

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LUCAS ZINGANO SUARDI

**ESTUDO DA FUNÇÃO DO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO
ENCÉFALO NO METABOLISMO DA GLICOSE EM FATIAS HIPOCAMPAIS
AGUDAS DE RATOS**

Porto Alegre
2018

LUCAS ZINGANO SUARDI

**ESTUDO DA FUNÇÃO DO FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO
ENCÉFALO NO METABOLISMO DA GLICOSE EM FATIAS HIPOCAMPAIS
AGUDAS DE RATOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas
da Saúde da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina

Orientadora: Dr^a. Letícia Rodrigues

Co-orientadora: Msc. Krista Minéia Wartchow

Porto Alegre

2018

Suardi, Lucas Zingano

ESTUDO DA FUNÇÃO DO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO
ENCÉFALO NO METABOLISMO DA GLICOSE EM FATIAS

HIPOCAMPAIS AGUDAS DE RATOS / Lucas Zingano Suardi. -

- 2018.

59 f.

Orientador: Leticia Rodrigues.

Coorientador: Krista Minéia Wartchow.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. BDNF. 2. GSH. 3. Metabolismo da Glicose. 4.
Astrócito. I. Rodrigues, Leticia, orient. II.
Wartchow, Krista Minéia, coorient. III. Título.

LUCAS ZINGANO SUARDI

**ESTUDO DA FUNÇÃO DO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO
ENCÉFALO NO METABOLISMO DA GLICOSE EM FATIAS HIPOCAMPAIS
AGUDAS DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 06 de Julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Larissa D. Bobermin - UFRGS

Dr^a Patrícia Nardim – UFRGS

Dr^a Letícia Rodrigues – UFRGS (Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo aos meus pais, Cristiane e Roberto, por todo o suporte e amor que me deram durante o período de confecção deste trabalho, assim como, sempre foi na minha vida. Sou muito grato a vocês dois por tudo o que fui, sou e me tornarei, muito obrigado por fazerem em mim um reflexo do que vocês são.

Agradeço as minhas orientadoras e minhas mães durante esse trabalho que sempre estiveram ao meu lado me dando todo o apoio que precisei durante os meus momentos de nervosismo e estresse. Lets, muito obrigado por tudo o que tu me ajudaste e ensinou na hora de montar esse trabalho, sem contar no teu jeito de ser que alegria meus aprendizados durante o meu tempo de iniciação científica, tu és demais e te admiro muito. Krista, a mãe que me “pariu” no laboratório, porque me selecionou para ser bolsista de iniciação científica, que conseqüentemente me trouxe a onde estou hoje. Tudo o que aprendi e começo a ser no meio científico é graças a ti. Muito obrigado por tudo mesmo, por todos teus ensinamentos, puxões de orelha, conselhos e amizade. Muito obrigado a vocês duas, estarão sempre em meu coração.

E por falar em estar no meu coração, aos meus amigos/irmãos dentro do laboratório de proteínas ligantes de cálcio: Nicholas, Bárbara, Lily, Éder, Jéssica e Aline. Muito obrigado por todo o apoio de vocês sempre, se não fosse pela ajuda de vocês não teria os resultados para esse TCC, apesar de me cobrarem bolo pelo serviço. A Nina, que já não está mais no laboratório conosco, também faz parte dessas pessoas que estão no meu coração e que levarei para vida, muito obrigado pelos ensinamentos que me passou. Ao nosso chefe CA, muito obrigado pela oportunidade de ser aluno seu de iniciação científica, e muito obrigado pelo exemplo de pessoa que tu és.

E por fim, mas não menos importante agradeço a Deus pela vida que possuo, pelas amizades que me foram proporcionadas até agora e por todos os ensinamentos que me são passados.

Resplandecente é a Sabedoria e sua beleza é inalterável: os que a procuram encontram-na. Ela antecipa-se aos que a desejam. Quem, para possuí-la, levanta-se de madrugada, não terá trabalho, porque a encontrará sentada à sua porta. Ela mesma vai à procura dos que são dignos dela (...) porque, verdadeiramente, desde o começo, seu desejo é instruir, e desejar instruir-se é amá-la.

(Livro da Sabedoria)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeito do tratamento com BDNF sobre a viabilidade celular	24
Figura 2	O tratamento com BDNF não alterou a captação de glicose	25
Figura 3	O BDNF não alterou a liberação de lactato	25
Figura 4	O efeito do tratamento com BDNF na produção de GSH	26
Figura 5	O tratamento com BDNF aumentou a secreção de S100B	26

RESUMO

Os neurônios e astrócitos são os tipos celulares mais abundantes no sistema nervoso central (SNC) e possuem uma íntima relação. Os astrócitos desempenham funções cooperativas com os neurônios, onde eles realizam a reciclagem de neurotransmissores, promovem a homeostasia de íons, auxiliam com o metabolismo energético e desempenham uma defesa antioxidante. O suporte energético que os astrócitos realizam acontece através da metabolização da glicose até lactato, o qual é transportado aos neurônios, onde servirá de substrato energético. A atividade antioxidante desempenhada pelos astrócitos se dá pela produção da glutathiona (GSH). O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é uma neurotrofina principalmente secretada por neurônios com papel na sobrevivência e diferenciação celular de neurônios, o transporte de aminoácidos, metabolismo da glicose e atividade antioxidante. Assim sendo, o objetivo desse estudo foi investigar o papel do BDNF como um modulador do metabolismo da glicose no SNC, com ênfase nos astrócitos, a partir do conteúdo de GSH. Para isso se utilizou um protocolo de fatias hipocâmpais agudas. As fatias foram obtidas a partir de ratos Wistar de 30 dias e passaram por um processo de estabilização. Após a estabilização as fatias foram tratadas com BDNF, em concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL durante uma hora. Depois foi coletado o sobrenadante para avaliar a liberação de lactato desidrogenase (LDH), a secreção de lactato e de S100B, e as fatias foram utilizadas para o ensaio da captação de glicose e análise do conteúdo de GSH. O resultado obtido pela liberação de LDH mostrou que o tratamento com BDNF não causou danos à viabilidade celular das fatias, sugerindo que os demais resultados foram de secreção e resposta celular, e não por dano à membrana. A captação de glicose e a secreção de lactato após o tratamento com BDNF não mostraram diferença significativa quando comparados ao tratamento basal. Porém, o conteúdo de GSH e a secreção de S100B tiveram um aumento significativo após o tratamento com BDNF nas concentrações de 10 e 100 ng/mL, respectivamente. Assim, é possível concluir que o BDNF apresentou uma ação moduladora sobre os astrócitos quanto ao aumento de GSH e ao aumento da secreção de S100B. Portanto, para melhor esclarecimento de como o BDNF atua nessa modulação serão necessários estudos futuros para investigar os meios pelos quais esses aumentos ocorrem.

Palavras-chaves: Astrócitos; BDNF; GSH; Metabolismo da Glicose.

ABSTRACT

Neurons and astrocytes are the most abundant cell types in the central nervous system (CNS) and have an intimate relationship. Astrocytes perform cooperative functions with neurons, where they perform the recycling of neurotransmitters, promote ion homeostasis, assist with energy metabolism and play an antioxidant defense. The energy support that astrocytes perform happens through the metabolism of glucose to lactate, which is transported to the neurons, where it will serve as an energy substrate. The antioxidant activity performed by the astrocytes occurs through the production of glutathione (GSH). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin mainly secreted by neurons playing roles in regulating survival and cellular differentiation of neurons, amino acid transport, glucose metabolism and antioxidant activity. Thus, the objective of this study was to investigate the role of BDNF as a modulator of glucose metabolism in the CNS, with an emphasis on astrocytes, through the production of GSH. A protocol of acute hippocampal slices was used. The slices were obtained from 30-days old Wistar rats and underwent a stabilization process. After stabilization the slices were treated with BDNF at concentrations of 1, 10 and 100 ng / ml for one hour. After, the supernatant was collected to evaluate the release of lactate dehydrogenase (LDH), lactate secretion and S100B. The slices were used for the glucose uptake assay and GSH content analysis. The results obtained by the LDH release showed that treatment with BDNF did not cause damage to the cellular viability of the slices, suggesting that the other results were related to cellular response secretion and not membrane damage. Glucose uptake and lactate secretion after BDNF treatment showed no significant difference when compared to baseline treatment. However, GSH content and S100B secretion had a significant increase after treatment with BDNF at concentrations of 10 and 100 ng / mL, respectively. Thus, it is possible to conclude that BDNF showed a modulatory action on astrocytes regarding the increase of GSH and the increase of secretion of S100B. Therefore, to further elucidate how BDNF works in this modulation, future studies will be required to investigate the mechanisms of these alterations.

Keywords: Astrocytes; BDNF; GSH; Glucose metabolism

SUMÁRIO

RESUMO	8
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 METABOLISMO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).....	11
1.1.1 Astrócitos.....	11
1.2 FATOR NEURONAL DERIVADO DO ENCÉFALO (BDNF).....	13
1.3 JUSTIFICATIVA	15
1.4 OBJETIVOS	16
1.4.1 Objetivo Geral	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16
2 ARTIGO CIENTÍFICO	17
Resumo	19
1. Introdução	20
2. Materiais e métodos.....	21
3. Resultados	24
4. Discussão	28
5. Conclusão	30
3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO I	40
NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NEUROSCIENCE LETTERS	40
GUIDE FOR AUTHORS.....	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 METABOLISMO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

O Sistema Nervoso Central (SNC) é composto por diferentes tipos celulares, sendo o neurônio e o astrócito as células mais abundantes. No começo dos estudos do SNC, acreditava-se que os neurônios eram os únicos responsáveis pelo processamento da informação, enquanto que aos astrócitos, como células gliais, só se atribuía a função de suporte aos neurônios (PEREA; ARAQUE, 2005). Recentemente, há evidências de que as células gliais, principalmente os astrócitos, não atuam somente como um elemento de suporte, mas como um elemento ativo em funções cerebrais essenciais (VAN ELDIK; WAINWRIGHT, 2003). O SNC necessita de um grande aporte energético, pois 50% da energia total consumida está associada com a sinalização neural, com a manutenção dos potenciais de membrana e com a reciclagem de neurotransmissores (HOWARTH; GLEESON; ATTWELL, 2012).

1.1.1 Astrócitos

Os astrócitos, as células gliais mais abundantes do SNC, possuem uma intrínseca relação com os neurônios e são as principais células responsáveis pela manutenção da homeostase do SNC. Eles expressam uma ampla gama de receptores, transportadores e canais iônicos, idealmente posicionados para participar e modular dinamicamente a atividade neural. Os astrócitos cooperam com os neurônios em vários níveis, incluindo tráfico e reciclagem de neurotransmissores, homeostase de íons, metabolismo energético e defesa antioxidante (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009).

A glicose é o principal substrato energético do metabolismo cerebral (SOKOLOFF et al., 1977) sendo os astrócitos o principal tipo celular responsável pela sua captação. Sabe-se que o papel dos astrócitos no metabolismo energético está relacionado com a hipótese do transporte de lactato a partir dos astrócitos para os neurônios, bem como com a captação de glicose a partir da circulação sanguínea. (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). A captação de glicose ocorre via transportadores GLUT-1, através da ativação da bomba Na^+/K^+ - ATPase na

superfície astrocitária (LEINO et al., 1997; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). Além do suprimento energético próprio, o astrócito remaneja o piruvato formado a partir da glicólise e desvia para a síntese de lactato. O lactato produzido será liberado e captado pelos neurônios, onde sofrerá oxidação e formará adenosina trifosfato (ATP), que fornece energia necessária para o neurônio (PELLERIN, 2008). O lactato é utilizado pelos neurônios como um substrato aeróbico sob circunstâncias precisas necessárias (PELLERIN et al., 2007).

Os astrócitos também possuem três principais proteínas específicas utilizadas como marcadores: proteína ácida fibrilar glial (GFAP), a enzima glutamina sintetase (GS) e a S100B (KIMELBERG; NEDERGAARD, 2010). A GFAP é o principal filamento intermediário de astrócitos maduros do SNC e é considerada como um dos principais antígenos utilizados para identificação do comportamento dos astrócitos. (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000).

No SNC, a GS é uma enzima que participa da reciclagem do neurotransmissor glutamato para o aminoácido glutamina (JAYAKUMAR; NORENBURG, 2016). Em organismos aeróbicos, há a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à respiração mitocondrial na síntese de moléculas de ATP. Em um dos mecanismos de prevenção de danos, as ROS são reduzidas pela GSH que é um antioxidante não enzimático podendo ter sua ação dependente de GSH peroxidase dependente de selênio. Neste processo a GSH é oxidada a GSSG, no qual é reduzida novamente a GSH pela GSSG redutase utilizando fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) (FERNÁNDEZ-CHECA et al., 1997; GARCIA-RUIZ; FERNANDEZ-CHECA, 2006; LU, 2009). Em mamíferos, o NADPH é principalmente proveniente da via das pentoses-fosfato. (HANUKOGLU; RAPOPORT, 1995). No SNC, a GSH é a molécula antioxidante de maior relevância e para a sua síntese existem duas enzimas envolvidas a glutamato-cisteína ligase (GCL), que é o primeiro passo para a via biossintética da GSH, e a GS, também presente nos astrócitos. (LU, 2013). Além disso, o sistema trocador cistina/glutamato que apresenta um importante papel nas células astrogliais, porque ele envolve a captação de cistina que posteriormente será reduzida à cisteína que é utilizado na síntese de GSH (LEWERENZ et al., 2013; SEIB; PATEL; BRIDGES, 2011).

A S100B é uma proteína ligante de cálcio expressa e secretada no SNC principalmente por astrócitos. Esta proteína exerce efeitos autócrinos e parácrinos sobre outras células gliais e neurônios, encarregando-se também de papéis

intracelulares e extracelulares importantes no SNC (DONATO, 2003; DONATO et al., 2009, 2013). A S100B regula muitas proteínas intracelulares (DONATO, 2003; DONATO et al., 2013), incluindo GFAP (FRIZZO et al., 2004) e outras duas enzimas glicolíticas, frutose-1,6-bisfosfato aldolase e fosfoglicomutase (LANDAR et al., 1996; ZIMMER; VAN ELDIK, 1986). Dentre os efeitos extracelulares de S100B, há a sua ligação ao receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) que pode ocasionar uma diminuição do metabolismo da glicose no tecido cerebral. (ROJAS et al., 2013; WARTCHOW et al., 2016).

1.2 FATOR NEURONAL DERIVADO DO ENCÉFALO (BDNF)

O BDNF pertence a uma família de neurotrofinas, proteínas que possuem um papel importante na formação e desenvolvimento do SNC. Existem evidências de que o BDNF atua na regulação, na sobrevivência e na diferenciação celular, como por exemplo, em neurônios colinérgicos e dopaminérgicos, em neurônios sensoriais e em outros tipos celulares (DAVIES, 1994; KORSCHING, 1993; LEWIN; BARDE, 1996). O BDNF é a neurotrofina mais abundante no SNC (KOWIAŃSKI et al., 2017) e alterações dessa neurotrofina no encéfalo, assim como alterações periféricas no plasma ou soro têm sido associadas a dano encefálico agudo ou doenças neurodegenerativas (FERNANDES et al., 2014). Mudanças hipocâmpais nos níveis de BDNF foram observadas em situações de toxicidade, como a hiperamonemia (GALLAND et al., 2017), exposição ao chumbo (BARANOWSKA-BOSIACKA et al., 2013) e excitotoxicidade (ROSA et al., 2016). No tecido cerebral o BDNF é principalmente produzido por neurônios, mas astrócitos são capazes de converter o pró-BDNF secretado pelo neurônio em BDNF (BERGAMI et al., 2008). Contudo, em condições de dano os astrócitos começam a expressar e secretar BDNF (KIMURA et al., 2016).

Estudos evidenciaram que o BDNF aumentou a quantidade de transportadores de aminoácidos – Na^+ dependentes, levando um aumento de Na^+ intracelular, que por sua vez, aumentou a ativação da bomba Na^+/K^+ -ATPase, o consumo de energia, e um estímulo à captação de glicose e expressão de GLUT3. (BURKHALTER et al., 2003). Ao estimular o transporte de glicose e a biogênese mitocondrial, o BDNF reforça a bioenergética celular e protege os neurônios contra lesões e doenças (MAROSI; MATTSON, 2014). O BDNF age tanto em neurônios

quanto em astrócitos regulando a formação de sinapses neurais, assim como, regulando o metabolismo da glicose e de lipídeos nos astrócitos, sustentando assim as interações metabólicas entre astrócitos e neurônios (FARGALI et al., 2012; MAROSI; MATTSON, 2014; MARTIN; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2013; SANTOS; COMPRIDO; DUARTE, 2010).

O BDNF possui uma atuação na sobrevivência neuronal através de uma regulação antioxidante. Ele regulariza os níveis de GSH e a superóxido dismutase (SOD) em células que estão sob estresse oxidativo. (GONG et al., 1999). Assim, o BDNF atua prevenindo um aumento de GSSG nas células sobre estresse e aumenta a atividade da glutathiona redutase. A indução de mecanismos de desintoxicação, como a GR, leva a uma proteção dos neurônios contra eventos de estresse oxidativo, e conseqüentemente morte celular (SPINA et al., 1992).

1.3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista as funções do BDNF relacionadas ao metabolismo energético neuronal e sua possível ação antioxidante, e os astrócitos serem o tipo celular responsável pela homeostasia, tanto energética quanto antioxidante do SNC, esse estudo, então, tem por premissa avaliar o BDNF como um fator trófico modulador do metabolismo da glicose em fatias hipocâmpais agudas, com ênfase nos astrócitos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Investigar o papel do BDNF como um modulador do metabolismo da glicose no SNC a partir do conteúdo de GSH.

1.4.2 Objetivos específicos

Utilizando um protocolo de fatias hipocampais agudas:

1. Estabelecer uma curva de tratamento com diferentes concentrações de BDNF.
2. Avaliar a viabilidade celular das fatias hipocampais após o tratamento com BDNF.
3. Avaliar a captação de glicose nas fatias hipocampais agudas após o tratamento com BDNF.
4. Avaliar a secreção de lactato nas fatias hipocampais após tratamento com BDNF.
5. Avaliar o conteúdo de GSH das fatias hipocampais após o tratamento com BDNF.
6. Avaliar a secreção de S100B das fatias após o tratamento com BDNF.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Periódico: Neuroscience Letters

Título: Estudo da função do fator neurotrófico derivado do encéfalo no metabolismo da glicose em fatias hipocampais agudas de ratos.

Normas da revista: disponível em <https://www.elsevier.com/journals/neuroscience-letters/0304-3940/guide-for-authors> e em Anexo I

ESTUDO DA FUNÇÃO DO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO NO METABOLISMO DA GLICOSE EM FATIAS HIPOCAMPAIS AGUDAS DE RATOS.

Lucas Zingano Suardi^{1*}, Bárbara Carolina Federhen¹, Nicholas Guerini Selistre¹, Ederson Borba¹, Lílian Juliana Lissner¹, Carlos-Alberto Gonçalves¹, Krista Minéia Wartchow¹, Letícia Rodrigues¹.

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600-anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

* Autor correspondente: Lucas Zingano Suardi, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 5133085567. E-mail: lucas_zingano@hotmail.com

Resumo

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é uma neurotrofina principalmente secretada por neurônios no sistema nervoso central (SNC). O BDNF pode atuar tanto em neurônios quanto em astrócitos que são os tipos celulares mais abundantes do SNC, onde ele pode desempenhar a função de regular a sobrevivência, adiferenciação celular de neurônios, o transporte de aminoácidos, o metabolismo da glicose e uma atividade antioxidante. Os astrócitos desempenham funções cooperativas com os neurônios, onde eles realizam a reciclagem de neurotransmissores, promovem a homeostasia de íons, auxiliam com o metabolismo energético e desempenham uma defesa antioxidante. O suporte energético que os astrócitos realizam acontece através da metabolização da glicose até lactato, o qual é transportado aos neurônios, onde servirá de substrato energético. A atividade antioxidante desempenhada pelos astrócitos se dá pela produção da glutathiona (GSH). Assim sendo, o objetivo desse estudo foi investigar o papel do BDNF como um modulador do metabolismo da glicose no SNC, com ênfase nos astrócitos, a partir do conteúdo de GSH. Para isso se utilizou um protocolo de fatias hipocâmpais agudas utilizando um tratamento com BDNF onde depois se avaliou a liberação de lactato desidrogenase (LDH), a secreção de lactato e de S100B, a captação de glicose e análise do conteúdo de GSH. O resultado obtido pela liberação de LDH mostrou que o tratamento com BDNF não causou danos quanto à viabilidade celular das fatias, sugerindo que os demais resultados foram de resposta celular de secreção e não por dano a membrana. A captação de glicose e a secreção de lactato após o tratamento com BDNF não mostraram diferença significativa quando comparados ao tratamento basal. Porém, o conteúdo de GSH e a secreção de S100B possuíram um aumento significativo após o tratamento com BDNF nas concentrações de 10 e 100 ng/mL, respectivamente. É possível concluir que o BDNF apresentou uma ação moduladora sobre os astrócitos quanto ao aumento de GSH e ao aumento da secreção de S100B. Portanto, para melhor esclarecimento de como o BDNF atua nessa modulação será necessário estudos futuros para investigar o meio no qual esses aumentos ocorrem.

Palavras-chaves: Astrócitos; BDNF; GSH; Metabolismo da Glicose.

1. Introdução

O Sistema Nervoso Central (SNC) é composto por diferentes tipos celulares, sendo o neurônio e o astrócito dois exemplos de células mais abundantes. No começo dos estudos do SNC, acreditava-se que os neurônios eram os únicos responsáveis pelo processamento da informação, enquanto que aos astrócitos, como células gliais, só se atribuía a função de suporte aos neurônios [1]. Recentemente, há evidências de que as células gliais, principalmente os astrócitos, não atuam somente como um elemento de suporte, mas como um elemento ativo em funções cerebrais essenciais [2]. O SNC necessita de um grande aporte energético, pois 50% da energia total consumida está associada com a sinalização neural, com a manutenção dos potenciais de membrana e com a reciclagem de neurotransmissores [3].

Os astrócitos possuem uma intrínseca relação com os neurônios e têm o papel fundamental no suporte energético [4], sendo a glicose o principal substrato energético do metabolismo cerebral [5]. A captação de glicose realizada pelos astrócitos via transportadores GLUT-1 acontece devido à ativação da bomba Na^+/K^+ - ATPase, para que assim a glicose possa entrar na via glicolítica. O piruvato formado a partir da glicólise pode ser desviado para a síntese de lactato, e este é liberado e captado pelos neurônios onde sofrerá oxidação e formará adenosina trifosfato (ATP) que resulta em energia necessária para o neurônio [6].

A S100B é uma proteína ligante de cálcio expressa e secretada no SNC principalmente por astrócitos. Esta proteína exerce efeitos autócrinos e parácrinos sobre outras células gliais e neurônios, encarregando-se também de papéis intracelulares e extracelulares importantes no SNC [28]. A S100B regula muitas proteínas intracelulares [30], incluindo GFAP e outras duas enzimas glicolíticas, frutose-1,6-bisfosfato aldolase e fosfoglicomutase. Dentre os efeitos extracelulares de S100B, há a sua ligação ao receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) que pode ocasionar uma diminuição do metabolismo da glicose no tecido cerebral [25].

Em organismos aeróbicos há a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à respiração mitocondrial na síntese de moléculas de ATP. Um dos mecanismos de prevenção de danos das ROS são reduzidas pela glutathiona (GSH). Neste processo a GSH é oxidada a GSSG, no qual é reduzida novamente a GSH

pela GSSG redutase utilizando fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) [9-11]. Em mamíferos, o NADPH é principalmente proveniente da via das pentoses-fosfato [12]. No SNC a GSH é a molécula antioxidante de maior relevância e para a sua síntese existem duas enzimas envolvidas a glutamato-cisteína ligase (GCL), que é o primeiro passo para a via biossintética da GSH, e a glutathiona sintetase (GS) [13]. Além disso, a GSH tem um sistema trocador cistina/glutamato que apresenta um importante papel nas células astrogliais, porque ele envolve a redução de cistina em cisteína que é utilizado na síntese de GSH [14,15].

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) pertence a uma família de neurotrofinas, que possuem um papel importante na formação e desenvolvimento do SNC. Existem evidências de que o BDNF atua na regulação, na sobrevivência e na diferenciação celular, como por exemplo, em neurônios colinérgicos e dopaminérgicos, em neurônios sensoriais e em outros tipos celulares [16-19]. Estudos recentes mostraram que o BDNF tem o efeito de aumentar o transporte de aminoácidos dependentes de Na^+ , como o glutamato, levando a um aumento deste íon intracelular. Conseqüentemente, este aumento leva a uma ativação da bomba Na^+/K^+ - ATPase sendo necessário o consumo de ATPs e o estímulo da captação de glicose [20].

Tendo em vista que o BDNF leva a um aumento da captação de glicose via transportador GLUT-3 em neurônios [20], e os astrócitos desempenharem a função de suporte energético e antioxidante no SNC [6], acreditamos que a produção ou manutenção de GSH pode ocorrer devido ao metabolismo da glicose nos astrócitos [14,15,21]. Portanto, o presente estudo teve por premissa verificar a influência do BDNF como um modulador na captação de glicose em astrócitos. Isto conseqüentemente poderá aumentar os níveis de NADPH, os quais poderão influenciar no aumento da síntese e secreção de GSH nas fatias hipocâmpais agudas de ratos.

2. Materiais e métodos

2.1 Fatias hipocâmpais agudas

Para a obtenção das fatias hipocâmpais agudas foram utilizados ratos Wistar machos de 30 dias, provenientes da colônia de reprodução (Departamento de

Bioquímica, UFRGS), com a aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (número do processo 28035).

Os ratos sofreram eutanásia por decapitação e seus hipocampus foram removidos. A estrutura foi fatiada com o auxílio do *Mclivain tissue chopper*, obtendo-se fatias transversais com espessura de 300 µm. Em seguida, as fatias passaram por um processo de estabilização, que consistiu em mantê-las em meio salina com os seguintes componentes (em mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄; e 10 glicose, com pH ajustado para 7,4. Este meio foi trocado a cada 15 min com novo meio salina a temperatura ambiente até completar o tempo de 120 min de estabilização [22]. Após o tempo de estabilização, o meio salina em que estavam as fatias hipocampais agudas foi removido para ser adicionado nos poços o tratamento com BDNF, também preparado em salina.

2.2 Tratamento das fatias

Para o tratamento e obtenção da curva de concentração (1 ng/mL, 10 ng/mL e 100 ng/mL), o BDNF foi dissolvido em água, em uma solução mãe de 10 µg/mL. Essa solução mãe foi então diluída em meio salina obtendo-se uma solução intermediária de 100 ng/mL.

O meio salina em que as fatias foram estabilizadas foi totalmente removido para que se adicionasse 300 µL da solução intermediária de BDNF nos poços com tratamento de concentração 100 ng/mL; 30 µL da solução intermediária de BDNF mais 270 µL de meio salina nos poços com tratamento de concentração 10 ng/mL; 3 µL de solução intermediária de BDNF mais 297 µL de meio salina para os poços com tratamento de concentração 1 ng/mL, e 300 µL de meio salina nos poços de tratamento basal. Transcorrido o tempo de 60 min de tratamento a 30° C o meio foi coletado para avaliação de LDH, de lactato e de S100B, e as fatias foram reservadas para avaliar a captação de glicose e conteúdo de GSH.

2.3 Liberação da Lactato Desidrogenase (LDH)

A liberação de lactato desidrogenase foi avaliada no meio extracelular após o tratamento através de um ensaio cinético Ultra Violeta comercial (BIOCLIN), seguindo as indicações do fabricante. [23].

2.4 *Captação de Glicose*

Nas fatias hipocâmpais, após tratamento, foi adicionado a solução balanceada de Hanks (HBSS) que consiste (em mM): 137 NaCl; 5,36 KCl; 1,26 CaCl₂; 0,41 MgSO₄; 0,49 MgCl₂; 0,63 Na₂HPO₄.7H₂O; 0,44 KH₂PO₄; 4,17 NaHCO₃; 5,55 de glicose e com pH ajustado para 7,2, permanecendo durante uma estabilização de 20 min a 35° C. O ensaio começou com a adição de 0,1 µCi/poço D-[3-³H] glicose. A incubação foi parada depois de transcorridos 30 min com o meio sendo removido e as fatias sendo lavadas por três vezes com HBSS gelado. As fatias foram lisadas em uma solução de 0,5 M de NaOH. A radioatividade das fatias foi medida por um cintilador. A captação de glicose foi, então, calculada subtraindo a captação não específica (obtida na presença de citocalasina B 25 µM – inibidor do transportador de glicose) a partir da captação total [24,25].

2.5 *Lactato*

A concentração de lactato foi avaliada no meio extracelular após o tratamento através de um ensaio cinético Ultra Violeta comercial (BIOCLIN), seguindo as indicações do fabricante.

2.6 *Conteúdo de Glutathiona*

Após tratamento, as fatias foram homogeneizadas em solução de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) contendo 0,005M de EDTA e as proteínas sendo precipitadas com 1,7% de ácido meta-fosfórico. O sobrenadante foi mensurado com o-ftaldialdeído (1 mg/mL de metanol) em temperatura ambiente por 15 minutos. A fluorescência foi medida com excitação e emissão em comprimentos de ondas de 350 e 420 nm, respectivamente. As concentrações da curva padrão de GSH variaram de 0 µM a 500 µM [26,27].

2.7 *Secreção de S100B*

A quantidade de S100B no meio de incubação foi determinada pela técnica de ELISA. [28]. Resumidamente, 50 µL de amostra mais 50 µL de tampão Tris foram incubados por 2 h em uma placa de microtitulação, previamente revestida com anticorpo monoclonal anti-S100B (SH-B1, da Sigma). O anticorpo policlonal anti-S100 (a DAKO) foi incubado durante 30 min e depois foi adicionado anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase durante mais 30 min. A reação de cor com o-

fenilenodiamina foi medida a 492 nm. A curva padrão S100B variou de 0,002 a 1 ng / mL.

2.8 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M. Cada experimento foi realizado em triplicata a partir de pelos menos 5 experimentos independentes. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o software Graphpad Prism versão 6 (La Jolla, CA, EUA). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Efeito do tratamento com BDNF sobre a viabilidade celular

Após o tratamento de uma hora com uma curva de BDNF nas concentrações: 1 ng/mL, 10 ng/mL e 100 ng/mL, coletou-se o meio em que as fatias se encontravam para realizar o ensaio de liberação de LDH. O tratamento com BDNF não promoveu nenhum dano a viabilidade celular das fatias hipocâmpais agudas. Pois, como pode ser visto na figura 1 ($p = 0,5186$ e $f_{(3,19)} = 0,7869$), não há diferença na liberação de LDH entre os tratamentos quando comparado com o basal.

3.2 O tratamento com BDNF não alterou a captação de glicose

As fatias expostas a diferentes concentrações de BDNF não apresentaram alterações na captação de glicose. Analisando a figura 2 ($p = 0,7928$ e $f_{(3,39)} = 0,3452$) é possível visualizar que os tratamentos não alteraram de maneira significativa a captação de glicose, pois estatisticamente eles são equivalentes à captação de glicose das fatias expostas ao tratamento basal.

3.3 O BDNF não alterou a secreção de lactato

Assim como com a captação de glicose, as diferentes concentrações de tratamento com BDNF não influenciaram a secreção de lactato das fatias. Pois como pode ser visto na figura 3 ($p = 0,4432$ e $f_{(3,39)} = 0,9153$), os tratamentos possuem uma equivalência estatística ao tratamento basal.

3.4 O efeito do tratamento de BDNF aumentou os níveis de GSH

No entanto, ao que se refere à quantidade de glutathiona houve um aumento com o tratamento de BDNF. Ao considerar a figura 4 ($p = 0,0083$ e $f_{(3,18)} = 5,685$), pode-se ver que o tratamento com BDNF, na concentração de 10 ng/mL, aumentou de modo significativo o conteúdo de GSH das fatias. Quando comparado com o tratamento basal, não foi possível observar uma diferença significativa no conteúdo de GSH com os tratamentos de 1 ng/mL e de 100 ng/mL de BDNF.

3.5 O tratamento com BDNF aumentou a secreção de S100B

A secreção de S100B, das fatias, também aumentou com o tratamento com BDNF. Sendo assim, é possível a visualização na figura 5 ($p = 0,0031$ e $f_{(3,19)} = 7,033$) de uma diferença significativa da secreção de S100B no tratamento com 100 ng/mL de BDNF. Diferentemente da produção de GSH, o tratamento de 10 ng/mL não apresentou diferença do basal, assim como, o tratamento com 1ng/mL.

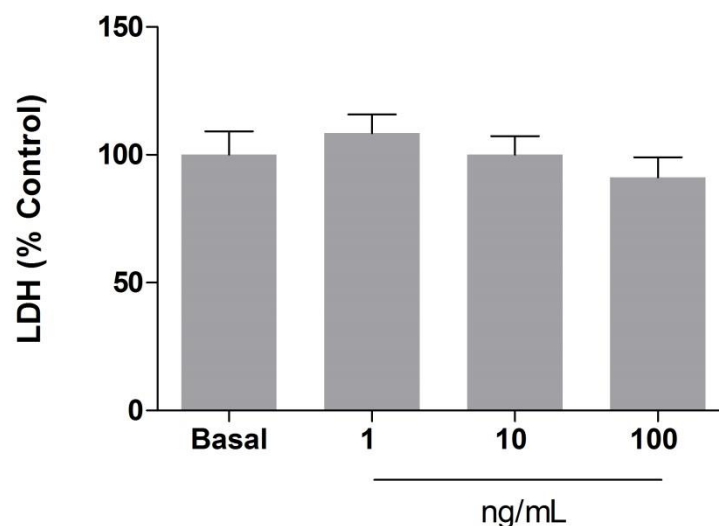


Figura 1. Efeito do tratamento com BDNF sobre a viabilidade celular.

Valores expressos como média \pm S.E.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey.

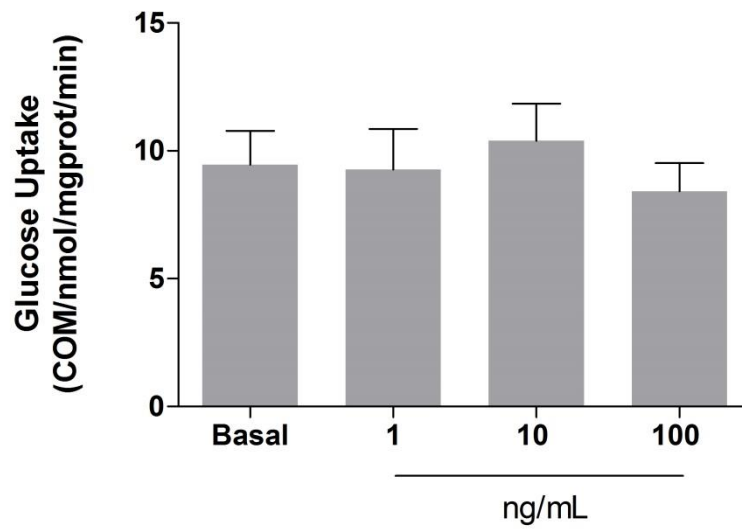


Figura 2. O tratamento com BDNF não alterou a captação de glicose.

Valores expressos como média \pm S.E.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey

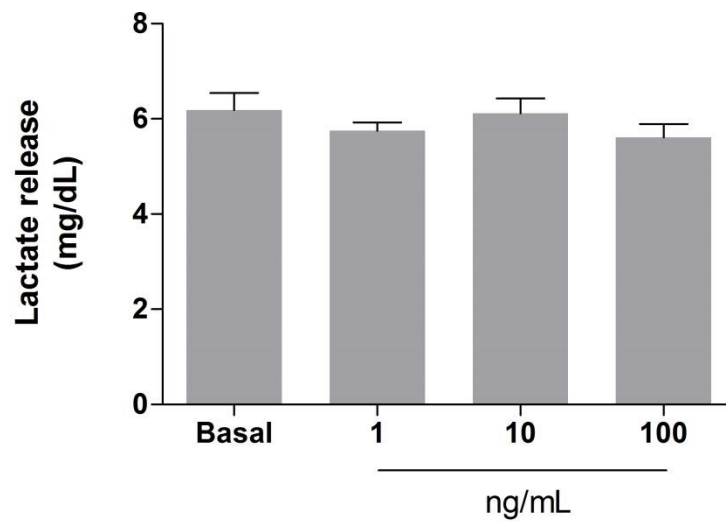


Figura 3. O BDNF não alterou a secreção de lactato.

Valores expressos como média \pm S.E.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey

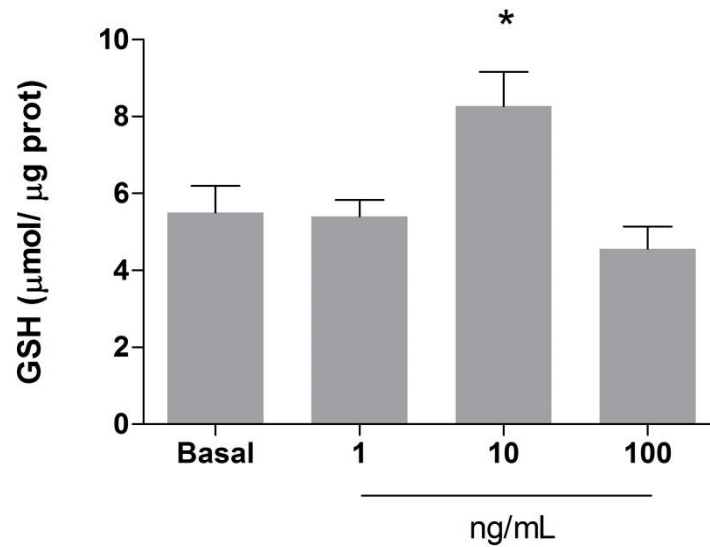


Figura 4. O com BDNF aumentou a produção de GSH.

Valores expressos como média \pm S.E.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey * significativo $p < 0,05$.

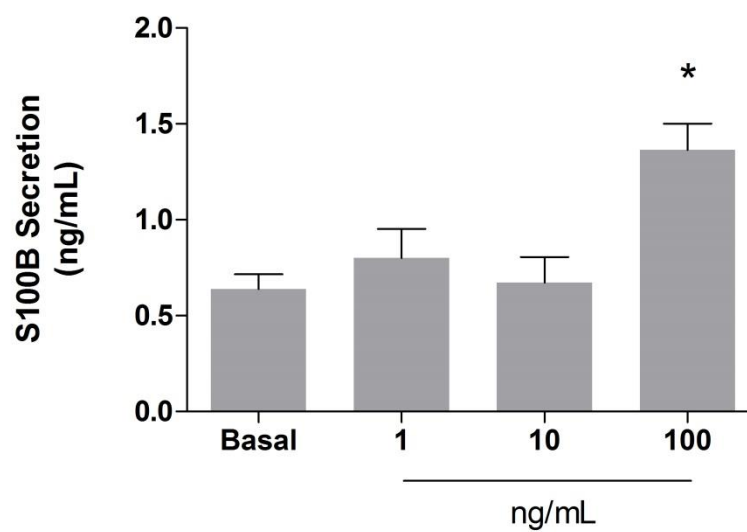


Figura 5. O tratamento com BDNF aumentou a secreção de S100B.

Valores expressos como média \pm S.E.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. * significativo $p < 0,05$.

4. Discussão

Nossos resultados representam uma resposta celular frente a possíveis ações do BDNF no tecido cerebral, onde ele além de desempenhar o papel de uma neurotrofina, também desempenha um papel na modulação do metabolismo do SNC, mostrando uma maior interação entre neurônios e astrócitos pela comunicação através do BDNF e seus efeitos no metabolismo energético e na ação antioxidante.

Primeiramente, mostramos através de uma curva de BDNF que o mesmo não causa toxicidade às fatias. Foi necessário avaliar a viabilidade celular das fatias hipocâmpais tratadas, pois caso uma das diferentes concentrações de BDNF ou o processo de estabilização das fatias, ocasionasse um dano celular, não poderíamos inferir os resultados como resposta celular de secreção frente um tratamento agudo de BDNF e sim como um resultado da perda de integridade da membrana. Assim sendo, como descrito na seção de resultados e na figura 1, não houve nenhum dano na viabilidade celular, pois a LDH é uma enzima citosólica, e, como os valores dessa atividade no meio extracelular após o tratamento com BDNF estão iguais aos basais, não houve dano de membrana. [23]. Assim, podemos afirmar que os demais resultados encontrados são uma resposta celular frente o tratamento agudo com BDNF.

Como visto anteriormente por Pellerin, 2008 [6] a glicose que é captada pelos astrócitos, em grande parte, é metabolizada até piruvato e convertida pela enzima LDH em lactato. O lactato, então, é transportado pelos transportadores de monocarboxilato (MCT) para os neurônios, servindo de substrato energético. No entanto, como podemos observar nas figuras 2 e 3, o BDNF não alterou a captação de glicose nem a possível produção de lactato, sem influenciar nesse modelo a atividade astrocitária de suporte energético ao neurônio. Portanto, o metabolismo da glicose dos astrócitos, via glicólise, pode não ter sofrido alterações com o tratamento de BDNF. No entanto, estamos vendo um valor médio de captação e não podemos excluir alterações específicas no transporte neuronal e astrocitário de glicose. O uso de inibidores de transportadores específicos, em experimentos posteriores, poderia melhor esclarecer esta questão.

Em um trabalho recente do nosso laboratório (RODRIGUES et al, 2018, artigo submetido), a ausência de glicose no meio de incubação das fatias hipocâmpais resultou em um aumento da secreção de BDNF pelas mesmas, indicando que o

BDNF pode estar relacionado com o metabolismo da glicose, mesmo que um aumento de sua captação não tenha sido observado. Neste trabalho citado também foi observado que o bloqueio da entrada da glicose presente no meio de incubação normal causa um aumento da secreção de BDNF.

Ainda, Burkhalter et al., 2003 [20] observaram que tratamentos de curta duração com diferentes concentrações de BDNF (da ordem de 0,1 a 10 ng/ml) resultaram em um aumento da captação de glicose em cultura de neurônios corticais. Aqui neste trabalho, nós utilizamos fatias agudas, as quais mantêm interações entre os diferentes tipos celulares, especialmente neurônios e astrócitos. Como nossa concentração e tempo de tratamento foi semelhante à utilizada no trabalho citado, acredita-se que a não alteração na captação de glicose pela fatia seja resultado possivelmente de uma sinalização diferente do BDNF sobre os astrócitos, ou que o período curto de tratamento não tenha sido suficiente para alterar a captação.

Especulamos que o aumento da GSH observado na figura 4 pode ser decorrente de um aumento de NADPH, que seria proveniente da via das pentoses-fosfatos [12]. Pois, quando existe a oxidação da GSH e a formação da GSSG, a enzima glutathione redutase necessita utilizar o NADPH para regenerar a GSH [9-11]. No entanto, como vimos anteriormente, o tratamento agudo com BDNF não alterou a captação de glicose das fatias, o que pode sugerir que os astrócitos não tiveram um tempo suficiente para resposta de sinalização de aumento da captação de glicose ou apenas causaram um desvio da rota glicolítica para a formação de NADPH e manutenção da GSH. Outra possibilidade é que o BDNF possa ter aumentado a captação de glutamato do astrócito. De acordo com Valdovinos-Flores; Gosebatt, 2012 [29], um aumento da captação de glutamato e outros aminoácidos podem levar a um aumento da síntese de GSH nos astrócitos.

Neste trabalho também observamos um aumento da secreção de S100B após a incubação das fatias hipocâmpais com BDNF. A S100B é uma proteína principalmente secretada por astrócitos no SNC e que pode servir como um marcador de atividade astrocitária. [7,30,31]. Desta forma, o tratamento agudo com BDNF possivelmente está ativando o astrócito e sinalizando uma secreção de S100B.

Wartchow et al., 2016 [25], utilizando cultura de células C6, um modelo astrocítico, e fatias hipocâmpais agudas, mostrou que o tratamento com S100B

resultou em uma diminuição da captação de glicose. Este estudo pode corroborar nosso resultado, pois vimos um aumento de S100B após o tratamento com BDNF. Este aumento pode estar interferindo com o metabolismo da glicose nas fatias e de uma forma compensatória resultando na falta de alteração da captação observada, ou seja, o aumento da secreção de S100B pode ter anulado o possível aumento da captação de glicose decorrente do tratamento com BDNF.

5. Conclusão

Diante do que foi exposto, pode-se concluir que o BDNF possui uma atuação moduladora de aumentar o conteúdo de GSH, sendo esta ação possivelmente em astrócitos, devido o aumento da secreção de S100B que foi observado. Porém, a via no qual esse aumento ocorre ainda não é sabida, por isso futuramente será necessário fazer estudos utilizando o inibidor ana -12 do receptor tirosina quinase B (TrkB), onde o BDNF se liga em astrócitos. Outro estudo futuro necessário é avaliar a captação de glutamato, que é uma função realizada pelos astrócitos através de transportadores específicos. Também avaliar a produção de NADPH, que é o produto do metabolismo da glicose que participa da manutenção do estado redoxe da GSH. Para que, por fim, obtenha-se o conhecimento de ação do BDNF como um modulador do metabolismo da glicose e de ação antioxidante.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Referências

- [1] G. Perea, A. Araque, Glial calcium signaling and neuron-glia communication, *Cell Calcium*. 38 (2005) 375–382. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.015.
- [2] L.J. Van Eldik, M.S. Wainwright, The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain, *Restor. Neurol. Neurosci.* 21 (2003) 97–108.

- [3] C. Howarth, P. Gleeson, D. Attwell, Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32 (2012) 1222–1232. doi:10.1038/jcbfm.2012.35.
- [4] M. Bélanger, P.J. Magistretti, The role of astroglia in neuroprotection, *Dialogues Clin Neurosci.* 11 (2009) 281–295.
- [5] L. Sokoloff, M. Reivich, C. Kennedy, M.H. Des Rosiers, C.S. Patlak, K.D. Pettigrew, O. Sakurada, M. Shinohara, 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 (1977) 897–916.
- [6] L. Pellerin, Brain energetics (thought needs food), *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 11 (2008) 701–705. doi:10.1097/MCO.0b013e328312c368.
- [7] H.K. Kimelberg, M. Nedergaard, Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets, *Neurotherapeutics.* 7 (2010) 338–353. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.006.
- [8] L.F. Eng, R.S. Ghirnikar, Y.L. Lee, Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000), *Neurochem. Res.* 25 (2000) 1439–1451.
- [9] J.C. Fernández-Checa, N. Kaplowitz, C. García-Ruiz, A. Colell, M. Miranda, M. Marí, E. Ardite, A. Morales, GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) G7-17.
- [10] C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernandez-Checa, Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21 Suppl 3 (2006) S3-6. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04570.x.
- [11] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Mol Aspects Med.* 30 (2009) 42–59. doi:10.1016/j.mam.2008.05.005.
- [12] I. Hanukoglu, R. Rapoport, Routes and regulation of NADPH production in steroidogenic mitochondria, *Endocr. Res.* 21 (1995) 231–241.
- [13] S.C. Lu, Glutathione synthesis, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- [14] J. Lewerenz, S.J. Hewett, Y. Huang, M. Lambros, P.W. Gout, P.W. Kalivas, A. Massie, I. Smolders, A. Methner, M. Pergande, S.B. Smith, V. Ganapathy, P. Maher, The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 522–555. doi:10.1089/ars.2011.4391.
- [15] T.M. Seib, S.A. Patel, R.J. Bridges, Regulation of the system x(C)-cystine/glutamate exchanger by intracellular glutathione levels in rat astrocyte primary cultures, *Glia.* 59 (2011) 1387–1401. doi:10.1002/glia.21176.
- [16] A.M. Davies, The role of neurotrophins in the developing nervous system, *J. Neurobiol.* 25 (1994) 1334–1348. doi:10.1002/neu.480251103.

- [17] K.R. Jones, I. Fariñas, C. Backus, L.F. Reichardt, Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development, *Cell*. 76 (1994) 989–999.
- [18] S. Korsching, The neurotrophic factor concept: a reexamination, *J. Neurosci.* 13 (1993) 2739–2748.
- [19] G.R. Lewin, Y.A. Barde, Physiology of the neurotrophins, *Annu. Rev. Neurosci.* 19 (1996) 289–317. doi:10.1146/annurev.ne.19.030196.001445.
- [20] J. Burkhalter, H. Fiumelli, I. Allaman, J.-Y. Chatton, J.-L. Martin, Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons, *J. Neurosci.* 23 (2003) 8212–8220.
- [21] T.-T. Huang, D.-L. Hao, B.-N. Wu, L.-L. Mao, J. Zhang, Uric acid demonstrates neuroprotective effect on Parkinson's disease mice through Nrf2-ARE signaling pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493 (2017) 1443–1449. doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.004.
- [22] P. Nardin, L. Tortorelli, A. Quincozes-Santos, L.M.V. de Almeida, M.C. Leite, A.P. Thomazi, C. Gottfried, S.T. Wofchuk, R. Donato, C.-A. Gonçalves, S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+), *Neurochem. Res.* 34 (2009) 1603–1611. doi:10.1007/s11064-009-9949-0.
- [23] L.D. Bobermin, D.O. Souza, C.-A. Gonçalves, A. Quincozes-Santos, Resveratrol prevents ammonia-induced mitochondrial dysfunction and cellular redox imbalance in C6 astroglial cells, *Nutr Neurosci.* (2017) 1–10. doi:10.1080/1028415X.2017.1284375.
- [24] L. Pellerin, P.J. Magistretti, Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 10625–10629.
- [25] K.M. Wartchow, A.C. Tramontina, D.F. de Souza, R. Biasibetti, L.D. Bobermin, C.-A. Gonçalves, Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism, *Neurochem. Res.* 41 (2016) 1420–1429. doi:10.1007/s11064-016-1851-y.
- [26] B.A. Arús, D.G. Souza, B. Bellaver, D.O. Souza, C.-A. Gonçalves, A. Quincozes-Santos, L.D. Bobermin, Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway, *Mol. Cell. Biochem.* 428 (2017) 67–77. doi:10.1007/s11010-016-2917-5.
- [27] R.W. Browne, D. Armstrong, Reduced glutathione and glutathione disulfide, *Methods Mol. Biol.* 108 (1998) 347–352. doi:10.1385/0-89603-472-0:347.
- [28] M.C. Leite, F. Galland, G. Brolese, M.C. Guerra, J.W. Bortolotto, R. Freitas, L.M.V. de Almeida, C. Gottfried, C.-A. Gonçalves, A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein, *J. Neurosci. Methods.* 169 (2008) 93–99. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.021.

- [29] C. Valdovinos-Flores, M.E. Gonsebatt, The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system, *Neurochem. Int.* 61 (2012) 405–414. doi:10.1016/j.neuint.2012.05.019.
- [30] R. Donato, Intracellular and extracellular roles of S100 proteins, *Microsc. Res. Tech.* 60 (2003) 540–551. doi:10.1002/jemt.10296.
- [31] C.-A. Gonçalves, M.C. Leite, P. Nardin, Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 755–763. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003.

3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

A partir do que foi exposto nesse trabalho, podemos concluir que o tratamento com BDNF em fatias hipocampais agudas aumentou o conteúdo de GSH sem mostrar alterações evidentes no metabolismo da glicose, pois como foi apresentado não houve alteração na captação de glicose nem alteração na secreção de lactato, o que seria esperado. No entanto, com o aumento da secreção de S100B que é uma proteína principalmente secretada por astrócitos no SNC, podemos chegar ao entendimento de que o BDNF possui uma ação efetiva sobre os astrócitos.

Para melhor esclarecer o efeito do BDNF sobre os astrócitos, regulando a produção de GSH e secreção de S100B será necessário investigar através por qual via ocorre. Portanto, realizaremos estudos futuros para avaliar a ligação do BDNF no receptor de tirosina quinase B (TrkB) dos astrócitos, onde utilizaremos o inibidor seletivo ana – 12, e avaliar o efeito que essa inibição acarreta nos níveis de GSH. Torna-se também necessário avaliar a produção de NADPH, que é um possível caminho da metabolização da glicose para aumentar regular o conteúdo de GSH. Então se tornará possível o conhecimento de uma possível via de ativação utilizada pelo BDNF.

Outra perspectiva a ser realizada é avaliar a captação de glutamato nas fatias hipocampais após tratamento com BDNF. Pois, o BDNF pode estar sinalizando ao astrócito para aumentar a sua captação de glutamato e assim aumentar a sua produção de GSH. O astrócito é o tipo celular responsável em reciclar o glutamato devido ele possuir a enzima GS, que converte glutamato em glutamina. Sendo a captação de glutamato uma das possibilidades para o aumento da produção de GSH após o tratamento com BDNF.

Por fim, este trabalho contribuiu para que se tornasse mais claro as interações ou comunicações que ocorrem no SNC entre astrócitos e neurônios, pois avaliamos os efeitos do BDNF que é uma neurotrofina principalmente secretada por neurônios, em atividades realizadas principalmente por astrócitos.

REFERÊNCIAS

- AROEIRA, R. I.; SEBASTIÃO, A. M.; VALENTE, C. A. BDNF, via truncated TrkB receptor, modulates GlyT1 and GlyT2 in astrocytes. **Glia**, v. 63, n. 12, p. 2181–2197, dez. 2015.
- ARÚS, B. A. et al. Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 428, n. 1–2, p. 67–77, abr. 2017.
- BARANOWSKA-BOSIACKA, I. et al. Perinatal exposure to lead induces morphological, ultrastructural and molecular alterations in the hippocampus. **Toxicology**, v. 303, p. 187–200, 7 jan. 2013.
- BARBACID, M. The Trk family of neurotrophin receptors. **Journal of Neurobiology**, v. 25, n. 11, p. 1386–1403, nov. 1994.
- BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 281–295, 2009.
- BERGAMI, M. et al. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 2, p. 213–221, 20 out. 2008.
- BOBERMIN, L. D. et al. Resveratrol prevents ammonia-induced mitochondrial dysfunction and cellular redox imbalance in C6 astroglial cells. **Nutritional Neuroscience**, p. 1–10, 6 fev. 2017.
- BOTHWELL, M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. **Annual Review of Neuroscience**, v. 18, p. 223–253, 1995.
- BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 108, p. 347–352, 1998.
- BURKHALTER, J. et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 23, p. 8212–8220, 10 set. 2003.
- DAVIES, A. M. The role of neurotrophins in the developing nervous system. **Journal of Neurobiology**, v. 25, n. 11, p. 1334–1348, nov. 1994.
- DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 6, p. 540–551, 15 abr. 2003.
- DONATO, R. et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 6, p. 1008–1022, jun. 2009.

- DONATO, R. et al. Functions of S100 proteins. **Current Molecular Medicine**, v. 13, n. 1, p. 24–57, jan. 2013.
- ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochemical Research**, v. 25, n. 9–10, p. 1439–1451, out. 2000.
- FARGALI, S. et al. Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 48, n. 3, p. 654–659, nov. 2012.
- FERNANDES, B. S. et al. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: a comparative meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 7, p. 750–751, jul. 2014.
- FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. et al. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. **The American Journal of Physiology**, v. 273, n. 1 Pt 1, p. G7-17, jul. 1997.
- FRIZZO, J. K. et al. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 4, p. 735–740, abr. 2004.
- GALLAND, F. et al. Hyperammonemia compromises glutamate metabolism and reduces BDNF in the rat hippocampus. **Neurotoxicology**, v. 62, p. 46–55, set. 2017.
- GARCIA-RUIZ, C.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21 Suppl 3, p. S3-6, out. 2006.
- GONÇALVES, C.-A.; LEITE, M. C.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 755–763, jul. 2008.
- GONG, L. et al. Brain-derived and glial cell line-derived neurotrophic factors protect a catecholaminergic cell line from dopamine-induced cell death. **Neuroscience Letters**, v. 263, n. 2–3, p. 153–156, 26 mar. 1999.
- HANUKOGLU, I.; RAPOPORT, R. Routes and regulation of NADPH production in steroidogenic mitochondria. **Endocrine Research**, v. 21, n. 1–2, p. 231–241, maio 1995.
- HOWARTH, C.; GLEESON, P.; ATTWELL, D. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1222–1232, jul. 2012.

HUANG, T.-T. et al. Uric acid demonstrates neuroprotective effect on Parkinson's disease mice through Nrf2-ARE signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 4, p. 1443–1449, 2 dez. 2017.

JAYAKUMAR, A. R.; NOREMBERG, M. D. Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders. **Advances in Neurobiology**, v. 13, p. 327–350, 2016.

JONES, K. R. et al. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 989–999, 25 mar. 1994.

KIMELBERG, H. K.; NEDERGAARD, M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 338–353, out. 2010.

KIMURA, A. et al. Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 20 set. 2016.

KORSCHING, S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 2739–2748, jul. 1993.

KOWIAŃSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 16 jun. 2017.

LANDAR, A. et al. Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucosyltransferase. **Cell Calcium**, v. 20, n. 3, p. 279–285, set. 1996.

LEINO, R. L. et al. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 49, n. 5, p. 617–626, 1 set. 1997.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93–99, 30 mar. 2008.

LEWERENZ, J. et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 5, p. 522–555, 10 fev. 2013.

LEWIN, G. R.; BARDE, Y. A. Physiology of the neurotrophins. **Annual Review of Neuroscience**, v. 19, p. 289–317, 1996.

LU, S. C. REGULATION OF GLUTATHIONE SYNTHESIS. **Molecular aspects of medicine**, v. 30, n. 1–2, p. 42–59, 2009.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, maio 2013.

MAROSI, K.; MATTSON, M. P. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 25, n. 2, p. 89–98, fev. 2014.

MARTIN, J.-L.; MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. Regulation of neurotrophic factors and energy metabolism by antidepressants in astrocytes. **Current Drug Targets**, v. 14, n. 11, p. 1308–1321, out. 2013.

NARDIN, P. et al. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). **Neurochemical Research**, v. 34, n. 9, p. 1603–1611, set. 2009.

PELLERIN, L. et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. **Glia**, v. 55, n. 12, p. 1251–1262, set. 2007.

PELLERIN, L. Brain energetics (thought needs food). **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, n. 6, p. 701–705, nov. 2008.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. 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**, v. 91, n. 22, p. 10625–10629, 25 out. 1994.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3–4, p. 375–382, out. 2005.

ROJAS, A. et al. The receptor for advanced glycation end-products: a complex signaling scenario for a promiscuous receptor. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 3, p. 609–614, mar. 2013.

ROSA, E. et al. Tau downregulates BDNF expression in animal and cellular models of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 48, p. 135–142, 2016.

SANTOS, A. R.; COMPRIDO, D.; DUARTE, C. B. Regulation of local translation at the synapse by BDNF. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 4, p. 505–516, dez. 2010.

SEIB, T. M.; PATEL, S. A.; BRIDGES, R. J. Regulation of the system x(C)-cystine/glutamate exchanger by intracellular glutathione levels in rat astrocyte primary cultures. **Glia**, v. 59, n. 10, p. 1387–1401, out. 2011.

SOKOLOFF, L. 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. **Journal of Neurochemistry**, v. 28, n. 5, p. 897–916, maio 1977.

SPINA, M. B. et al. Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 1, p. 99–106, jul. 1992.

VALDOVINOS-FLORES, C.; GONSEBATT, M. E. The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 3, p. 405–414, ago. 2012.

VAN ELDIK, L. J.; WAINWRIGHT, M. S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 21, n. 3–4, p. 97–108, 2003.

WARTCHOW, K. M. et al. Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 6, p. 1420–1429, jun. 2016.

ZIMMER, D. B.; VAN ELDIK, L. J. Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 24, p. 11424–11428, 25 ago. 1986.

ANEXO I

NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NEUROSCIENCE LETTERS

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Neuroscience Letters is devoted to the rapid publication of short, high-quality papers of interest to the broad community of neuroscientists. Only papers which will make a significant addition to the literature in the field will be published. Papers in all areas of neuroscience - molecular, cellular, developmental, systems, behavioral and cognitive, as well as computational - will be considered for publication. Submission of laboratory investigations that shed light on disease mechanisms is encouraged. Clinical studies will also be published if they provide new information about organization or actions of the nervous system, or provide new insights into the neurobiology of disease. NSL does not publish case reports.

Papers that are primarily devoted to psychological or philosophical questions, that use unvalidated methodology, or that fall outside of the realm of neuroscience, will not be published.

The Neuroscience Peer Review Consortium

Neuroscience Letters is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Neuroscience Letters* and indicate that the referees' reports from the first journal will be made available to the Editors of *Neuroscience Letters*.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Neuroscience Letters*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Neuroscience Letters* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the

original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to *Neuroscience Letters*' specification and submit the paper to *Neuroscience Letters* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that the authors will ask for the referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. The authors then must contact the first journal, and ask that reviews be forwarded, indicating they have submitted to *Neuroscience Letters*, and providing the new manuscript ID number. The Editors of *Neuroscience Letters* will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

Types of Article

Neuroscience Letters will publish only the following article type:

Research Article: A report of original research which assesses the contribution of the research outcomes to the body of knowledge in a given area.

Mini-Reviews: Reviews are typically invitation-only and are normally published in thematic special issues.

Length of manuscripts should be no more than 5000 words (approximately 6 printed pages). As an approximate guide to authors for judging the length of their paper, the following estimation may be used: heading + abstract = 0.5-0.6 pages; 3 type-written (double-spaced) pages = 1 printed page; (when using a word-processor) 850 words or 5300 characters = 1 printed page; 3 single-column wide or 2 double-column wide figures plus legends = 1 printed page; 3 single-column wide or 2 double-column wide tables = 1 printed page; 17 references = 0.5 printed page.

Authors of invited Special Issue review articles may exceed the 5000 word limit if required, although please check with the issues Guest Editor(s) prior to submission.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)*

for experiments involving humans
<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EC Directive
 86/609/EEC for animal experiments

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform*

Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

For other policy issues, authors are referred to the policy guidelines of the Society for Neuroscience (see their website <http://www.jneurosci.org/misc/itoa.shtml>).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted.

2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation,

so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below. **Gold open**

access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2350**, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy:

<https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going

through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/nsl/>

For submission queries, please contact the Editorial Office (NSL@elsevier.com).

Referees

Authors must send the names, addresses and email addresses for 8-10 potential referees that meet the following criteria: potential referees must be experts or active workers in the field, must not be current or prior mentors or collaborators, and must have institutional email addresses (e.g., xx.yy@zz.edu) and not generic email addresses (e.g., xx.yy@163.com or xx.yy@gmail.com). Although the journal does not guarantee these reviewers will be used, the Editors take these suggestions under consideration. These recommendations help the journal speed the editorial process.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is in very occasional cases appropriate, although in general, Results and Discussion should be presented as distinct sections

of the manuscript. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Artwork *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following

formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article.

Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no

template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/neuroscience-letters>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be

published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your

corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.