially prevented mitochondrial swelling. Therefore, this endogenous purine presented a neuroprotective effect on presynaptic mitochondria and should be considered for further studies in AD models.

Keywords Presynaptic mitochondria · Guanosine · Amyloid- β oligomers · Alzheimer's disease · Neuroprotection

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease leading to memory loss, cognitive disability, and mood disorders that generate high costs for health systems [1, 2]. These aspects, combined with the increasing global longevity along with the rising prevalence of AD, are an alarming cause of concern for health policymakers. Also, the difficult clinical diagnosis in the

initial phase and the lack of treatment options are reasons pressing the need for developing a treatment for this disease [2].

There is a close association between AD development and amyloid- β protein toxicity, mainly from soluble amyloid- β oligomers (A β O) [3], which is related to their high affinity for synapses [4]. The A β O toxicity results in glutamatergic excitotoxicity, dendritic spine damage, mitochondrial failure, impaired Ca²⁺ signaling, and oxidative injuries [4, 5]. Glutamatergic excitotoxicity, considered a triggering factor for neural death in AD [6], is characterized by glutamate accumulation in the synaptic cleft resulted from increased glutamate release from the presynaptic terminal [7] and/or reduced astrocytic glutamate uptake [8], besides the subsequent overactivation of glutamate receptors in synaptic terminals [9]. The neuronal exposure to high glutamate levels is implicated in cytosolic Ca²⁺ overload, mitochondrial impairment, ROS (reactive oxygen species) damage, energetic failure, and cell death [5, 10].

The synaptic mitochondrial damage caused by A β O leads to membrane potential depolarization and dysregulated Ca²⁺ signaling, impairing ATP production and causing severe energetic insufficiency in the synapse, a region of high energy demand [11, 12]. In physiological conditions, mechanisms involving the high

✉ Diogo O. Souza
 diogo.bioq@gmail.com

¹ Graduate Program in Biological Sciences - Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brazil

² Department of Biological Sciences, Integrated Regional University of High Uruguay and Missions – URI, Erechim, Brazil

³ Laboratory of Bioenergetics and Mitochondrial Physiology, Graduate Program in Cellular Biophysics and Biochemistry, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Health Sciences Centre, Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE OPEN



Astrocyte biomarker signatures of amyloid- β and tau pathologies in Alzheimer's disease

João Pedro Ferrari-Souza^{1,2}, Pâmela C. L. Ferreira¹, Bruna Bellaver¹, Cécile Tissot^{1,3}, Yi-Ting Wang³, Douglas T. Leffa⁴, Wagner S. Brum^{2,5,6}, Andréa L. Benedet^{3,5}, Nicholas J. Ashton^{5,6,7,8}, Marco Antônio De Bastiani^{1,2}, Andréia Rocha^{1,2}, Joseph Therriault^{1,3}, Firoza Z. Lussier^{1,3}, Mira Chamoun³, Stijn Servaes³, Gleb Bezgin³, Min Su Kang³, Jenna Stevenson³, Nesrine Rahmouni³, Vanessa Pallen³, Nina Margherita Poltronetti³, William E. Klunk¹, Dana L. Tudorascu¹, Ann D. Cohen¹, Victor L. Villemagne¹, Serge Gauthier³, Kaj Blennow^{1,5,6}, Henrik Zetterberg^{1,5,6,9,10,11}, Diogo O. Souza², Thomas K. Karikari^{1,5,6}, Eduardo R. Zimmer^{2,12,13,14}, Pedro Rosa-Neto^{1,3,14} and Tharick A. Pascoal^{1,14}✉

© The Author(s) 2022

Astrocytes can adopt multiple molecular phenotypes in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients. Here, we studied the associations of cerebrospinal fluid (CSF) glial fibrillary acidic protein (GFAP) and chitinase-3-like protein 1 (YKL-40) levels with brain amyloid- β (A β) and tau pathologies. We assessed 121 individuals across the aging and AD clinical spectrum with positron emission tomography (PET) brain imaging for A β (¹⁸F]AZD4694) and tau (¹⁸F]JMK-6240), as well as CSF GFAP and YKL-40 measures. We observed that higher CSF GFAP levels were associated with elevated A β -PET but not tau-PET load. By contrast, higher CSF YKL-40 levels were associated with elevated tau-PET but not A β -PET burden. Structural equation modeling revealed that CSF GFAP and YKL-40 mediate the effects of A β and tau, respectively, on hippocampal atrophy, which was further associated with cognitive impairment. Our results suggest the existence of distinct astrocyte biomarker signatures in response to brain A β and tau accumulation, which may contribute to our understanding of the complex link between reactive astrogliosis heterogeneity and AD progression.

Molecular Psychiatry(2022) 27:4781–4789; <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01716-2>

INTRODUCTION

Reactive astrocytes play an important role in Alzheimer's disease (AD) pathophysiology [1–5]. Post-mortem studies suggest that both amyloid- β (A β) and tau pathologies are associated with astrocyte reactivity [1, 6]. Far from displaying a homogenous response, transcriptomics analyses demonstrated that reactive astrocytes can acquire multiple molecular phenotypes in the AD brain [7]. The context-specific aspects of astrocyte reactivity [8] raise the possibility that astrocytes respond differently to AD-related brain processes. In fact, experimental evidence indicates the presence of distinct molecular astrocyte signatures in response to A β and tau pathologies [9, 10]. However, knowledge about A β - and tau-specific contributions to reactive astrocyte biomarkers in patients with AD is still limited.

Reactive astrocytes overexpress specific proteins that can be released into the extracellular compartment, being measured in

the cerebrospinal fluid (CSF) of living individuals [8, 11]. CSF levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and chitinase-3-like protein 1 (YKL-40), biomarkers of astrocyte reactivity [8, 11], are consistently elevated in the dementia phase of AD [12], and in some other brain disorders such as multiple sclerosis [13, 14]. Although GFAP and YKL-40 fluid concentrations have already been shown to correlate with AD pathophysiology [15–20], no previous study has investigated the existence of A β - and tau-related astrocyte responses in the human brain. Identifying astrocyte biomarker signatures related to AD proteinopathies has the potential to provide insights into the role of astrocytes in disease progression, allow disease staging, and can lead to the development of drugs targeting distinct reactive astrocyte phenotypes.

In a cohort of individuals across the aging and AD clinical spectrum, we tested whether CSF GFAP and YKL-40 are distinctly associated with A β and tau pathologies. We also investigated

¹Department of Psychiatry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA. ²Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ³Translational Neuroimaging Laboratory, McGill University Research Centre for Studies in Aging, Alzheimer's Disease Research Unit, Douglas Research Institute, Le Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSSS) de l'ouest-de-l'île-de-Montréal; Department of Neurology and Neurosurgery, Psychiatry and Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, QC, Canada. ⁴ADHD Outpatient Program & Development Psychiatry Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil. ⁵Department of Psychiatry and Neurochemistry, The Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Mölndal, Sweden. ⁶Clinical Neurochemistry Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Sweden. ⁷Wallenberg Centre for Molecular and Translational Medicine, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden. ⁸Department of Old Age Psychiatry, Institute of Psychiatry, Psychology & Neuroscience, Kings College London, London, UK. ⁹Department of Neurodegenerative Disease, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK. ¹⁰UK Dementia Research Institute at UCL, London, UK. ¹¹Hong Kong Center for Neurodegenerative Diseases, Hong Kong, China. ¹²Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ¹³Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ¹⁴These authors contributed equally: Eduardo R. Zimmer, Pedro Rosa-Neto, Tharick A. Pascoal. ✉email: PASCOAL@pitt.edu

Received: 9 February 2022 Revised: 15 July 2022 Accepted: 20 July 2022
Published online: 10 August 2022



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Brain Behavior and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Hippocampal GFAP-positive astrocyte responses to amyloid and tau pathologies

Marco Antônio De Bastiani ^{a,1}, Bruna Bellaver ^{a,b,1}, Wagner S. Brum ^{a,c}, Debora G. Souza ^{a,m}, Pamela C.L. Ferreira ^b, Andreia S. Rocha ^a, Guilherme Povala ^{a,b}, João Pedro Ferrari-Souza ^{a,b}, Andrea L. Benedet ^c, Nicholas J. Ashton ^{c,d,e,f}, Thomas K. Karikari ^{b,c,d}, Henrik Zetterberg ^{c,d,g,h,i}, Kaj Blennow ^{c,d}, Pedro Rosa-Neto ^j, Tharick A. Pascoal ^b, Eduardo R. Zimmer ^{a,k,l,m,*}, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative

^a Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Psychiatry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

^c Department of Psychiatry and Neurochemistry, The Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Mölndal, Sweden

^d Clinical Neurochemistry Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Sweden

^e Wallenberg Centre for Molecular and Translational Medicine, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

^f Department of Old Age Psychiatry, Institute of Psychiatry, Psychology & Neuroscience, King's College London, London, UK

^g Department of Neurodegenerative Disease, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK

^h UK Dementia Research Institute at UCL, London, UK

ⁱ Hong Kong Center for Neurodegenerative Diseases, Hong Kong, China

^j Translational Neuroimaging Laboratory (TNL), McGill Center for Studies in Aging (MCSA), Douglas Mental Health University Institute, Departments of Neurology and Neurosurgery, Psychiatry, and Pharmacology, McGill University, Montreal, Canada

^k Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^l Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^m Brain Institute of Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Biomarker

GFAP

Alzheimer's disease

Amyloid

Tau

ABSTRACT

Introduction: In Alzheimer's disease clinical research, glial fibrillary acidic protein (GFAP) released/leaked into the cerebrospinal fluid and blood is widely measured and perceived as a biomarker of reactive astrogliosis. However, it was demonstrated that GFAP levels differ in individuals presenting with amyloid- β (A β) or tau pathologies. The molecular underpinnings behind this specificity are little explored. Here we investigated biomarker and transcriptomic associations of hippocampal GFAP-positive astrocytes with A β and tau pathologies in humans and mouse models.

Methods: We studied 90 individuals with plasma GFAP, A β - and Tau-PET to investigate the association between biomarkers. Then, transcriptomic analysis in hippocampal GFAP-positive astrocytes isolated from mouse models presenting A β (PS2APP) or tau (P301S) pathologies was conducted to explore differentially expressed genes (DEGs), Gene Ontology terms, and protein-protein interaction networks associated with each phenotype.

Results: In humans, we found that plasma GFAP associates with A β but not tau pathology. Unveiling the unique nature of hippocampal GFAP-positive astrocytic responses to A β or tau pathologies, mouse transcriptomics showed scarce overlap of DEGs between the A β and tau mouse models. While A β GFAP-positive astrocytes were overrepresented with DEGs associated with proteostasis and exocytosis-related processes, tau hippocampal GFAP-positive astrocytes presented greater abnormalities in functions related to DNA/RNA processing and cytoskeleton dynamics.

Conclusion: Our results offer insights into A β - and tau-driven specific signatures in hippocampal GFAP-positive astrocytes. Characterizing how different underlying pathologies distinctly influence astrocyte responses is

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2500 Ramiro Barcelos Street, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: eduardo.zimmer@ufrgs.br (E.R. Zimmer).

¹ Both authors contributed equally to this article.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.03.001>

Received 8 September 2022; Received in revised form 10 January 2023; Accepted 1 March 2023

Available online 4 March 2023

0889-1591/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Neuroinflammation Biomarkers in the AT(N) Framework Across the Alzheimer's Disease Continuum

A. Bieger¹, A. Rocha¹, B. Bellaver^{1,2}, L. Machado¹, L. Da Ros¹, W.V. Borelli³, J. Therriault^{4,5,6}, A.C. Macedo^{4,5,6}, T.A. Pascoal², S. Gauthier^{4,5,6}, P. Rosa-Neto^{4,5,6}, E.R. Zimmer^{1,3,5,7,8}

1. Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; 2. Department of Neurology and Psychiatry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA; 3. Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; 4. Translational Neuroimaging Laboratory, McGill University Research Centre for Studies in Aging, Alzheimer's Disease Research Unit, Douglas Research Institute, Le Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSSS) de l'Ouest-de-l'Île-de-Montréal; Department of Neurology and Neurosurgery, Psychiatry and Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Canada; 5. Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montréal, Québec, Canada; 6. Montreal Neurological Institute, Montréal, Québec, Canada; 7. Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; 8. Brain Institute of Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author: Dr. Eduardo R. Zimmer, PhD, BPharm, Assistant Professor Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 90035-003, e-mail: eduardo.zimmer@ufrgs.br, Phone: +55 51 3308-5558, Website: www.zimmer-lab.org

Abstract

In the past years, neuroinflammation has been widely investigated in Alzheimer's disease (AD). Evidence from animal, *in vivo* and post-mortem studies has shown that inflammatory changes are a common feature of the disease, apparently happening in response to amyloid-beta and tau accumulation. Progress in imaging and fluid biomarkers now allows for identifying surrogate markers of neuroinflammation in living individuals, which may offer unprecedented opportunities to better understand AD pathogenesis and progression. In this context, inflammatory mediators and glial proteins (mainly derived from microglial cells and astrocytes) seem to be the most promising biomarkers. Here, we discuss the biological basis of neuroinflammation in AD, revise the proposed neuroinflammation biomarkers, describe what we have learned from anti-inflammatory drug trials, and critically discuss the potential addition of these biomarkers in the AT(N) framework.

Keywords: Alzheimer's disease, astrocyte, biomarker, microglia, neuroinflammation.

Introduction

Since its first description in 1906, Alzheimer's disease (AD) has been consistently associated with amyloid-beta (A β) plaques and tau neurofibrillary tangles. The pathological potential of glial cells has also been described, but less mentioned, by Alois Alzheimer's original reports (1). Neuroinflammation was later associated with the disease's pathological process, likely playing a fundamental role in potentiating A β and tau pathologies in the brain (2).

In the last years, AD diagnosis shifted from a clinical construct to a biological definition, allowing for identifying pre-symptomatic AD stages – the so-called preclinical AD. The National Institute on Aging – Alzheimer's Association (NIA-AA) 2018 proposed a research framework based on biomarkers, independently

Received January 18, 2023

Accepted for publication March 29, 2023

from clinical presentations – the AT(N) system (3). It essentially defines AD according to the biomarker positivity for A β (A), Tau (T), and neurodegeneration (N). Moreover, this dynamic system may incorporate novel candidate biomarkers to provide information about additional pathophysiological mechanisms represented by other letters. Hampel and colleagues propose using the letter "X" to represent an additional group of promising pathological markers, with neuroinflammation being of high interest (4).

Neuroinflammation in AD is typically associated with glial changes in the brain. This complex process includes microglial cells and astrocytes associated with a cascade of inflammatory mediators and modulators (2). A growing body of evidence suggests that the inflammatory process may occur in the early stages of AD, potentiating the accumulation of insoluble A β and tau (5). It is thought that inflammatory changes are a response to A β and tau pathologies, but one cannot rule out that they are triggering the deposition of A β and tau in the brain (6-8). Also, early inflammation might protect against protein accumulation, which could explain why some studies have shown conflicting results (9, 10). Thus, biomarkers of neuroinflammation may become useful for early diagnosis, prognosis, and potential drug-target engagement in the secondary prevention of AD.

In this review, we explore the biological basis of neuroinflammation in AD, especially the roles of microglial cells and astrocytes, and provide detailed information on current biomarkers of neuroinflammatory changes. We also describe advances and contributions of anti-inflammatory drug trials and discuss the potential of adding biomarkers of neuroinflammation in the AT(N) framework.

ANEXO B: Artigo científico publicado durante o período de doutoramento que não possui conteúdo associado ao tema do projeto de doutorado.

Artigo "***Structural and biochemical analysis of phosphoethanolamine methyltransferase from the pine wilt nematode *Bursaphelenchus xylophilus****" publicado no periódico "***Molecular & Biochemical Parasitology***". Este estudo foi conduzido durante o curso "*Laboratory in Protein Analysis, Proteomics, and Protein Structure*" realizado na Washington University in St. Louis. Sua elaboração teve o propósito de servir como uma ferramenta de ensino para as técnicas de análise de proteínas.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molbiopara

Structural and biochemical analysis of phosphoethanolamine methyltransferase from the pine wilt nematode *Bursaphelenchus xylophilus*



Soon Goo Lee, Michelle S. Chung, Antea J. DeMarsilis, Cynthia K. Holland, Rohit V. Jaswaney, Cherry Jiang, Jakob H.P. Kroboth, Kevin Kulshrestha, Raymundo Z.W. Marcelo, Vidhya M. Meyyappa, Grant B. Nelson, Janki K. Patel, Alex J. Petronio, Samantha K. Powers, Peter R. Qin, Mythili Ramachandran, Divya Rayapati, John A. Rincon, Andreia Rocha, Joan Gabriel Rodinho Nunes Ferreira, Micah K. Steinbrecher, Kaisen Yao, Eric J. Zhang, Angela J. Zou, Margery Gang, Melanie Sparks, Barrie Cascella, Wilhelm Cruz, Joseph M. Jez *

Department of Biology, Washington University in St. Louis, One Brookings Drive, St. Louis, MO, 63130, United States

ARTICLE INFO

Keywords:

Nematode parasite
Methyltransferase
Phosphobase methylation pathway
Biochemistry
Protein structure

ABSTRACT

In free-living and parasitic nematodes, the methylation of phosphoethanolamine to phosphocholine provides a key metabolite to sustain phospholipid biosynthesis for growth and development. Because the phosphoethanolamine methyltransferases (PMT) of nematodes are essential for normal growth and development, these enzymes are potential targets of inhibitor design. The pine wilt nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) causes extensive damage to trees used for lumber and paper in Asia. As a first step toward testing BxPMT1 as a potential nematocidal target, we determined the 2.05 Å resolution x-ray crystal structure of the enzyme as a dead-end complex with phosphoethanolamine and S-adenosylhomocysteine. The three-dimensional structure of BxPMT1 served as a template for site-directed mutagenesis to probe the contribution of active site residues to catalysis and phosphoethanolamine binding using steady-state kinetic analysis. Biochemical analysis of the mutants identifies key residues on the β 1d- α 6 loop (W123F, M126I, and Y127F) and β 1e- α 7 loop (S155A, S160A, H170A, T178V, and Y180F) that form the phosphobase binding site and suggest that Tyr127 facilitates the methylation reaction in BxPMT1.

Membrane biogenesis is a critical process in all organisms and involves the biosynthetic assembly of phospholipids with appropriate head-groups [1]. For the synthesis of phosphatidylcholine, a major component of biological membranes, different organisms employ a variety of pathways. Mammals, fungi, and some bacteria rely on the *de novo* choline or Kennedy pathway for the conversion of choline to phosphocholine (pCho), which is then incorporated into phosphatidylcholine [2,3]. Complementing this route in mammals and in yeast, the enzymes of the Bremer-Greenberg pathway methylate phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine [4]. In contrast to these two pathways, plants, nematodes, and apicomplexan parasites use the phosphobase methylation pathway (Fig. 1 a) to convert phosphoethanolamine (pEA) to pCho, which then enters the Kennedy pathway for phospholipid synthesis [5–10].

The phosphobase methylation pathway employs a sequential series

of S-adenosylmethionine (AdoMet)-dependent methylation reactions to convert pEA to phosphomonomethylethanolamine (pMME), phosphodimethylethanolamine (pDME), and pCho (Fig. 1 a) [6–10]. This pathway was originally identified in plants with biochemical and genetic studies demonstrating that a multi-domain phosphoethanolamine methyltransferase (PMT) catalyzed all three methylation reactions and that the pathway is critical for normal plant growth and development [5,6,10–13]. The plant PMT (or type 1 PMT) contain two methyltransferase domains with the N-terminal MT1 domain being highly-specific for the conversion of pEA to pMME and the C-terminal MT2 domain catalyzing the methylations of pMME to pDME and pDME to pCho (Fig. 1 b) [6,11,12,15]. Subsequent studies identified the type 2 PMT from the malaria parasite *Plasmodium falciparum* and other apicomplexan parasites and demonstrated that the phosphobase methylation pathway is required for transmission of malaria [7,16–18]. Unlike

Abbreviations: AdoCys, S-adenosylhomocysteine; AdoMet, S-adenosylmethionine; NTA, nitrilotriacetic acid; pCho, phosphocholine; pDME, phosphodimethylethanolamine; pEA, phosphoethanolamine; pMME, phosphomonomethylethanolamine; PMT, phosphoethanolamine methyltransferase

[✉] Corresponding author.

E-mail address: jjez@wustl.edu (J.M. Jez).

<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111291>

Received 23 April 2020; Received in revised form 11 May 2020; Accepted 15 May 2020

Available online 30 May 2020

0166-6851/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.