

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**MERY STÉFANI LEIVAS PEREIRA**

**COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO ENTRE  
PASSAGENS RECENTES E TARDIAS DA LINHAGEM DE GLIOMA C6.**

Porto Alegre, dezembro de 2011.

**MERY STÉFANI LEIVAS PEREIRA**

**COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO ENTRE  
PASSAGENS RECENTES E TARDIAS DA LINHAGEM DE GLIOMA C6.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito parcial de obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Orientador: Prof. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre, dezembro de 2011.

*“O fazer científico está recheado do mais puro prazer infantil da descoberta.”*

(Autor desconhecido)

**Dedicatória:**

Aos meus pais por tudo que fizeram para tornar esse momento possível...

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, sem palavras para demonstrar o quanto sou grata a eles, digo um singelo, mas de coração, muito obrigado por tudo.

Ao Geovani por compreender meus momentos de ausência, pelo apoio nas horas difíceis, pelo amor, carinho e amizade.

À minha família e à família do Geovani por sempre acreditarem em mim e por compreenderem minhas ausências.

A todos meus amigos queridos pelos momentos alegres de descontração que me proporcionaram durante esses dois anos.

Ao Prof. Diogo Losch de Oliveira por ser mais que um orientador para mim, mas um amigo em que posso contar em qualquer momento.

À Prof<sup>a</sup> Susana Wofchuck pela orientação durante a Iniciação Científica e por ser meu exemplo de pesquisadora.

Ao Prof. Diogo Souza por ter confiado em mim durante minha Iniciação Científica e por ter ajudado a consolidar em mim a paixão pela ciência.

À minha bolsista Marcela principalmente pela paciência na realização do Western Blot e à Kamila pela ajuda na realização dos experimentos. Sem a ajuda de vocês esta dissertação não teria sido realizada.

Ao Prof. Renato Dias pela sua sabedoria, ajuda científica constante e, principalmente, pela leitura do manuscrito do meu artigo.

À Eliz e à Renata pela amizade e por terem me ensinado todos os cuidados possíveis que se deve ter no cultivo de células.

À Sílvia e ao Rafael também pela amizade e pela ajuda no uso do Citômetro de Fluxo.

Ao Rico pela amizade e pela ajuda para avaliar a atividade da glutamina sintetase.

Aos colegas de trabalho Sandro, Cássio, Ben Hur, Dênis, Marcos, Luciana e aos demais colegas dos laboratórios 22, 24, 26 e 28 pela convivência, amizade, ajuda e por tornarem meus dias no laboratório mais alegres.

À Prof<sup>a</sup> Christianne Salbego e à Prof<sup>a</sup> Vera Trindade pelo apoio durante esse último semestre nas aulas de Bioquímica I do curso de Farmácia e também agradecê-las, assim como agradecer aos alunos por terem ajudado a consolidar em mim o desejo que sempre tive de lecionar.

À Cléia pela atenção e disponibilidade em todos os momentos que precisei.

À Profª Lisiane Porciúncula por ter sido a relatora e à Profª Carmem Gottfried e ao Prof. Guido Lenz por terem sido banca desta dissertação. Muito obrigada pelo aceite e pelas sugestões muito contundentes.

Ao Departamento de Bioquímica, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica pelo acolhimento e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao CNPQ e a CAPES pela bolsa concedida.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	V
SUMÁRIO.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT .....	X
APRESENTAÇÃO.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
1 Tumores que afetam o Sistema Nervoso Central .....	2
1.1 Gliomas.....	4
1.2 Glioblastoma.....	5
1.3 Modelos experimentais de glioblastomas .....	8
1.4 Linhagem de glioma C6.....	10
2 Glutamato.....	12
2.1 Captação de glutamato.....	13
2.2 Receptores glutamatérgicos .....	15
2.3 Linhagem C6 e Sistema Glutamatérgico .....	15
OBJETIVOS.....	17
1. Objetivo Geral .....	18
2. Objetivos específicos.....	18
RESULTADOS .....	19
CAPÍTULO I .....	20
DISCUSSÃO .....	52
CONCLUSÕES .....	59
PERSPECTIVAS.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## RESUMO

A linhagem de glioma de rato C6 tem sido amplamente utilizada para investigar vários aspectos da biologia celular. Esta linhagem apresenta variações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas de acordo com o número de passagens em cultivo. Segundo a literatura, culturas de passagens recentes apresentam características similares a glioblastomas, enquanto que culturas de passagens tardias assemelham-se à astroglia madura. Devido a isso, muitos estudos têm utilizado a linhagem C6 como modelo celular de glioblastoma e de astrócitos para investigar parâmetros relacionados ao sistema glutamatérgico, como por exemplo, captação de glutamato. Entretanto, até o presente momento a caracterização e comparação desses parâmetros entre as culturas da linhagem C6 de passagens recentes e tardias ainda não foram avaliadas. O objetivo desta dissertação foi investigar e comparar alguns parâmetros do sistema glutamatérgico entre as culturas de C6 com passagens recentes e tardias. As passagens recentes apresentaram um conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu 55% maior quando comparadas às passagens tardias e ambas as culturas atingiram o platô a partir dos 120min de incubação. Além disso, ambas as culturas apresentaram, após incubação com glutamato, os mesmos níveis de incorporação de iodeto de propídeo. Este resultado indica que o menor nível intracelular de [<sup>3</sup>H] observado nas culturas de passagens tardias não se deve a uma alteração na permeabilidade ou integridade de membrana dessas células. Ambas as culturas expressam somente o transportador Na<sup>+</sup> dependente de alta afinidade EAAC1 (carreador de aminoácido excitatórios 1), sendo que sua expressão total foi similar tanto nas culturas de passagens recentes quanto nas tardias. Para verificar se a captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu estava ocorrendo através de outro sistema de transporte, as culturas foram incubadas na presença ou ausência de PDC (*L-trans-2,4--trans-Pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid*) ou TBOA (*DL-threo-β-Benzyloxyaspartic acid*). O tratamento com os inibidores reduziu de forma similar a captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu tanto nas culturas de passagens recentes quanto nas tardias, indicando que este aminoácido é captado principalmente através do transportador de alta afinidade EAAC1. Com relação à liberação de glutamato, observou-se que 50% da radioatividade incorporada na forma de L-[<sup>3</sup>H]-Glu foi liberada para o meio extracelular tanto nas passagens recentes quanto nas tardias após 2h de incubação. Este resultado pode estar relacionado com o estabelecimento do platô do conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] observado após 120 min de captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu. Para investigar se a liberação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu ocorreu via transporte reverso dos transportadores Na<sup>+</sup> dependentes de alta afinidade, ambas as culturas foram incubadas na presença do inibidor não transportável TBOA. Não foi observada alteração no perfil de liberação de radioatividade intracelular nas culturas após incubação com TBOA. Para verificar se a metabolização do L-[<sup>3</sup>H]-Glu estaria relacionado com a diferença nos níveis intracelulares de [<sup>3</sup>H], ambas as culturas foram incubadas com o análogo não-metabolizável D-[<sup>3</sup>H]-Asp. Tanto as passagens recentes como as tardias apresentaram um aumento tempo-dependente do conteúdo de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp, não atingindo o platô. Além disso, o bloqueio dos transportadores Na<sup>+</sup> dependentes de alta afinidade por PDC ou TBOA reduziu a captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp em ambas as culturas, indicando que sua captação ocorreu principalmente através deste tipo de transporte. Além disso, diferentemente do observado com L-[<sup>3</sup>H]-Glu, apenas 10% do D-[<sup>3</sup>H]-Asp captado é liberado após 2h de incubação em ambas as culturas. Este resultado, juntamente com a não inibição por TBOA da liberação da radioatividade captada na forma de L-[<sup>3</sup>H]-Glu, indica que possivelmente o que está sendo liberado para o meio extracelular é um metabólito marcado com [<sup>3</sup>H] e não o próprio L-[<sup>3</sup>H]-Glu.



Além disso, nas passagens tardias, o conteúdo de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp foi menor quando comparado com as passagens recentes aos 60 e 120 min de incubação, sugerindo que as passagens recentes possuem intrinsecamente uma maior capacidade de transporte tanto de L-[<sup>3</sup>H]-Glu quanto de D-[<sup>3</sup>H]-Asp quando comparadas às passagens tardias. Os resultados dessa dissertação demonstram que as passagens recentes e tardias da linhagem de glioma C6 diferem na sua capacidade de acumular o [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu. A maior capacidade das passagens recentes da linhagem C6 em acumular a radioatividade não está relacionada a uma maior expressão dos transportadores de glutamato e nem a uma reduzida liberação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu para o meio extracelular. Como conclusão, os resultados obtidos nesta dissertação indicam que o número de passagens deve ser considerado em futuros estudos que pretendam avaliar parâmetros relacionados ao sistema glutamatérgico utilizando a linhagem C6 como modelo celular.

## ABSTRACT

Rat C6 lineage has been widely used to investigate several aspects of cell biology. This lineage presents morphological, biochemical and physiological variations according to number of passages in culture. Early passage cells exhibit characteristics similar to glioblastomas, whereas later passage cells resemble mature astroglia. Thus, many studies have been using C6 lineage as astroglial and glioma model to investigate several parameters related to glutamatergic system, such as glutamate uptake. However, the characterization and comparison of these parameters between C6 cultures at early and late passages have not been evaluated. Therefore, the aim of this study was to investigate and compare some glutamatergic system parameters between early and late passage C6 cells in cultures. Early passages have an L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] 55% higher when compared to later passages and both cultures reached plateau at 120 min. In addition, after incubation with glutamate, both cultures showed the same levels of propidium iodide incorporation. This result indicates that lower levels of intracellular [<sup>3</sup>H] in later passages are not due to an alteration of cellular membrane permeability. Both cultures expressed only the higher affinity Na<sup>+</sup> dependent transporter EAAC1, and its total expression was similar in early and later passage cultures. To verify if L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake occurred through another kind of glutamate transport system, the cultures were incubated in the presence or absence of PDC or TBOA. Treatment with this inhibitors reduced the L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake in both cultures at same levels, indicating that glutamate is taken up mainly by the higher affinity transporter system. Regarding the release of glutamate, it was observed that 50% of the radioactivity incorporated as L-[<sup>3</sup>H]-Glu was released to extracellular medium in both early and late passages after 2 h of incubation. This result could be related to the establishment of the plateau observed after 120 min for intracellular content of [<sup>3</sup>H] derived from L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake. To investigate if the release of L-[<sup>3</sup>H]-Glu occurred through reverse transport, both cultures were incubated in the presence of non-transportable inhibitor TBOA. There was no alteration of intracellular radioactivity release in cultures after incubation with TBOA. In order to verify if the metabolism of L-[<sup>3</sup>H]-Glu could be related to the differences in intracellular levels of [<sup>3</sup>H], both cultures were incubated with the non-metabolizable analogue D-[<sup>3</sup>H]-Asp. Early and late passage C6 cells showed a time-dependent increase in intracellular content of [<sup>3</sup>H] derived from D-[<sup>3</sup>H]-Asp uptake, without reaching the plateau. Moreover, blockade of Na<sup>+</sup> dependent transporters of high affinity by PDC or TBOA reduced D-[<sup>3</sup>H]-Asp uptake in both cultures, indicating that uptake occurred mainly through EAAC1. Moreover, differently from L-[<sup>3</sup>H]-Glu, only 10% of D-[<sup>3</sup>H]-Asp captured is released after 2 h of incubation in both cultures. This result, taken together with the fact that TBOA did not inhibit the release of radioactivity captured as L-[<sup>3</sup>H]-Glu, indicates that a [<sup>3</sup>H]-metabolite is being released to extracellular medium and not L-[<sup>3</sup>H]-Glu itself. Moreover, in later passages, D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] was lower when compared to early passages at 60 and 120 min of incubation, suggesting that early passage C6 cells intrinsically have a greater capacity to transport both L-[<sup>3</sup>H]-Glu and D-[<sup>3</sup>H]-Asp when compared to later passages. This study demonstrates that early and late passage C6 cells differ in their ability to accumulate L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H]. From 60 min of incubation, early passages have an intracellular content of [<sup>3</sup>H] derived from L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake 55% higher in relation to later passages. This increased capacity is not related to a higher expression of glutamate transporters neither nor by reduced release of L-[<sup>3</sup>H]-Glu to extracellular medium. In conclusion, our results indicate that the number of passages should be considered in

future studies that intent to evaluate parameters relating to glutamatergic system using Rat C6 lineage as cell model.

# APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é constituída de seis partes:

**Parte I:** Introdução e Objetivos;

**Parte II:** Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de um artigo científico, o qual foi submetido ao periódico *Neurochemical Research* e está subdividido em Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas;

**Parte III:** Discussão Final;

**Parte IV:** Conclusões;

**Parte V:** Perspectivas;

**Parte VI:** Referências Bibliográficas referentes à Parte I e Parte III.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><sup>3</sup>H</b>	Trítio
<b>AMPAR</b>	Receptor $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
<b>D-Asp</b>	D-Aspartato
<b>EAAC1</b>	Carreador de aminoácido excitatórios 1
<b>EAAT 1-5</b>	Transportador de aminoácidos excitatórios 1-5
<b>GLAST</b>	Transportador de glutamato e aspartato
<b>GLT-1</b>	Transportador glial 1
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>L-Glu</b>	L-Glutamato
<b>GluRs</b>	Receptores glutamatérgicos
<b>GS</b>	Glutamina sintetase
<b>i.c.v.</b>	Intracerebroventricular
<b>iGluRs</b>	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
<b>mGluRs</b>	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
<b>MST</b>	Tempo médio de sobrevivência
<b>NMDARs</b>	Receptor N-metil-D-aspartato
<b>OMS</b>	Organização mundial da Saúde
<b>PDC</b>	<i>L-trans-2,4--trans-Pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid</i>
<b>PRC6</b>	Passagens recentes da linhagem de glioma C6
<b>PTC6</b>	Passagens tardias da linhagem de glioma C6
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TBOA</b>	<i>DL-threo-<math>\beta</math>-Benzyloxyaspartic acid</i>

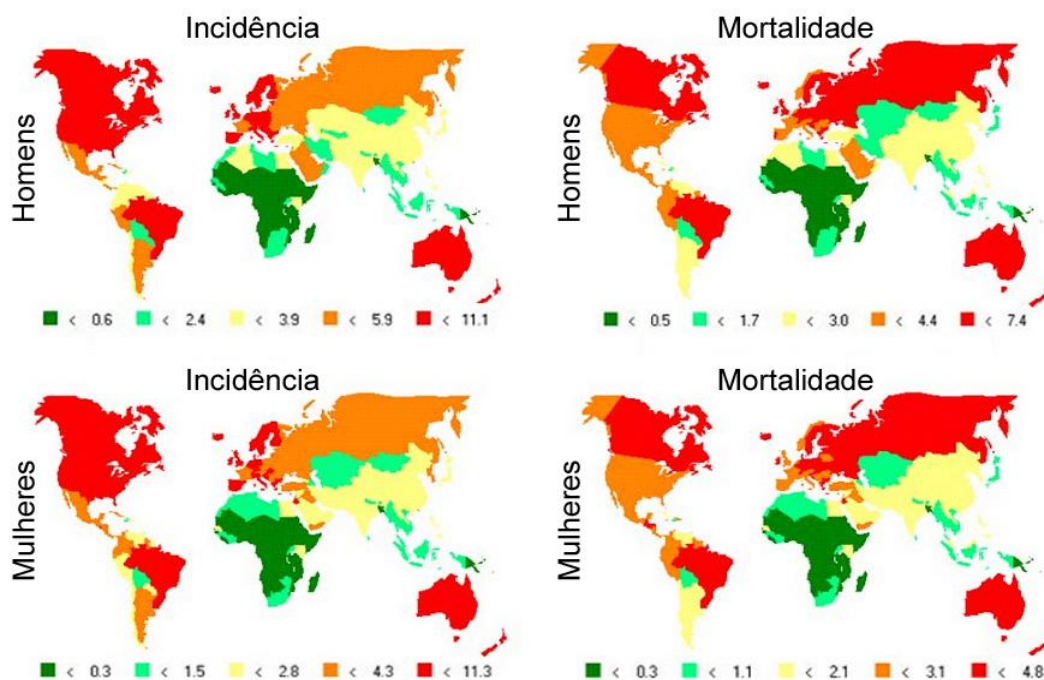
---

**Parte I**  
**INTRODUÇÃO**

---

# 1 Tumores que afetam o Sistema Nervoso Central

Os tumores que afetam o SNC representam menos de 2% de todas as neoplasias malignas, entretanto, apresentam um amplo espectro de efeitos adversos e para muitos deles o prognóstico é ainda deficiente (Ohgaki & Kleihues, 2005a). A incidência tende a ser maior em países industrializados e desenvolvidos (**Fig. 1**) (Ohgaki & Kleihues, 2005a). A baixa incidência em países em desenvolvimento pode ser devido a uma subapuração, porém não é possível excluir que nesses países existam diferenças étnicas em relação à suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores cerebrais (Ohgaki & Kleihues, 2005a).

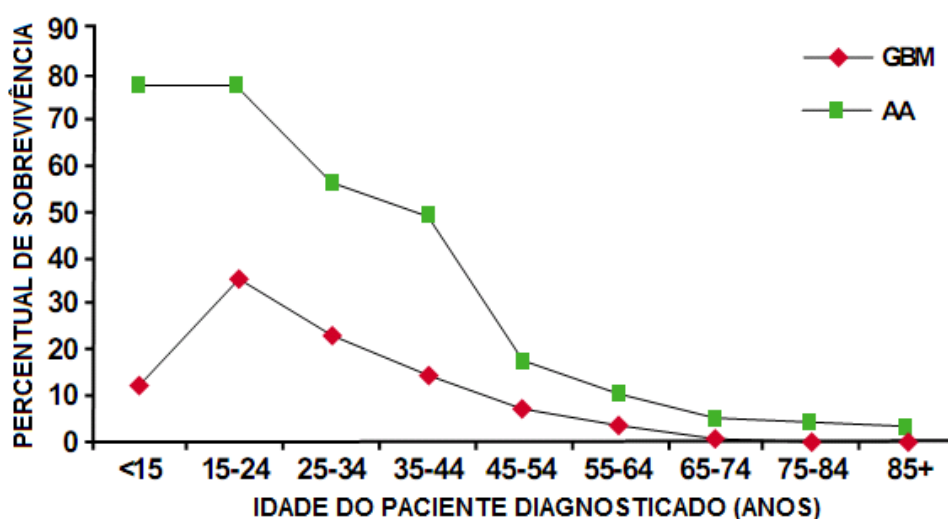


**Fig. 1** – Taxas de incidência global e de mortalidade de tumores que afetam o SNC, ajustadas pela população mundial padrão (todas as idades por 100.000 pessoas ao ano). As taxas tendem a ser maiores em países mais desenvolvidos. Adaptado de (Ohgaki & Kleihues, 2005a).

As taxas de mortalidade são muito similares às taxas de incidência (**Fig. 1**) (Ohgaki & Kleihues, 2005a). Na Europa Ocidental, na América do Norte e na Austrália, a taxa de mortalidade causada por tumores cerebrais é de aproximadamente 4-7 por 100.000 homens por ano e 3-5 por 100.000 mulheres por ano (Ohgaki & Kleihues,

2005a). Como pode ser visto na **Fig. 1**, as taxas de incidência e de mortalidade apresentam padrões mundiais similares em homens e mulheres (Ohgaki & Kleihues, 2005a).

A expectativa de vida está muito relacionada à idade dos pacientes. Pacientes acima 65 anos apresentam uma menor taxa de sobrevivência para todos os tipos de tumores quando comparados com pacientes mais jovens que apresentam gliomas anaplásicos e meduloblastomas (**Fig. 2**) (Flowers, 2000).



**Fig. 2** – Percentual de sobrevivência dos pacientes com tumores malignos que afetam o SNC do tipo glioma. Dados obtidos durante 5 anos (1980-1985). GBM = glioblastoma multiforme, AA = astrocitoma anaplásico. Pacientes mais jovens apresentam uma sobrevivência maior que os mais idosos. Adaptado de (Flowers, 2000).

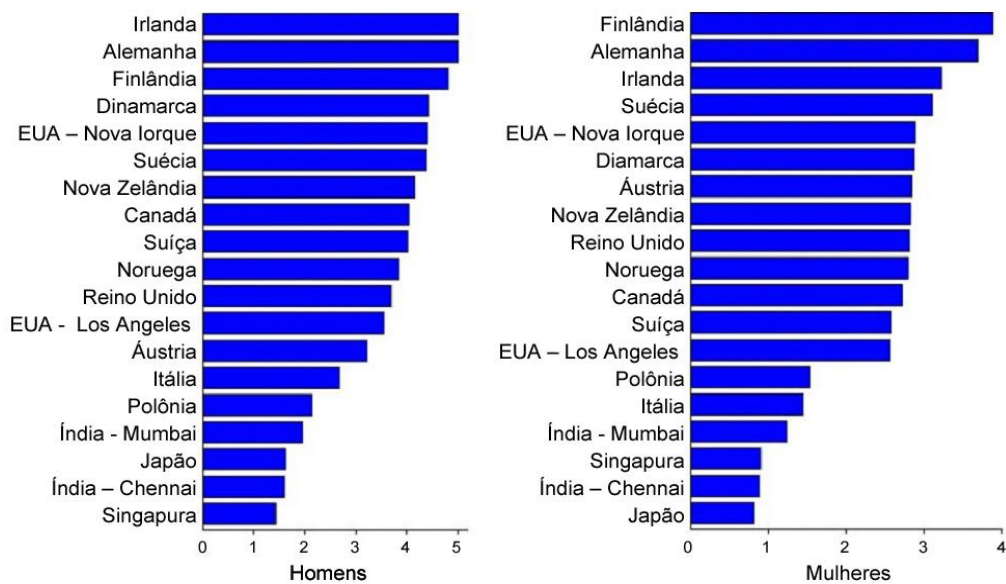
A classificação dos tumores que afetam o SNC, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), representa uma escala de malignidade dessas neoplasias (Louis *et al.*, 2007). Tumores de grau I representam lesões com potencial proliferativo baixo e possibilidade de cura após ressecção cirúrgica. Neoplasias de grau II naturalmente se infiltram nos tecidos adjacentes e, apesar de sua baixa atividade proliferativa, geralmente retornam após ressecção cirúrgica. A designação grau III é geralmente reservada a lesões com evidências histológicas de malignidade, incluindo atipia nuclear e uma rápida atividade proliferativa. Tumores de grau IV são neoplasias citologicamente malignas com alta atividade mitótica e presença de necrose, as quais



estão associadas a uma rápida evolução da doença pré e pós-operatória levando, geralmente, ao óbito (Louis *et al.*, 2007).

## 1.1 Gliomas

Dentre todos os tumores primários que afetam o SNC de humanos, os mais comuns são os gliomas (Dai & Holland, 2001). Estas neoplasias originam-se de células gliais, como por exemplo, astrócitos e oligodendrócitos (Liu *et al.*, 2011) ou em suas células progenitoras e células associadas à vascularização e às meninges (Dai & Holland, 2001). Gliomas de origem astrocitária, oligodendroglial e ependimal são responsáveis por mais de 70% de todos os tumores que afetam o SNC (Ohgaki & Kleihues, 2005a). Os astrocitomas são uma classe de gliomas compostos principalmente por astrócitos neoplásicos e suas taxas de incidência em populações europeias e norte americanas são geralmente maiores quando comparadas com as asiáticas (**Fig. 3**) (Ohgaki & Kleihues, 2005a).



**Fig. 3** – Taxas de incidência de astrocitomas em vários países e regiões mundiais ajustadas pela população mundial padrão (todas as idades por 100.000 pessoas ao ano). Populações caucasianas geralmente apresentam maiores taxas de incidência quando comparadas com populações asiáticas. Adaptado de (Ohgaki & Kleihues, 2005a).

A Organização Mundial da Saúde definiu a classificação dos astrocitomas da seguinte forma (**Tabela 1**): grau I representa os astrocitomas pilocíticos mais circunscritos; grau II inclui os tumores de origem astrocitária com infiltração difusa e com atipia citológica; grau III apresenta todas as características do astrocitomas de grau II além de anaplasia e atividade mitótica; os tumores de grau IV apresentam adicionalmente às características do grau III a proliferação microvascular e/ou necrose (Louis *et al.*, 2007).

**Tabela 1** – Classificação dos Astrocitomas segundo a Organização Mundial da Saúde. Modificado de (Louis *et al.*, 2007).

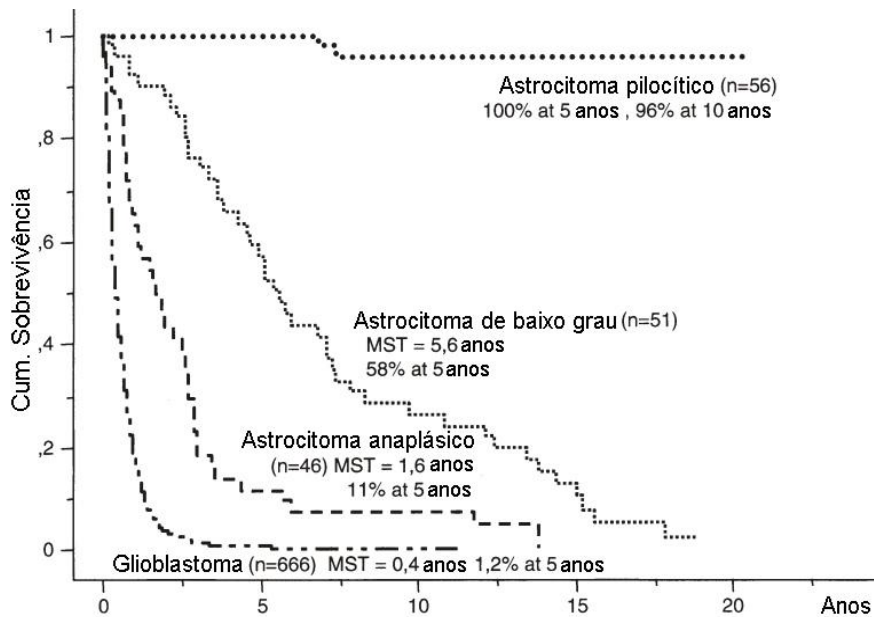
<b>Astrocitomas</b>	<b>Grau I</b>	<b>Grau II</b>	<b>Grau III</b>	<b>Grau IV</b>
Astrocitoma subependimal de célula gigante	X			
Astrocitoma pilocítico	X			
Astrocitoma pilomixóide		X		
Astrocitoma difuso		X		
Xantastrocitoma pleomórfico		X		
Astrocitoma anaplásico			X	
Glioblastoma				X
Glioblastoma de célula gigante				X
Gliossarcoma				X

Neste trabalho será dada uma maior ênfase ao astrocitoma de grau IV, principalmente ao glioblastoma, devido à sua alta incidência e relevância clínica.

## **1.2 Glioblastoma**

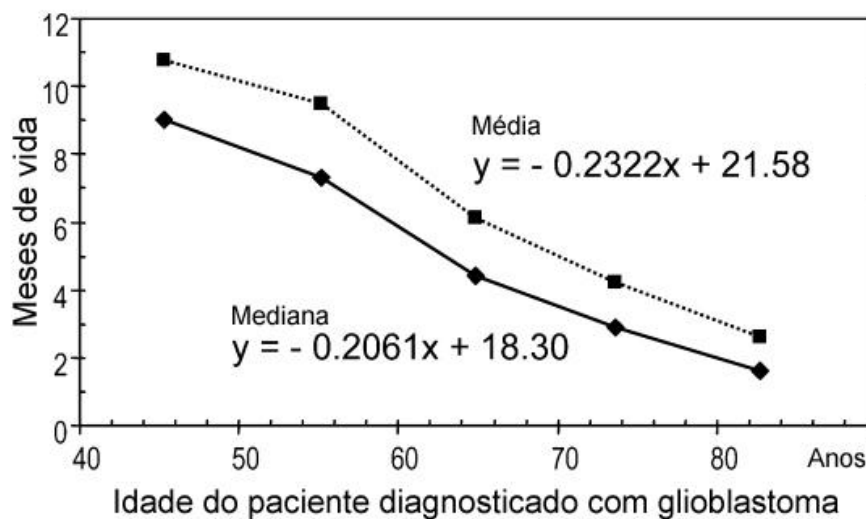
O glioblastoma é o tumor cerebral mais maligno e mais freqüente na população humana, representando 69% de todos os casos de astrocitomas e oligodendrogliomas (Ohgaki & Kleihues, 2005b). Esta neoplasia maligna ocorre geralmente em pacientes com uma faixa etária entre 45 e 80 anos (Ohgaki & Kleihues, 2005b). Quando comparada aos outros astrocitomas, a história clínica dos pacientes portadores de glioblastoma geralmente é curta, com um tempo médio de sobrevida de 4,7 meses (**Fig.**

4), exceto quando originário de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico (glioblastoma secundário).



**Fig. 4** - Tempo médio de sobrevivência (MST) dos pacientes de uma população de estudo com Astrocitoma pilocítico (Grau I), Astrocitoma de baixo-grau (Grau II), Astrocitoma anaplásico (Grau III) e glioblastoma (Grau IV). Com exceção dos pacientes com astrocitoma pilocítico, os quais apresentaram uma mortalidade reduzida, a sobrevivência dos pacientes que apresentaram os demais astrocitomas, principalmente os glioblastomas, é baixa. Adaptado de (Ohgaki & Kleihues, 2005b).

Em pacientes com glioblastomas, há uma correlação negativa entre idade de diagnóstico e tempo de sobrevida dos pacientes, ou seja, quanto mais avançada a idade menor é o tempo de sobrevivência (**Fig. 5**) (Ohgaki & Kleihues, 2005b).



**Fig. 5** - Sobrevivência de pacientes com glioblastomas (média e mediana). Quanto maior a idade de diagnóstico da doença menor será o prognóstico de sobrevivência. Adaptado de (Ohgaki & Kleihues, 2005b).

Pacientes portadores de glioblastoma geralmente apresentam diversos sintomas neurológicos como dores de cabeça e mudanças na personalidade, além de um rápido e exacerbado aumento da pressão intracranial (Kleihues *et al.*, 1995). Geralmente os tumores estão localizados nos hemisférios cerebrais, principalmente no lobo frontal e temporal (Kleihues *et al.*, 1995). Glioblastomas intraventriculares, de cerebelo e medula espinhal são raros, assim como no tronco encefálico. Estes últimos são mais comuns em crianças (Dohrmann *et al.*, 1976).

Em tomografias computadorizadas, os glioblastomas se apresentam como uma lesão de formato irregular, com uma zona periférica em anel que capta contraste, ao redor de uma área central de necrose, a qual geralmente é hipodensa (Kleihues & Cavenne, 2000). Análises de cortes de cérebro de glioblastoma não tratados mostram que essa estrutura em anel não representa a borda tumoral mais externa, e as células do glioma podem ser encontradas 2 cm além da margem (Burger *et al.*, 1988). O óbito ocorre por crescimento tumoral local e invasão cerebral (Kleihues & Cavenne, 2000).

A ressecção cirúrgica do glioblastoma multiforme é o tratamento de intervenção inicial mais utilizado nos pacientes (DeAngelis, 2001). A excisão total está associada a uma sobrevivência mais longa e a uma melhora na função neurológica, entretanto, todos os esforços devem ser feitos na tentativa de remover o máximo possível do tumor (DeAngelis, 2001). A sobrevida é prolongada pela radioterapia realizada após a cirurgia, porém, a maioria dos pacientes chega ao óbito em até um ano após o tratamento (DeAngelis, 2001). Os sobreviventes geralmente são jovens, com boa saúde e habilitados para fazer a ressecção total do glioblastoma e do peritumor, seguidos de radioterapia e quimioterapia (DeAngelis, 2001).

Os mecanismos de invasão e progressão dos glioblastomas ainda não foram totalmente elucidados. Sabe-se que a invasibilidade da célula neoplásica está

relacionada com sua mobilidade, capacidade de adesão e de proteólise da matriz extracelular (Pilkington, 1994). Além disso, o crescimento tumoral requer a indução de angiogênese. Esse processo é regulado por fatores indutores e inibidores de proliferação e migração de células endoteliais (Pilkington, 1994; Vajkoczy *et al.*, 1999; Hamel & Westphal, 2000). A proliferação microvascular acentuada é uma das principais características do glioblastoma e é traduzida principalmente por proliferação de células endoteliais (Wesseling *et al.*, 1997).

Devido ao fato da caixa craniana conter um espaço muito limitado para o crescimento tumoral, os gliomas desenvolveram mecanismos de remoção do tecido ao seu redor, permitindo sua expansão (Ye & Sontheimer, 1999; de Groot & Sontheimer, 2011). Estudos recentes sugerem que as células localizadas na periferia de um glioma em crescimento são capazes de liberar glutamato através do trocador de cistina/glutamato em concentrações que podem causar morte de células neuronais no tecido adjacente, o que torna possível a ocupação desse espaço pelas células tumorais (Ye & Sontheimer, 1999; de Groot & Sontheimer, 2011).

### **1.3 Modelos experimentais de glioblastomas**

Muitas linhagens de glioblastomas, tanto humanas quanto animais, têm sido amplamente utilizadas para estudos *in vitro* sobre esses tumores cerebrais. Estes trabalhos tem como objetivo principal a investigação da biologia das células tumorais e a avaliação da toxicidade de fármacos sobre as células cancerígenas, visando no futuro a sua utilização como potenciais alvos terapêuticos.

Entretanto, modelos animais são continuamente necessários na neuro-oncologia experimental, pois permitem testar a eficácia de abordagens inovadoras para o tratamento de tumores cerebrais (Barth & Kaur, 2009), como por exemplo, novos alvos

terapêuticos já estudados em culturas de linhagens de glioblastomas (Dai & Holland, 2001). Além disso, modelos animais são ferramentas poderosas para a identificação de aspectos importantes da biologia de gliomas, os quais não podem ser estudados em sistemas de culturas celulares, como, por exemplo, angiogênese, invasibilidade e metástase (Dai & Holland, 2001).

Os modelos xenográficos baseados na implantação intracerebral de linhagens de glioblastomas humanos em ratos imunologicamente deficientes são muito utilizados, pois nenhum modelo animal disponível simula exatamente um glioblastoma humano (Barth & Kaur, 2009). Porém, como este é um modelo aplicado em animais com a imunidade deficiente, o seu uso não possibilita a investigação da resposta imune causada pelos glioblastomas e, tampouco, se há uma influência dos tratamentos terapêuticos sobre ela.

Principalmente devido a essas circunstâncias, muitas linhagens de gliomas foram induzidas em ratos através do tratamento agudo ou crônico com N-metil-N-nitrosourea (MNU) ou N-etil-N-nitrosourea (ENU), levando ao desenvolvimento de vários modelos de tumores cerebrais de rato, os quais apresentam uma alta atividade proliferativa *in vitro* e não requerem a aplicação de uma substância carcinogênica diretamente no cérebro (Barth & Kaur, 2009). Após a ressecção destes tumores e o cultivo contínuo de suas células *in vitro*, a re-implantação dessas linhagens no cérebro de ratos tem sido muito utilizada para o estudo *in vivo* de glioblastomas. Os tumores formados pela re-implantação, geralmente se assemelham muito histologicamente à ressecção de glioblastomas humanos (Grobbs *et al.*, 2002).

Dentre esses tumores induzidos em ratos, o mais utilizado na literatura para o estudo *in vitro* e *in vivo* de glioblastomas é o glioma da linhagem C6.

## 1.4 Linhagem de glioma C6

A linhagem de glioma de rato C6 foi originalmente induzida em ratos Wistar pela administração repetitiva de N-nitroso-N-metiluréia e os tumores formados foram retirados e cultivados *in vitro* (Benda *et al.*, 1968). Até o momento, esta linhagem tem sido amplamente usada como modelo para investigar vários aspectos da biologia celular como, por exemplo, sinalização celular (Ahmed *et al.*, 2011), estresse oxidativo (Zhou *et al.*, 2011), metabolismo (Miller *et al.*, 2011), estrutura e função de biomembranas (Quintero *et al.*, 2010), dinâmica do citoesqueleto (Loureiro *et al.*, 2011) e toxicidade de drogas (Alaimo *et al.*, 2011). Além disso, diversos estudos têm utilizado esta linhagem como modelo celular para estudar a estrutura e função de gliomas (Grobben *et al.*, 2002; Barth & Kaur, 2009) bem como de células astrogliais (Mangoura *et al.*, 1989; Vernadakis *et al.*, 1992).

### 1.4.1 Passagens Recentes da linhagem de glioma C6 (PRC6)

As passagens recentes das culturas da linhagem C6 são morfologicamente distintas quando comparadas com as passagens tardias. Parker e colaboradores (Parker *et al.*, 1980), usando a coloração de Giemsa, mostraram que as passagens recentes da linhagem C6 (PRC6) apresentaram núcleo escuro, pericário escasso e processos citoplasmáticos finos. Além disso, muitos estudos têm relatado que PRC6 são menos diferenciadas e mais glioblásticas do que as passagens tardias (Parker *et al.*, 1980; Mangoura *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Goya *et al.*, 1996). Devido a essas características, PRC6 têm sido amplamente usadas como modelo de glioblastomas para uma variedade de estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados a vias de sinalização (Braganhol *et al.*, 2009), metabolismo de gliomas (Eloqayli *et al.*, 2011), invasão e crescimento tumoral (Zhai *et al.*, 2011), migração (Chen *et al.*, 2011), rompimento da barreira hemato-encefálica (Weyerbrock *et al.*, 2011), neovascularização (Kostourou *et*

al., 2011), produção e regulação de fatores de crescimento (Lu *et al.*, 2010) e terapia de drogas (El Sayed *et al.*, 2011). Além disso, PRC6 apresentam morfologia e fisiologia similar a glioblastoma multiforme quando injetadas i.c.v. em ratos Wistar (Auer *et al.*, 1981), incluindo pleomorfismo nuclear, alto índice mitótico, focos de necrose tumoral, hemorragia intratumoral e invasão parenquimal (Grobben *et al.*, 2002; Morrone *et al.*, 2006).

#### **1.4.2 Passagens Tardias da linhagem de glioma C6 (PTC6)**

Após sucessivas passagens em cultura, a linhagem C6 pode se diferenciar em uma população menos plástica, a qual se assemelha à astroglia madura (Parker *et al.*, 1980; Mangoura *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Goya *et al.*, 1996). As passagens tardias da linhagem C6 (PTC6) apresentam núcleo mais largo, pericário abundante e longos processos citoplasmáticos (Parker *et al.*, 1980). Além disso, PTC6 possui algumas características fisiológicas e bioquímicas que se assemelham a astrócitos em cultura, como níveis similares da atividade da glutamina sintetase (Mangoura *et al.*, 1989; Kazazoglou *et al.*, 1996) e de secreção de S100B (Quincozes-Santos *et al.*, 2010b). Principalmente devido a estas características, alguns autores têm usado essas células como modelo para estudar a sinalização glial (Yasuda *et al.*, 2011), secreção glial de fatores de crescimento (Tsuchioka *et al.*, 2011), estresse oxidativo (Quincozes-Santos *et al.*, 2010a) e a sensibilidade de células gliais a várias substâncias e condições (Asanuma *et al.*, 2010; Nardin *et al.*, 2011).

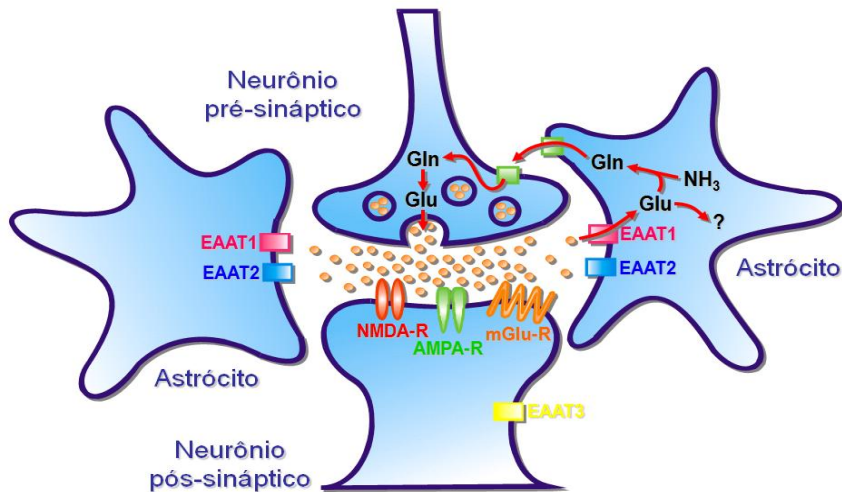


## 2 Glutamato

O glutamato é o aminoácido encontrado em maior concentração no Sistema Nervoso Central (SNC), desempenhando um papel metabólico muito importante (Krebs, 1935). Os propósitos metabólicos deste aminoácido incluem a síntese de proteínas, manutenção do metabolismo energético e fixação da amônia, ou sua reutilização como transmissor (Fonnum, 1984; Danbolt, 2001).

Atualmente, este aminoácido é considerado o principal mediador de sinais excitatórios do SNC (Fonnum, 1984; Collingridge & Lester, 1989; Headley & Grillner, 1990; Danbolt, 2001), onde participa de inúmeros eventos fisiológicos e plásticos, tais como: memória e aprendizado (Izquierdo et al., 2006), adaptação ambiente extracelular (Ozawa *et al.*, 1998), proliferação e migração celular (McDonald & Johnston, 1990). O glutamato também apresenta um papel no desenvolvimento e envelhecimento do SNC (Segovia *et al.*, 2001), incluindo indução (Durand *et al.*, 1996; Hanse *et al.*, 1997; Kurihara *et al.*, 1997) e eliminação de sinapses (Rabacchi *et al.*, 1992), migração (Komuro & Rakic, 1993), diferenciação e morte celular (McDonald & Johnston, 1990; Komuro & Rakic, 1993).

A sinalização glutamatérgica (**Fig. 6**) ocorre após da liberação do glutamato na fenda sináptica (Fonnum, 1984; Danbolt, 2001). A ocorrência de um potencial de ação no terminal pré-sináptico acarretará em uma despolarização da membrana plasmática, permitindo a liberação das vesículas que contém glutamato de uma maneira  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente (Fonnum, 1984; Danbolt, 2001). O glutamato liberado na fenda sináptica se liga a seus receptores presentes no botão pós-sináptico, exercendo sua função excitatória (Fonnum, 1984; Danbolt, 2001).



**Fig. 6** – Sinapse glutamatérgica mostrando alguns receptores e transportadores de glutamato, o mecanismo de sua captação exercido pelas células gliais assim como o ciclo glutamato-glutamina. Legenda: Glu (Glutamato); Gln (Glutamina). Modificado de Siegel et al., Basic Neurochemistry, Seventh edition, 2006, pg. 270.

## 2.1 Captação de glutamato

O término da sinalização glutamatérgica ocorre por um mecanismo denominado captação de glutamato (Logan & Snyder, 1972; Fonnum, 1984; Balcar & Li, 1992; Danbolt, 2001). A captação de glutamato é o principal mecanismo responsável pela manutenção dos níveis extracelulares de glutamato abaixo dos níveis considerados tóxicos (Fonnum, 1984; Danbolt, 2001). Este processo é realizado por transportadores de glutamato presentes na membrana plasmática de neurônios e células gliais, principalmente em astrócitos (Rothstein et al., 1996) (**Fig. 6**).

Atualmente já foram descritos cinco tipos de transportadores de glutamato: GLAST/EAAT1 (Storck *et al.*, 1992), GLT-1/EAAT2 (Pines *et al.*, 1992), EAAC1/EAAT3 (Kanai & Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman *et al.*, 1995) e EAAT5 (Arriza *et al.*, 1997). Estes cinco transportadores apresentam de 50 a 60% de semelhança em suas seqüências de aminoácidos (Gether *et al.*, 2006).

EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1 foram somente detectados em astrócitos (Rothstein *et al.*, 1994; Lehre *et al.*, 1995; Lehre & Danbolt, 1998), tanto no corpo celular quanto nos processos das células astrocitárias (Lehre *et al.*, 1995). Uma exceção

é a expressão de EAAT2/GLT-1 em retina, onde é encontrado em diferentes tipos de células bipolares, mas não na glia de Müller ou outras células gliais (Rauen *et al.*, 1992). Estes dois transportadores são quantitativamente os principais transportadores de glutamato, sendo responsáveis pela maior parte de sua captação no SNC (Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001). Sua distribuição e concentração no SNC é dependente da região) (Gegelashvili & Schousboe, 1998; Danbolt, 2001) e varia conforme o estágio de desenvolvimento cerebral (Furuta *et al.*, 1997; Maragakis & Rothstein, 2001).

Embora os demais transportadores de glutamato, EAAT3/EAAC1, EAAT4 e EAAT5 sejam encontrados predominantemente em neurônios (Gegelashvili & Schousboe, 1998), recentemente a expressão do EAAT4 foi descrita em astrócitos (Hu *et al.*, 2003).

O EAAT3/EAAC1 é encontrado na maioria dos neurônios do sistema glutamatérgico, assim como nos neurônios do sistema gabaérgico (células de Purkinje no cerebelo) (Danbolt, 2001; Nedergaard *et al.*, 2002), mas quando comparado com EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1, sua expressão é bastante reduzida (Tanaka *et al.*, 1997). O EAAT4 está localizado nas células de Purkinje no cerebelo (Tanaka *et al.*, 1997), mas pode também ser encontrado em concentrações muito baixas no telencéfalo (Danbolt, 2001). Encontra-se em maiores concentrações na parte da membrana espinhal que se defronta com a astrogliá, desaparecendo gradualmente através do corpo celular (Dehnes *et al.*, 1998). Além disso, é transitoriamente expresso durante o desenvolvimento, com pico em 10 dias pós-natal (Furuta *et al.*, 1997).

Poucos estudos sobre a localização do transportador EAAT5 em mamíferos foram realizados até o presente momento; entretanto, alguns relatos têm demonstrado sua presença em células de retina (Arriza *et al.*, 1997), onde seu papel fisiológico ainda é desconhecido.

## 2.2 Receptores glutamatérgicos

O glutamato exerce seus papéis fisiológicos e patológicos através da ativação de seus receptores de membrana (GluRs), tanto neuronais quanto gliais (Ozawa *et al.*, 1998). Os GluRs são divididos em duas classes: metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (iGluRs) (Nakanishi *et al.*, 1998; Ozawa *et al.*, 1998; Danbolt, 2001). Os mGluRs são acoplados a proteínas G e estão subdivididos em 8 subtipos (mGluR<sub>1-8</sub>) (Tanabe *et al.*, 1992; Ozawa *et al.*, 1998; Danbolt, 2001). Por outro lado, os iGluRs são acoplados a um canal iônico cátion-específico e são subdivididos em três subtipos: receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), receptor cainato e receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) (Ozawa *et al.*, 1998; Danbolt, 2001).

O glutamato, quando presente em altas concentrações na fenda sináptica, pode tornar-se uma potente neurotoxina (Choi, 1992; Danbolt, 2001). A excessiva ativação de receptores ionotrópicos aumenta a concentração de  $Ca^{+2}$  citosólico livre, devido ao seu influxo através de canais acoplados a estes receptores, em particular do tipo NMDA (Ozawa *et al.*, 1998). Isto pode resultar em um evento denominado excitotoxicidade (Olney, 2003), que leva à morte neuronal.

A excitotoxicidade glutamatérgica tem sido implicada na patogênese de vários transtornos agudos e crônicos do SNC, como, por exemplo, isquemia, esclerose amiotrófica lateral, doença de Alzheimer, encefalopatia hepática, epilepsia e mais recentemente na invasibilidade e proliferação de gliomas (Ye & Sontheimer, 1999; Maragakis & Rothstein, 2001; Takano *et al.*, 2001; de Groot & Sontheimer, 2011).

## 2.3 Linhagem C6 e Sistema Glutamatérgico

Estudos recentes têm sugerido que as células de da linhagem de glioma C6 são capazes de liberar grandes quantidades de glutamato para o espaço extracelular (Ye &

Sontheimer, 1999; de Groot & Sontheimer, 2011), o que está relacionado ao aumento da sua capacidade proliferativa e invasiva (Takano *et al.*, 2001). Células da linhagem C6 com alta capacidade em liberar glutamato apresentam uma vantagem proliferativa distinta quando injetadas no córtex estriado de ratos e o tratamento com antagonista de receptores NMDA (MK801) reduziu em aproximadamente 50% o tamanho tumoral (Takano *et al.*, 2001).

Muitos autores têm usado a linhagem C6 para estudar a atividade e a regulação dos receptores (Castillo *et al.*, 2010) e transportadores de glutamato (Davis *et al.*, 1998; González *et al.*, 2007; Sheldon *et al.*, 2008). Além disso, células desta linhagem transfectadas com GLT-1 também foram usadas para demonstrar que o aumento na capacidade de transporte de glutamato causado pela transfecção do transportador reduziu a proliferação e o comportamento invasivo dos tumores implantados (Vanhoutte & Hermans, 2008; Vanhoutte *et al.*, 2009).

Devido ao fato das células gliais desempenharem um papel importante no sistema glutamatérgico, mantendo os níveis de glutamato extracelular abaixo dos considerados tóxicos (Danbolt, 2001), e também devido ao fato de que várias evidências têm sugerido que o glutamato apresenta um papel fundamental na proliferação e invasão de glioblastomas (Ye & Sontheimer, 1999; Takano *et al.*, 2001; de Groot & Sontheimer, 2011), muitos pesquisadores têm utilizado a linhagem C6 como modelo astrogliar e de glioblastomas para investigar parâmetros relacionados ao sistema glutamatérgico (Dowd *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1998; Palos *et al.*, 1999; Takano *et al.*, 2001; González *et al.*, 2007; Sheldon *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2010). Porém, não há trabalhos na literatura comparando os diversos parâmetros do sistema glutamatérgico em culturas da linhagem C6 de passagens recentes e tardias.

---

Parte I

**OBJETIVOS**

---

## **1. Objetivo Geral**

O objetivo geral desta dissertação foi avaliar e comparar as características da sinalização glutamatérgica em culturas da linhagem C6 de passagens recentes e tardias.

## **2. Objetivos específicos**

- Avaliar a captação e a liberação de L-Glu em culturas de C6 de passagens recentes (PRC6) e tardias (PTC6);
- Avaliar o imunoconteúdo de transportadores de glutamato de alta afinidade  $\text{Na}^+$  dependentes (GLAST, GLT-1 e EAAC1) em PRC6 e PTC6;
- Avaliar a captação e a liberação de D-Asp em PRC6 e PTC6;
- Avaliar a atividade da glutamina sintetase em PRC6 e PTC6.

---

**Parte II**  
**RESULTADOS**

---



## CAPÍTULO I

### **EARLY AND LATE PASSAGE C6 CELL CULTURES HAVE DISTINCT CAPACITIES TO MAINTAIN INTRACELLULAR LEVELS OF TRITIUM DERIVED FROM L-[<sup>3</sup>H]-GLUTAMATE UPTAKE.**

Mery Stéfani Leivas Pereira, Kamila Zenki, Marcela Mendonça Cavalheiro, Rafael Zanin, Diogo Onofre Gomes de Souza e Diogo Losch de Oliveira.

*Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.*

Artigo submetido ao periódico Neurochemical Research

**EARLY AND LATE PASSAGE C6 CELL CULTURES HAVE DISTINCT CAPACITIES TO MAINTAIN INTRACELLULAR LEVELS OF TRITIUM DERIVED FROM L-[<sup>3</sup>H]-GLUTAMATE UPTAKE.**

Mery Stéfani Leivas Pereira, Kamila Zenki, Marcela Mendonça Cavalheiro, Rafael Zanin, Diogo Onofre Gomes de Souza e Diogo Losch de Oliveira.

*Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.*

\* Address for correspondence:

Mery Stéfani Leivas Pereira

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo.

CEP: 90035-003

Porto Alegre, RS, BRAZIL.

Tel: +55 51 3316-5555

Fax: +55 51 3316-5540

E-mail: meryzinhaufrgs@gmail.co

## ABSTRACT

C6 lineage has been widely used to investigate several aspects of cell biology. This lineage presents morphological and physiological variations according to number of passages in culture. Later passages resemble mature astroglia while early passages are similar to glioblastomas. Many studies have used C6 lineage as astroglial and glioma model to investigate glutamatergic parameters, however its characterization was not made in C6 cultures at early and late passages. The present study aims to investigate and compare some glutamatergic parameters of early and late passage C6 cells in culture. Early passages have L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] 55% higher when compared to later passages. Both cultures reached the plateau at 120 min, which can be related to release of 50% of [<sup>3</sup>H] captured as L-[<sup>3</sup>H]-Glu. Moreover, cells showed a time-dependent increase of D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H], without reaching a plateau, which can be related to its non release. However, D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] in later passages was lower than early passages at 60-120 min of incubation. EAAC1 total expression was equal in both cells, suggesting that amino acids uptake occurred through this transporter, the unique expressed in cultures. In conclusion, our results demonstrate that early and late passages C6 cells differ in their capacity of accumulating intracellular content of [<sup>3</sup>H] derived from L-[<sup>3</sup>H]-Glu, indicating that number of passages should be considered in studies that intent to evaluate glutamatergic parameters in C6 lineage.

**Keywords:** C6 lineage, glutamate uptake, glutamate release, EAAC1.

## INTRODUCTION

C6 lineage was originally induced in Wistar rats by repetitive administration of N,N'-nitroso-methylurea and tumors formed were excised and explanted into cultures [1]. To date, this lineage has been widely used as a model to investigate several aspects of cell biology such as cell signaling [2], oxidative stress [3], metabolism [4], structure and function of biomembranes [5], cytoskeletal dynamics [6] and drug toxicity [7]. Moreover, some reports have also employed this lineage as a cellular model to study structure and function of glioma [8,9] and astroglial cells [10,11].

C6 cells cultures at early passages are distinct morphologically when compared to later passages. Parker et al. [12], using Giemsa staining, described that early passage C6 cells (EPC6) showed a dark nuclei, scanty perikaryon and thin cytoplasmic processes. Moreover, several studies have reported that EPC6 are less differentiated and more glioblastic in nature than later passages [10,12-14]. Because of these features, EPC6 have been widely used as a glioblastoma model for a variety of *in vivo* and *in vitro* studies related to signaling pathways [15], glioma metabolism [16], tumor growth and invasion [17], migration [18], blood-brain barrier disruption [19], neovascularization [20], growth factor regulation and production [21] and drugs therapy [22]. In addition, EPC6 present morphology and physiology similar to glioblastoma multiforme when injected intracerebrally in Wistar rats [23], including nuclear pleomorphism, high mitotic index, foci of tumor necrosis, intratumoral hemorrhage and parenchymal invasion [8].

After successive passages in culture, C6 lineage can differentiate into a cell population that is less plastic and resemble mature astroglia [10,12-14]. Late passage C6 cells (LPC6) presented larger nuclei, abundant perikaryon and longer cytoplasmic

processes [12]. Furthermore, LPC6 have some biochemical and physiological characteristics that resemble astrocytes in culture, such as similar levels of glutamine synthetase (GS) activity [10,24] and S100B secretion [25]. Mainly because of this features, some authors have used these cells as model to study glial cells signaling [26], glial secretion of growth factors [27], oxidative stress [28] and sensitivity of glial cells to various substances and conditions [29,30].

Recent studies have suggested that glioma cells are able to release higher amounts of glutamate to extracellular space [31,32], which is implicated in an increase of its proliferative and invasive capacity [33]. C6 cells with high glutamate release profile had a distinct growth advantage when inject in striatum of rats and treatment with NMDA receptor antagonists (MK-801) reduced approximately 50% of tumor growth [33]. A lot of authors have used C6 lineage to study the activity and regulation of glutamate receptors [34] and transporters [35-37]. Beside this, GLT-1 transfected C6 cells was also used as glioma model to demonstrated that enhancing in glutamate transport caused by GLT-1 transfection reduced the proliferation and invasive behavior of implanted tumors [38,39].

Although many researchers have used C6 lineage as astroglial and glioma model to investigate matters related to glutamatergic system, studies have not been done to characterize glutamatergic parameters in wild C6 cultures at early and late passages. Therefore, the present work aims to evaluate and compare some glutamatergic parameters of EPC6 and LPC6 in culture, mainly using L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake assay. Since most of authors that use this lineage as astroglial or glioma model frequently do not specify in the articles which passage was used in your experiments, the comparison of glutamatergic parameters between EPC6 and LPC6 may contribute to better awareness

of researchers in identify which model is been used. Besides, this characterization is important, because it could improve the understanding of future studies involving the use of C6 models relating to glutamatergic system.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

L-[3,4-<sup>3</sup>H]-Glutamate (L-[<sup>3</sup>H]-Glu) and D-[2,3-<sup>3</sup>H]-Aspartate (D-[<sup>3</sup>H]-Asp) were purchased from PerkinElmer Inc., USA. Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin and fungizone were obtained from *Gibco*®, Invitrogen™, USA. Fetal Bovine Serum (FBS) was obtained from Cultilab, Brazil. Propidium iodide (PI), L-Glutamate (L-Glu), D-Aspartate (D-Asp), monoclonal mouse anti-β-actin IgG and reagents for cell culture, western blot and glutamine sintetase assay were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC., USA. Western blot polyclonal anti-glutamate transporters (GLAST, GLT1 EAAC1) were from Alpha Diagnostic Intl. Inc., USA. Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG and horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG were obtained from GE Healthcare, USA. *L-trans*-2,4--*trans*-Pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (PDC) and *DL-threo*-β-Benzyloxyaspartic acid (TBOA) were purchased from Tocris Bioscience, USA. All other chemicals were purchased from common commercial suppliers.

### Cell culture

C6 glioma cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Early (6-15 passages) and late (beyond 100 passages) passage C6 cells were grown in culture flasks containing 1% DMEM, 23.8mM NaHCO<sub>3</sub>, 8.39mM Hepes sodium salt (pH 7.4), 0.25 μg/ml fungizone, 50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin and 5% FBS. Early (2x10<sup>5</sup> cells/well) and late (1.8x10<sup>5</sup> cells/well) passages C6 cells were seeded in 6-multiwell plates and the assays

were performed after 3 days of culture (90% confluence). The cultures were maintained at 37 °C in a 95:5 air/CO<sub>2</sub> atmosphere.

### **Uptake assay**

C6 cell cultures were pre-incubated during 15 min at 37 °C in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (mM): 137 NaCl, 0.60 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.00 NaHCO<sub>3</sub>, 20 Hepes sodium salt, 5.00 KCl, 0.40 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.26 CaCl<sub>2</sub>, 0.90 MgSO<sub>4</sub> and 5,55 glucose; pH 7.4. After, cells were washed twice with HBSS and incubated with HBSS (37°C) containing 100 μM of unlabeled L-Glu or D-Asp plus 0.35 μCi.mL<sup>-1</sup> L-[<sup>3</sup>H]-Glu or 0.49 μCi.mL<sup>-1</sup> D-[<sup>3</sup>H]-Asp. Uptake was stopped in specific times by two washes with ice-cold HBSS (4°C) immediately followed by addition of 0,5 N NaOH. Sodium-independent uptake was determined at 37 °C using HBSS containing N-methyl-D-glucamine instead of NaCl and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Sodium-dependent uptake was obtained subtracting sodium-independent from total uptake.

For L-[<sup>3</sup>H]-Glu and D-[<sup>3</sup>H]-Asp uptake inhibition assay, cultures were pre-incubated (15 min) and incubated (120 min) in HBSS containing 100 μM PDC or 100 μM TBOA [40] plus 100μM of unlabeled L-Glu or D-Asp and 0.35 μCi.mL<sup>-1</sup> L-[<sup>3</sup>H]-Glu or 0.49 μCi.mL<sup>-1</sup> D-[<sup>3</sup>H]-Asp. Protein determination was assessed using method described by Peterson et al. [41] and the radioactivity was quantified by scintillation. Data were expressed as nmol.mg prot<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

### **Radioactive release assay**

Release of L-[<sup>3</sup>H]-Glu and D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] was assessed through a similar protocol for amino acids uptake. Cells were incubated during 60 min in HBSS at 37 °C containing L-[<sup>3</sup>H]-Glu or D-[<sup>3</sup>H]-Asp plus unlabeled 100 μM



of L-Glu or D-Asp. For quantification of [<sup>3</sup>H] release, cultures were washed twice and re-incubated during 60 min with HBSS at 37°C containing only 100 μM of unlabeled L-Glu or D-Asp. Assay was stopped by collecting extracellular HBSS medium followed by addition of 0,5 N NaOH to cells. Extracellular and intracellular radioactivity was quantified by scintillation and protein determination was assessed as previously described.

Inhibition of L-[<sup>3</sup>H]-Glu and D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived [<sup>3</sup>H] release through reversion of glutamate transporters was performed by addition of 100 μM of TBOA during re-incubation time. Data were expressed as nmol.mg prot<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

### **Membrane integrity**

Early and late passage C6 cells were incubated in HBSS medium in absence (controls) or presence of unlabeled 100 μM of L-Glu during specific times. After, cells were incubated with 5 μM propidium iodide (PI) during 30 min. The number of PI positive cells was assessed by Flow Cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences). A total of 100 events were counted and data were expressed as percentage of cells that incorporate PI.

### **Western blot**

Both cultures were treated with HBSS containing 100 μM L-Glu in specific times. Cells were homogenized in a lysis buffer (5 mM Tris base, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS and protease inhibitor cocktail; pH 7.0) and protein content was normalized to 2 μg protein/μl. Aliquots were diluted 1:1 in sample buffer (0.01 g% Bromophenol Blue, 60 mM Tris base, 20 % glycerol, SDS 2 % and 2-β-mercaptoetanol 5%; pH 6.8) and were resolved by 8% SDS-PAGE. Proteins were electro transferred to nitrocellulose

membranes (GE Healthcare, USA) using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Trans-Blot SD). After 2 hours of incubation in blocking solution containing 5% powdered milk and 0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline (TBS; 10 mM Tris base, 30mM NaCl, pH 7.4), membranes were incubated overnight with anti-EAAC1 IgG (0.17  $\mu\text{g/ml}$ ), or anti-GLT1 IgG (0.33  $\mu\text{g/ml}$ ), or anti-GLAST IgG (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and anti- $\beta$ -actin IgG (1:3000) at 4° C *overnight*. The membranes were then exposed to horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1:1000 *overnight* or to horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 1:3000 for 2 hours at 4° C. The chemiluminescence (ECL, (GE Healthcare, USA) was detected using X-ray films (Kodak X-Omat). Films were scanned and the percentage of band intensity was analyzed using Optiquant software.  $\beta$ -actin was used as protein loading control.

### **Glutamine synthetase activity**

Glutamine synthetase (GS) enzymatic activity assay was performed as previously described by Petito et al. [42]. Briefly, EPC6 and LPC6 were lysed in 150 mM KCl containing 0,1 % Triton X-100. Samples were adjusted to 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and 100  $\mu\text{L}$  were incubated in 100  $\mu\text{L}$  of reaction solution (10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM L-Glu, 10 mM 2- $\beta$ -mercaptoethanol; 50 mM hydroxylamine-HCl; 10 mM ATP and 100 mM imidazole-HCl buffer; pH 7.4) for 15min at 37°C. The end of reaction occurred by addition of 400  $\mu\text{L}$  of stop solution (370 mM ferric chloride; 0.67 N HCl and 3.3 % trichloroacetic acid). After centrifugation (1000g during 10 min), the absorbance of supernatants was measured at 530nm. Synthetic  $\gamma$ -glutamylhydroxamate ( $\gamma$ -GH) was used for the standard curve. GS activity was expressed as  $\mu\text{mol } \gamma\text{-GH/h.mg prot.}$

## **Statistical analysis**

Data from membrane integrity and western blot analyses were presented as mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments carried out once. Data from uptake assay, radioactive release assay and GS activity were presented as mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments carried out in triplicate. Data from uptake assay, radioactive release assay, membrane integrity and western blot analyses were analyzed by Two-way analysis of variance (ANOVA). Bonferroni test was used to determine the statistical significance of the difference between means. GS activity was analyzed by Student T test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Morphological differences between EPC6 and LPC6

Rat C6 cells lineage presents differences in its morphology depending on number of passages. C6 cells in early passages are smaller and thinner than cells in late passages (**Fig. 1**), which is in agreement with the literature [12].

### L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H]

We exposed both EPC6 and LPC6 to L-[<sup>3</sup>H]-Glu during 5-180 min to determine the profile of incorporation of [<sup>3</sup>H] derived from cells L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake. Both cell cultures showed a time-dependent increase in intracellular content of [<sup>3</sup>H], reaching plateau at 120 min. However, L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] in LPC6 was 55% lower from 60 min ( $21.94 \pm 1.92$  nmol/mg protein; n=13; P<0.001, two-way ANOVA) to 180 min of incubation ( $36.55 \pm 2.36$  nmol/mg protein; n=5; P<0.001, two-way ANOVA) when compared to EPC6 ( $48.75 \pm 5.07$  nmol/mg protein, n=13;  $85.93 \pm 6.78$  nmol/mg protein, n=5; respectively) (**Fig. 2**).

### Membrane integrity

In order to verify whether the lower L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] in LPC6 are related to loss of membrane integrity in these cells, we quantified the PI incorporation in both cultures during incubation with 100  $\mu$ M L-Glu. PI incorporation was about 5% (**Fig. 3A**) and less than 10% in EPC6 and LPC6 respectively (**Fig. 3B**). However, this difference was not significant between groups. Cells untreated with glutamate presented similar levels of PI incorporation, indicating that L-Glu exposure did not alter membrane integrity (**supplementary Fig. 1**).

## Glutamate transporters expression

Western blot analysis were performed to assess whether the difference of L- $^3\text{H}$ -Glu-derived intracellular content of  $^3\text{H}$  between C6 cultures are related to distinct expression of glutamate transporters. Both EPC6 and LPC6 expressed only the neuronal glutamate transporter (EAAC1) at same levels (**Fig. 4**).

## D- $^3\text{H}$ -Asp-derived intracellular content of $^3\text{H}$

In order to evaluate whether differences in L- $^3\text{H}$ -Glu-derived intracellular content of  $^3\text{H}$  between EPC6 and LPC6 are related to different metabolic fates of glutamate, we exposed both cultures to non-metabolizable analogue D- $^3\text{H}$ -Asp.

Both cultures showed a time-dependent increase in intracellular content of D- $^3\text{H}$ -Asp-derived intracellular content of  $^3\text{H}$ , without reaching a plateau.  $^3\text{H}$  intracellular content in LPC6 was 45 % lower at 60 min ( $32.71 \pm 2.95$  nmol/mg protein; n=4; P<0.05, two-way ANOVA) and 30 % lower at 120 min of incubation ( $81.42 \pm 10.50$  nmol/mg protein; n=8; P<0.05, two-way ANOVA) when compared to EPC6 ( $117.05 \pm 7.43$  nmol/mg protein; n=8;  $61.24 \pm 1.58$  nmol/mg protein, n=4; respectively) (**Fig. 5**).

This results suggest that D- $^3\text{H}$ -Asp uptake profile could indicate that this  $^3\text{H}$  is being accumulated in both cultures, probably suggesting that L- $^3\text{H}$ -Glu is been metabolized during uptake assay.

## Radioactive release

We performed a radioactivity release assay to verify whether the lower levels of L- $^3\text{H}$ -Glu-derived intracellular content of  $^3\text{H}$  in LPC6 are related to an increased

radioactivity release from this culture. Approximately 50% of L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] was released to extracellular medium in EPC6 and LPC6 after 60 min of L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake (**Fig. 6A**).

The blockage of EAAC1 reverse transport with TBOA did not alter the release of L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] (**Fig. 6B**), probably suggesting that L-[<sup>3</sup>H]-Glu is not been released through EAAC1 reverse transport. It was not observed a significant release of D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] (**Fig. 6C**), suggesting that this labeled amino acid is probably being accumulated in both C6 cultures and that probably L-[<sup>3</sup>H]-Glu itself is not been released.

### **Uptake inhibition**

EAAC1 blockade by PDC and TBOA was realized to confirm if L-[<sup>3</sup>H]-Glu and D-[<sup>3</sup>H]-Asp were been captured primarily by this glutamate transporter.

EPC6 L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] was reduced in about 70% ( $26.60 \pm 0.95$  nmol/mg protein; n=6; P<0.001, two-way ANOVA) and 80% ( $14.19 \pm 1.60$  nmol /mg protein; n=6; P<0.001, two-way ANOVA) by PDC and TBOA, respectively (**Fig. 7A**). Moreover, blockade of LPC6 EAAC1 by PDC and TBOA decreased L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] nearly in 40% ( $20.00 \pm 1.56$  nmol/mg protein; n=6; P<0.001, two-way ANOVA) and 60% ( $12.57 \pm 1.61$  nmol /mg protein; n=6; P<0.001, two-way ANOVA), respectively (**Fig. 7A**).

EPC6 D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] was reduced 50% ( $57.13 \pm 2.07$  nmol/mg protein; n=4; P<0.001, two-way ANOVA) and 80 % ( $20.06 \pm 0.98$  nmol/mg protein; n=3; P<0.001, two-way ANOVA) by PDC and TBOA, respectively (**Fig. 7B**). In addition, blockade of LPC6 EAAC1 by TBOA decreased D-[<sup>3</sup>H]-Asp-

derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] nearly in 65% ( $28.33 \pm 0.8$  nmol/mg protein; n=3; P<0.001, two-way ANOVA) (**Fig. 7B**).

These results suggest that L-[<sup>3</sup>H]-Glu and D-[<sup>3</sup>H]-Asp uptake occurred mainly through EAAC1.

### **Glutamine synthetase activity**

Both EPC6 and LPC6 showed similar levels of GS activity ( $1.40 \pm 0.14$   $\mu$ mol  $\gamma$ -GH/h.mg prot, n=4;  $1.11 \pm 0.24$   $\gamma$ -GH/h.mg prot, n=4; respectively) (**Fig. 8**), which is in agreement with the literature [12].

## DISCUSSION

C6 lineage has been widely used as a model to investigate several aspects of cell biology. However, accordingly to number of passages in culture, this lineage presents variations in their morphological (**Fig. 1**) and biochemical characteristics [10,12-14]. Early passage C6 cells (EPC6) have been widely used as glioblastoma model for both *in vivo* and *in vitro* studies [8,9], whereas late passage C6 cells (LPC6) have some biochemical and physiological characteristics that resemble mature astroglia [10,24,25]. Because glial cells play an important role in glutamatergic system, maintaining extracellular glutamate in low levels [43] and a lot of evidences have suggested that glutamate plays a key role in the proliferation and invasion of malignant glioblastoma tumors [31-33], many research have used C6 lineage as astroglial and glioma model to investigate parameters related to glutamatergic system [33-37,44,45]. However, the characterization of glutamatergic parameters in C6 cultures at early and late passages was not made. Therefore, the aim of the present study was to investigate and compare some glutamatergic parameters of early and late passage C6 cells in culture.

When C6 cells were incubated with L- $[^3\text{H}]$ -glutamate, both EPC6 and LPC6 displayed a time-dependent increase of L- $[^3\text{H}]$ -Glu-derived intracellular content of  $[^3\text{H}]$ , which reaches a plateau at 120 min of incubation (**Fig. 2**). In addition, EPC6 presented an intracellular content of  $[^3\text{H}]$  55% higher than LPC6 (**Fig. 2**). This distinct profile regarding L- $[^3\text{H}]$ -Glu-derived intracellular content of  $[^3\text{H}]$  was not related to an alteration in the membrane integrity between cultures (**Fig. 3**) (**supplementary Fig. 1**).

Although glutamate is taken up primarily by high affinity  $\text{Na}^+$ -dependent glutamate transporters [43], there are others low affinity transporter systems that could capture extracellular glutamate [32,43]. Therefore, in order to test if these others uptake



systems are contributing to elevation of L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] in EPC6 cells, we treated cultures with specific inhibitors for high affinity Na<sup>+</sup>-glutamate transporters. Treatment with PDC and TBOA reduced in both cultures L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake (**Fig. 7A**) at same levels that those observed for astrocyte cultures and hippocampal slices [40]. This result points to the notion that the L-[<sup>3</sup>H]-Glu was primarily taken up by EAAC1 transporters, the unique high affinity Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporter expressed in both cultures (**Fig. 4C**) [35,44,45], suggesting that others low affinity glutamate uptake systems are not involved.

We performed a release assay to verify if the lower LPC6 ability in maintaining intracellular content of [<sup>3</sup>H] captured as L-[<sup>3</sup>H]-Glu could be related to an increased radioactive release. After 60 min of L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake, both EPC6 and LPC6 cultures released 50% of their intracellular radioactivity (**Fig. 6A**). This result could indicate that both cells have the same capacity to release L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] and that, after 60 min of L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake, cells reach a steady-state between uptake and release. Moreover, release of L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] is not due to reverse transport, since blockade of EAAC1 with TBOA did not alter the release profile (**Fig. 6B**). This result could not explain the differences in L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] between EPC6 and LPC6, however it may be related to the establishment of the plateau 120 min after start the radioactive incubation (**Fig. 2**).

In addition to role of glutamate as neurotransmitter, in several cells types, including C6 cells, glutamate plays an important role as metabolite [46]. When we exposed EPC6 and LPC6 to D-[<sup>3</sup>H]-Asp, a non metabolizable analogue of L-[<sup>3</sup>H]-Glu [40], both cultures showed a time-dependent increase in D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived

intracellular content of [ $^3\text{H}$ ] without reaching a plateau (**Fig. 5**). Absence of plateau in D- $^3\text{H}$ -Asp uptake assay indicates that this labeled amino acid is been accumulated inside the cells, which is probably due its non-release (**Fig. 6C**). Moreover, intracellular radioactivity derived from D- $^3\text{H}$ -Asp uptake was higher in both cultures from 120 min when compared to L- $^3\text{H}$ -Glu-derived intracellular content of [ $^3\text{H}$ ] (**supplementary Fig. 2**). Taken together, these results indicate that which is being released in L- $^3\text{H}$ -Glu release assay is not labeled glutamate but a [ $^3\text{H}$ ]-metabolite, since PDC and TBOA did not affect [ $^3\text{H}$ ] release and that D- $^3\text{H}$ -Asp accumulate inside of cells (**Fig 6B**).

Although our results indicate that L- $^3\text{H}$ -Glu is being metabolized in L- $^3\text{H}$ -Glu uptake assay, it not explain the lower levels of L- $^3\text{H}$ -Glu-derived intracellular content of [ $^3\text{H}$ ] in LPC6 when compared to EPC6. Slightly increase in D- $^3\text{H}$ -Asp-derived intracellular content of [ $^3\text{H}$ ] in EPC6 at 60 min and 120 min when compared to LPC6 (**Fig. 5**) could suggest that EPC6 capture more D- $^3\text{H}$ -Asp since the beginning of uptake assays. However, our results indicated that there was no difference in total expression of EAAC1 between EPC6 and LPC6 (**Fig. 4C**). It is known that there is a relatively large intracellular pool of EAAC1 transporter *in vivo* and *in vitro* and that it cycles on and off to the plasma membrane [36,37]. Therefore, probably the higher capacity of EPC6 cells to capture labeled amino acids reflects an elevated translocation of EAAC1 transporter to membrane surface [36,37] of these cells. Another possibility is that LPC6 have a slower mobilization of EAAC1 to membrane than EPC6 [36,37].

Taken together, our data demonstrate that EPC6 and LPC6 cells differ in their capacity of accumulating intracellular content of [ $^3\text{H}$ ] derived from L- $^3\text{H}$ -Glu and that this difference may be related to a distinct profile of EAAC1 membrane surface expression. Since many research have using C6 lineage as astroglial and glioma model

to investigate parameters related to glutamatergic system, our study is important because it better characterizes some glutamatergic parameters in wild C6 cultures at early and late passages, improving the understanding of future studies relating C6 models to glutamate. Moreover, once the majority of articles that use this lineage as astroglial or glioma model no mention the passage that it is, the comparison of glutamatergic parameters between EPC6 and LPC6 may contribute to better awareness of researchers in identify which model it is been used.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN), FAPERGS and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00.

We would like to acknowledge Elizandra Braganhol for her initial assistance in cultivating C6 glioma cell lineage, Sílvia Terra for assistance in using Flow Cytometer and Professor Renato Dutra Dias for a critical review of the manuscript.

## REFERENCES

1. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161 (839):370-371
2. Ahmed KA, Sawa T, Ihara H, Kasamatsu S, Yoshitake J, Rahaman MM, Okamoto T, Fujii S, Akaike T (2011) Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signaling. *Biochem J*. doi:BJ20111130
3. Zhou J, Li Y, Yan G, Bu Q, Lv L, Yang Y, Zhao J, Shao X, Deng Y, Zhu R, Zhao Y, Cen X (2011) Protective role of taurine against morphine-induced neurotoxicity in C6 cells via inhibition of oxidative stress. *Neurotox Res* 20 (4):334-342. doi:10.1007/s12640-011-9247-x
4. Miller JA, Runkle SA, Tjalkens RB, Philbert MA (2011) 1,3-Dinitrobenzene-induced metabolic impairment through selective inactivation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Toxicol Sci* 122 (2):502-511. doi:kfr102
5. Quintero M, Cabañas ME, Arús C (2010) <sup>13</sup>C-labelling studies indicate compartmentalized synthesis of triacylglycerols in C6 rat glioma cells. *Biochim Biophys Acta* 1801 (7):693-701. doi:S1388-1981(10)00069-7
6. Loureiro SO, Heimfarth L, Reis K, Wild L, Andrade C, Guma FT, Gonçalves CA, Pessoa-Pureur R (2011) Acute ethanol exposure disrupts actin cytoskeleton and generates reactive oxygen species in c6 cells. *Toxicol In Vitro* 25 (1):28-36. doi:S0887-2333(10)00225-0
7. Alaimo A, Gorojod RM, Kotler ML (2011) The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochem Int* 59 (2):297-308. doi:S0197-0186(11)00197-5
8. Grobden B, De Deyn PP, Slegers H (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310 (3):257-270. doi:10.1007/s00441-002-0651-7
9. Barth RF, Kaur B (2009) Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 94 (3):299-312. doi:10.1007/s11060-009-9875-7
10. Mangoura D, Sakellaridis N, Jones J, Vernadakis A (1989) Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res* 14 (10):941-947
11. Vernadakis A, Lee K, Kentroti S, Brodie C (1992) Role of astrocytes in aging: late passage primary mouse brain astrocytes and C-6 glial cells as models. *Prog Brain Res* 94:391-409
12. Parker KK, Norenberg MD, Vernadakis A (1980) "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science* 208 (4440):179-181

13. Lee K, Kentroti S, Billie H, Bruce C, Vernadakis A (1992) Comparative biochemical, morphological, and immunocytochemical studies between C-6 glial cells of early and late passages and advanced passages of glial cells derived from aged mouse cerebral hemispheres. *Glia* 6 (4):245-257. doi:10.1002/glia.440060402
14. Goya L, Feng PT, Aliabadi S, Timiras PS (1996) Effect of growth factors on the in vitro growth and differentiation of early and late passage C6 glioma cells. *Int J Dev Neurosci* 14 (4):409-417. doi:S0736574896000263
15. Braganhol E, Huppes D, Bernardi A, Wink MR, Lenz G, Battastini AM (2009) A comparative study of ectonucleotidase and P2 receptor mRNA profiles in C6 cell line cultures and C6 ex vivo glioma model. *Cell Tissue Res* 335 (2):331-340. doi:10.1007/s00441-008-0723-4
16. Eloqayli H, Melø TM, Haukvik A, Sonnewald U (2011) [2,4-(13)C]β-hydroxybutyrate metabolism in astrocytes and C6 glioblastoma cells. *Neurochem Res* 36 (8):1566-1573. doi:10.1007/s11064-011-0485-3
17. Zhai H, Acharya S, Gravanis I, Mehmood S, Seidman RJ, Shroyer KR, Hajjar KA, Tsirka SE (2011) Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. *J Neurosci* 31 (40):14346-14360. doi:31/40/14346
18. Chen JH, Huang SM, Chen CC, Tsai CF, Yeh WL, Chou SJ, Hsieh WT, Lu DY (2011) Ghrelin induces cell migration through GHS-R, CaMKII, AMPK, and NF-κB signaling pathway in glioma cells. *J Cell Biochem* 112 (10):2931-2941. doi:10.1002/jcb.23209
19. Weyerbrock A, Walbridge S, Saavedra JE, Keefer LK, Oldfield EH (2011) Differential effects of nitric oxide on blood-brain barrier integrity and cerebral blood flow in intracerebral C6 gliomas. *Neuro Oncol* 13 (2):203-211. doi:noq161
20. Kostourou V, Cartwright JE, Johnstone AP, Boulton JK, Cullis ER, Whitley G, Robinson SP (2011) The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *Br J Cancer* 104 (1):83-90. doi:6606034
21. Lu DY, Leung YM, Cheung CW, Chen YR, Wong KL (2010) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration and matrix metalloproteinase-13 expression in glioma cells. *Biochem Pharmacol* 80 (8):1201-1209. doi:S0006-2952(10)00480-6
22. El Sayed SM, Abou El-Magd RM, Shishido Y, Chung SP, Sakai T, Watanabe H, Kagami S, Fukui K (2011) D-amino acid oxidase gene therapy sensitizes glioma cells to the antiglycolytic effect of 3-bromopyruvate. *Cancer Gene Ther*. doi:cgt201159
23. Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R (1981) A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci* 8 (4):325-331
24. Kazazoglou T, Fleischer-Lambropoulos E, Geladopoulos T, Kentroti S, Stefanis C, Vernadakis A (1996) Differential responsiveness of late passage C-6 glial cells and advanced passages of astrocytes derived from aged mouse cerebral hemispheres to

cytokines and growth factors: glutamine synthetase activity. *Neurochem Res* 21 (5):609-614

25. Quincozes-Santos A, Rosa RB, Leipnitz G, de Souza DF, Seminotti B, Wajner M, Gonçalves CA (2010) Induction of S100B secretion in C6 astroglial cells by the major metabolites accumulating in glutaric acidemia type I. *Metab Brain Dis* 25 (2):191-198. doi:10.1007/s11011-010-9203-0

26. Yasuda K, Itakura M, Aoyagi K, Sugaya T, Nagata E, Ihara H, Takahashi M (2011) PKC-dependent inhibition of CA<sup>2+</sup>-dependent exocytosis from astrocytes. *Glia* 59 (1):143-151. doi:10.1002/glia.21083

27. Tsuchioka M, Hisaoka K, Yano R, Shibasaki C, Kajiatani N, Takebayashi M (2011) Riluzole-induced glial cell line-derived neurotrophic factor production is regulated through fibroblast growth factor receptor signaling in rat C6 glioma cells. *Brain Res* 1384:1-8. doi:S0006-8993(11)00231-9

28. Quincozes-Santos A, Andreazza AC, Gonçalves CA, Gottfried C (2010) Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells. *Toxicol In Vitro* 24 (3):916-920. doi:S0887-2333(09)00345-2

29. Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Kimoto N, Kikkawa Y, Takeshima M, Miyoshi K, Murata M (2010) Neuroprotective effects of zonisamide target astrocyte. *Ann Neurol* 67 (2):239-249. doi:10.1002/ana.21885

30. Nardin P, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, Tortorelli LS, Lunardi P, Klein PR, Wartchow KM, Bobermin LD, Gottfried C, Elisabetsky E, Gonçalves CA (2011) In vitro S100B secretion is reduced by apomorphine: effects of antipsychotics and antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35 (5):1291-1296. doi:S0278-5846(11)00119-9

31. Ye ZC, Sontheimer H (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59 (17):4383-4391

32. de Groot J, Sontheimer H (2011) Glutamate and the biology of gliomas. *Glia* 59 (8):1181-1189. doi:10.1002/glia.21113

33. Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* 7 (9):1010-1015. doi:nm0901-1010

34. Castillo CA, León DA, Ballesteros-Yáñez I, Iglesias I, Martín M, Albasanz JL (2010) Glutamate differently modulates metabotropic glutamate receptors in neuronal and glial cells. *Neurochem Res* 35 (7):1050-1063. doi:10.1007/s11064-010-0154-y

35. Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB (1998) Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci* 18 (7):2475-2485

36. González MI, Susarla BT, Fournier KM, Sheldon AL, Robinson MB (2007) Constitutive endocytosis and recycling of the neuronal glutamate transporter, excitatory amino acid carrier 1. *J Neurochem* 103 (5):1917-1931. doi:JNC4881
37. Sheldon AL, González MI, Krizman-Genda EN, Susarla BT, Robinson MB (2008) Ubiquitination-mediated internalization and degradation of the astroglial glutamate transporter, GLT-1. *Neurochem Int* 53 (6-8):296-308. doi:S0197-0186(08)00126-5
38. Vanhoutte N, Hermans E (2008) Glutamate-induced glioma cell proliferation is prevented by functional expression of the glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett* 582 (13):1847-1852. doi:S0014-5793(08)00386-4
39. Vanhoutte N, Abarca-Quinones J, Jordan BF, Gallez B, Maloteaux JM, Hermans E (2009) Enhanced expression of the high affinity glutamate transporter GLT-1 in C6 glioma cells delays tumour progression in rat. *Exp Neurol* 218 (1):56-63. doi:S0014-4886(09)00139-3
40. Waagepetersen HS, Shimamoto K, Schousboe A (2001) Comparison of effects of DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) and L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-2,4-PDC) on uptake and release of [3h]D-aspartate in astrocytes and glutamatergic neurons. *Neurochem Res* 26 (6):661-666
41. Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83 (2):346-356
42. Petitto CK, Chung MC, Verkhovsky LM, Cooper AJ (1992) Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 569 (2):275-280. doi:0006-8993(92)90639-Q
43. Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65 (1):1-105. doi:S0301-0082(00)00067-8
44. Palos TP, Zheng S, Howard BD (1999) Wnt signaling induces GLT-1 expression in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* 73 (3):1012-1023
45. Dowd LA, Coyle AJ, Rothstein JD, Pritchett DB, Robinson MB (1996) Comparison of Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport activity in synaptosomes, C6 glioma, and *Xenopus* oocytes expressing excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Mol Pharmacol* 49 (3):465-473
46. McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85 (15):3347-3358. doi:10.1002/jnr.21444



## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1** – Representative pictures of morphological differences between EPC6 (**A**) and LPC6 (**B**) in culture.

**Fig. 2** - Intracellular content of [<sup>3</sup>H] derived from L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake in EPC6 and LPC6. L-[<sup>3</sup>H]-Glu uptake assay was performed incubating cells in 100 μM of unlabeled L-Glu plus 0.35 μCi.mL<sup>-1</sup> L-[<sup>3</sup>H]-Glu during 5-180 min. Data were expressed as mean ± SEM. \* = p<0.001 (Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test). n=4-13 experiments performed in triplicate.

**Fig. 3** – Percentage of cells that incorporate PI in EPC6 (**A**) and LPC6 (**B**) cultures after 5-180 min of incubation in 100 μM of unlabeled L-Glu. Data were expressed as mean ± SD. n=3 independent experiments. ■ Control without PI; ■ Control with PI; ■ Glutamate with PI

**Fig. 4** - Glutamate transporters expression in EPC6 (EP) and LPC6 (LP) after 5-180 min of incubation in 100 μM of unlabeled L-Glu. GLAST (**A**), GLT 1 (**B**) and EAAC1 (**C**) total expression. (**D**) Quantification of EAAC1 total expression. Data expressed as mean ± SD. n=4-10 independent experiments.

**Fig. 5** - D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived intracellular content of [<sup>3</sup>H] in EPC6 and LPC6. D-[<sup>3</sup>H]-Asp uptake assay was performed incubating cells in 100 μM of unlabeled D-Asp plus 0.49 μCi.mL<sup>-1</sup> D-[<sup>3</sup>H]-Asp during 60-180 min. Data were expressed as mean ± SEM. \* = p<0.05 (Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test). n=4-13 experiments performed in triplicate.

**Fig. 6** – Release of intracellular content of [<sup>3</sup>H] derived from L-[<sup>3</sup>H]-Glu or D-[<sup>3</sup>H]-Asp. Cultures captured L-[<sup>3</sup>H]-Glu or D-[<sup>3</sup>H]-Asp plus unlabeled 100 μM of L-Glu or D-Asp, respectively, during 60 min. After, cells were washed and re-incubated during 60 min only with 100 μM of unlabeled L-Glu or D-Asp. Intracellular radioactivity and radioactive from extracellular HBSS were quantified by scintillation. (**A**) L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular and extracellular content of [<sup>3</sup>H]. (**B**) L-[<sup>3</sup>H]-Glu-derived intracellular and extracellular content of [<sup>3</sup>H] after treatment with TBOA. (**C**) D-[<sup>3</sup>H]-Asp-derived intracellular and extracellular content of [<sup>3</sup>H]. Data were expressed as

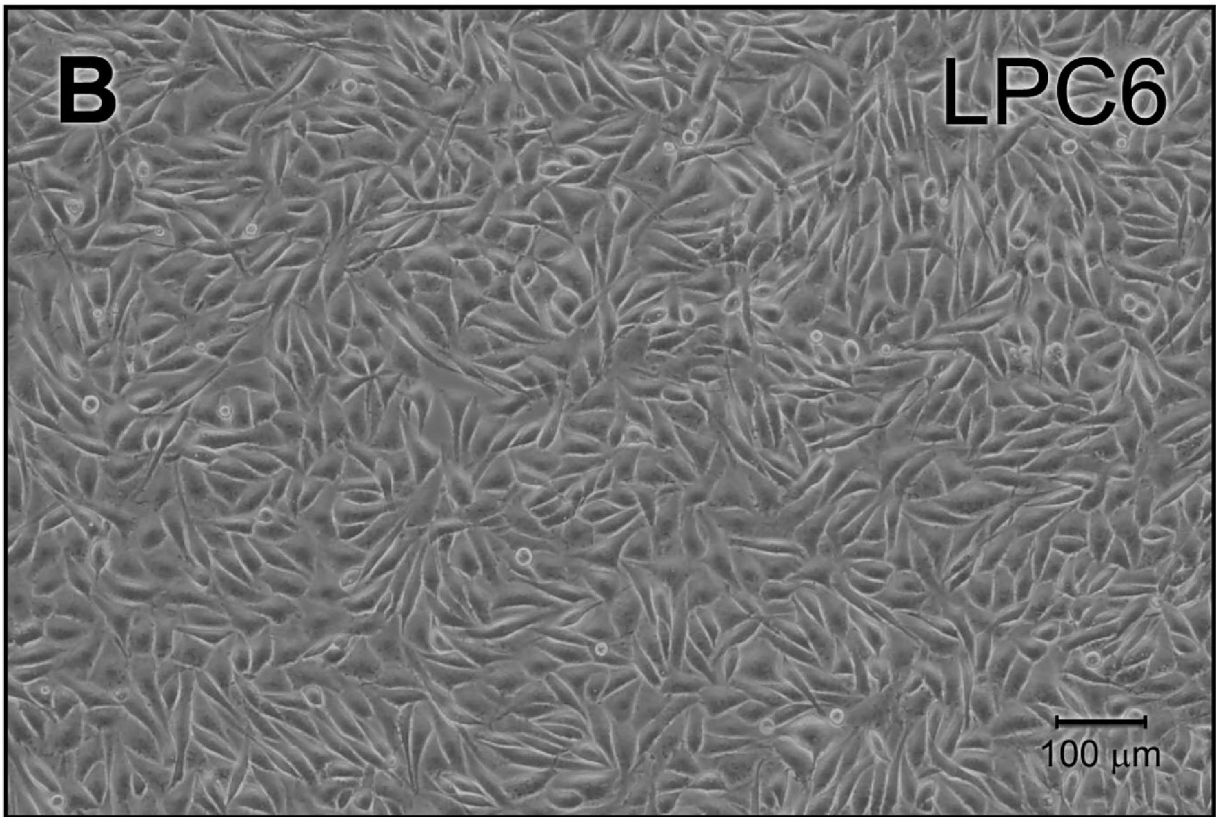
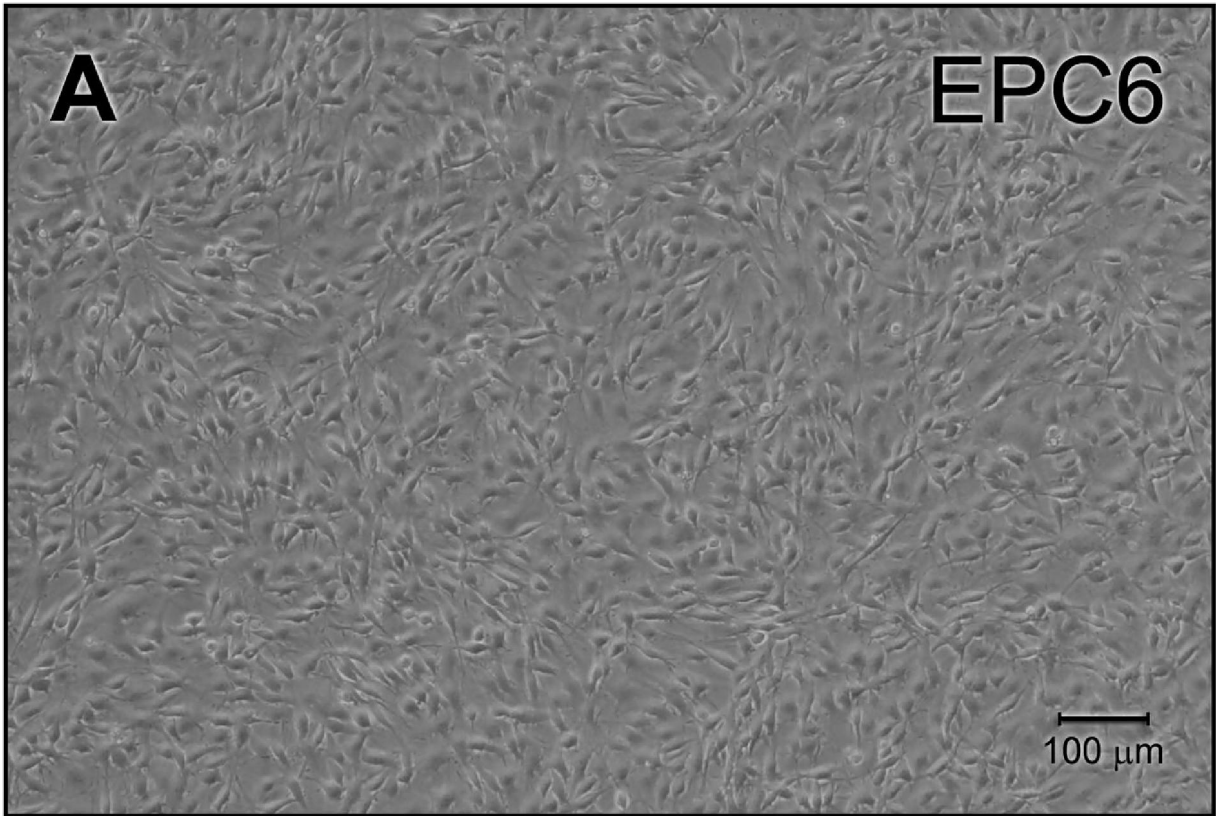
mean  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0.05$  and \*\* =  $p < 0.001$  (Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test). n=3-8 experiments performed in triplicate.

**Fig. 7** – EACC1 inhibition by PDC and TBOA in EPC6 and LPC6 assessed after 120 min of L-[ $^3$ H]-Glu (**A**) and D-[ $^3$ H]-Asp uptake assay (**B**). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0.01$  and \*\* =  $p < 0.001$ ; *a* and *b* indicate difference with respective control groups (Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test). n=3-8 experiments performed in triplicate.

**Fig. 8** – Glutamine sintetase activity in EPC6 and LPC6. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. n=4 experiments performed in triplicate.

**Supplementary Fig. 1** – Dot Plot of PI incorporation in EPC6 (**A**) and LPC6 (**B**) cultures after 5-180 min of incubation in 100  $\mu$ M of unlabeled L-Glu. Data were expressed as mean  $\pm$  SD. n=3 independent experiments.

**Supplementary Fig. 2** – Comparison between L-[ $^3$ H]-Glu and D-[ $^3$ H]-Asp derived intracellular content of [ $^3$ H] in EPC6 and LPC6. (**A**) L-[ $^3$ H]-Glu-derived intracellular content of [ $^3$ H] was lower in EPC6 at 120 min ( $77.04 \pm 7.08$  nmol/mg protein; n=7;  $P < 0.001$ , two-way ANOVA) and 180 min ( $85.93 \pm 6.78$  nmol/mg protein; n=5;  $P < 0.001$ , two-way ANOVA) when compared to D-[ $^3$ H]-Asp-derived intracellular content of [ $^3$ H] ( $117.05 \pm 7.43$  nmol/mg protein, n=8;  $165.54 \pm 12.23$  nmol/mg protein, n=5; respectively). (**B**) This profile of L-[ $^3$ H]-Glu-derived intracellular content of [ $^3$ H] was similar in LPC6 in both 120 min ( $34.36 \pm 3.38$  nmol/mg protein; n=7;  $P < 0.001$ , two-way ANOVA) and 180 min ( $36.55 \pm 2.36$  nmol/mg protein; n=5;  $P < 0.001$ , two-way ANOVA) when compared to D-[ $^3$ H]-Asp-derived intracellular content of [ $^3$ H]. ( $81.42 \pm 10.50$  nmol/mg protein, n=8;  $149.70 \pm 19.22$  nmol/mg protein, n=4; respectively).



**Fig. 1**

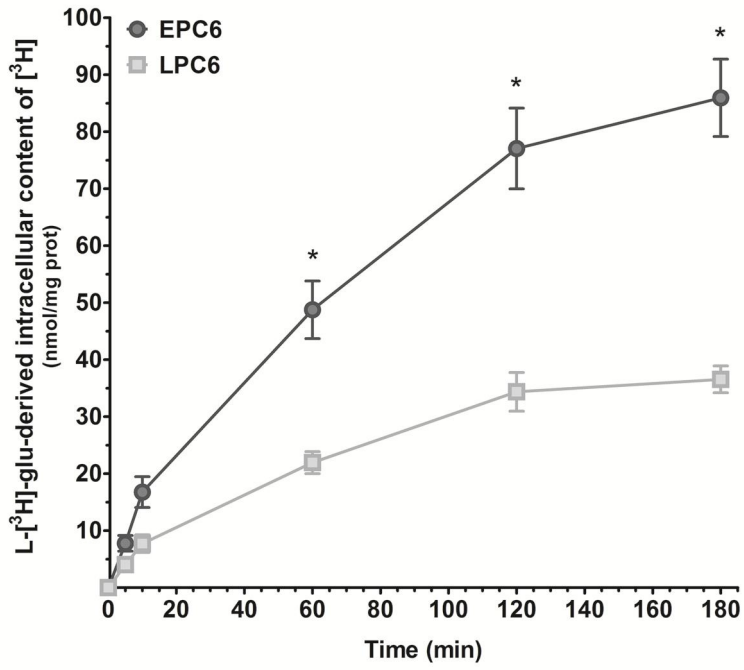
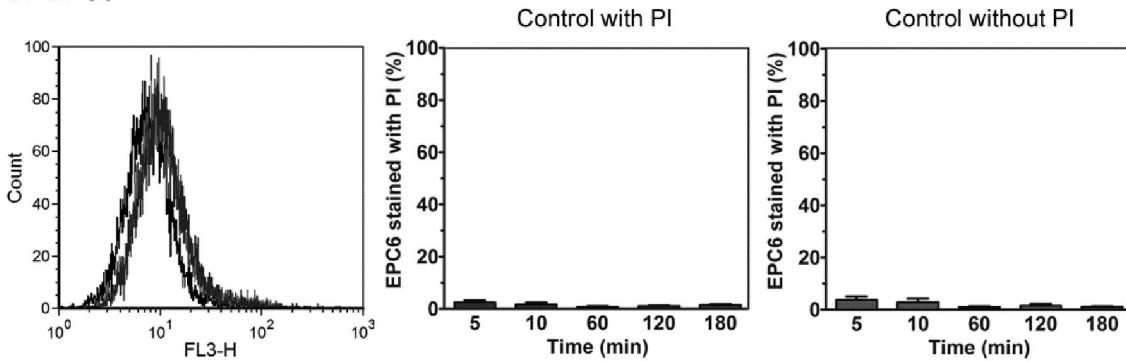


Fig. 2

A EPC6



B LPC6

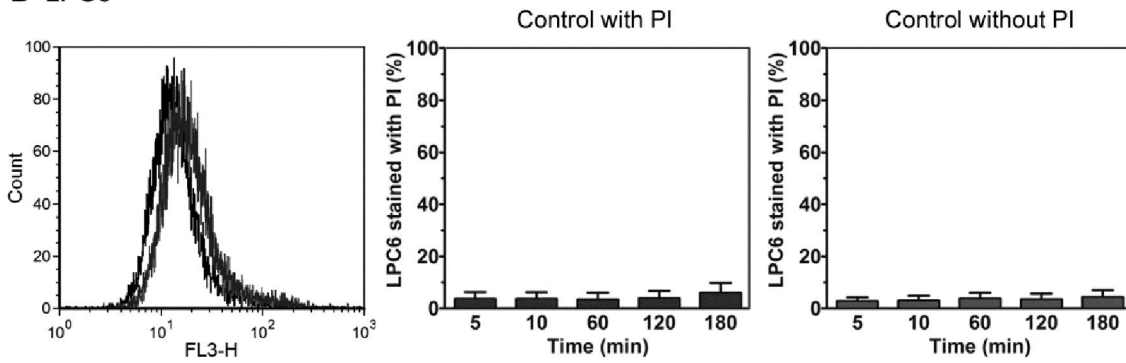


Fig. 3

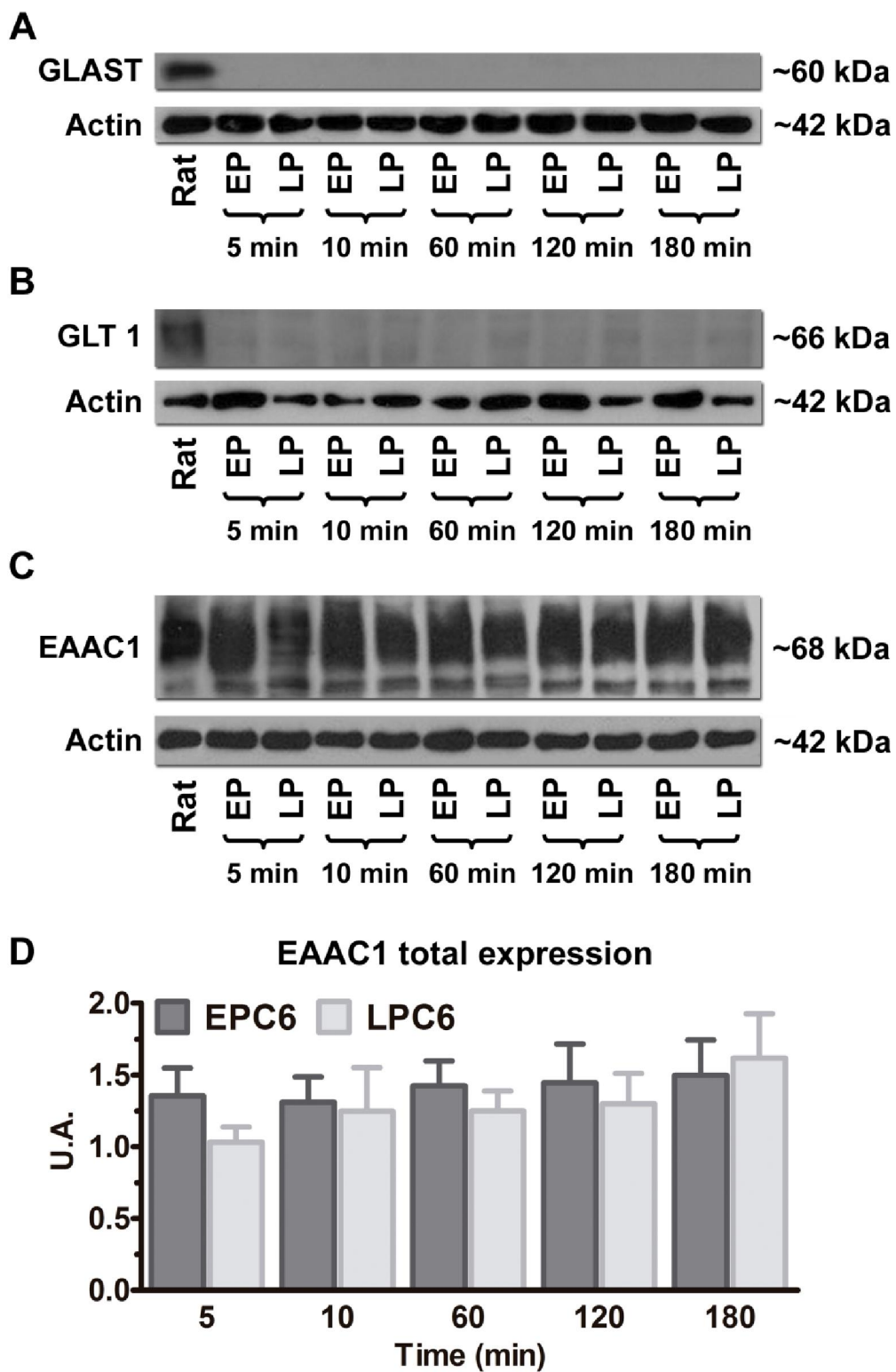
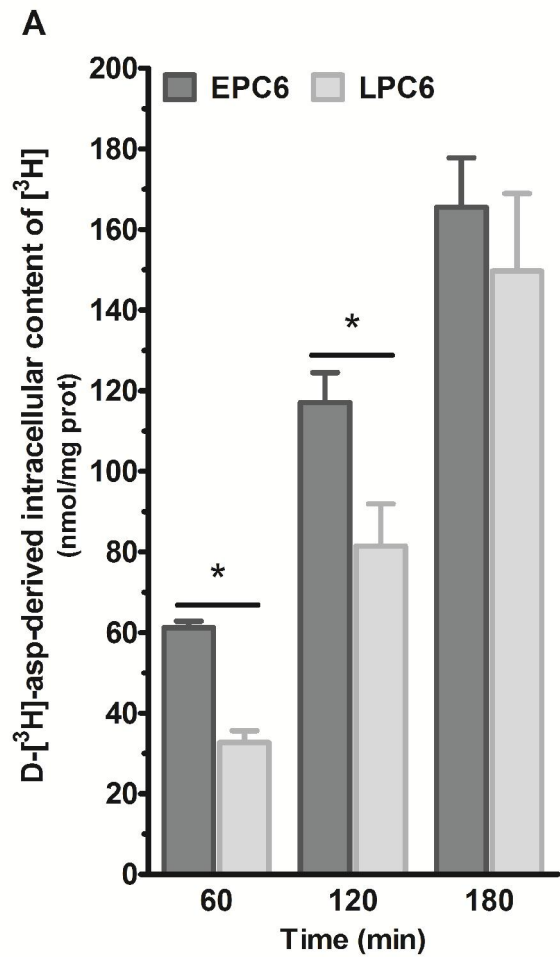
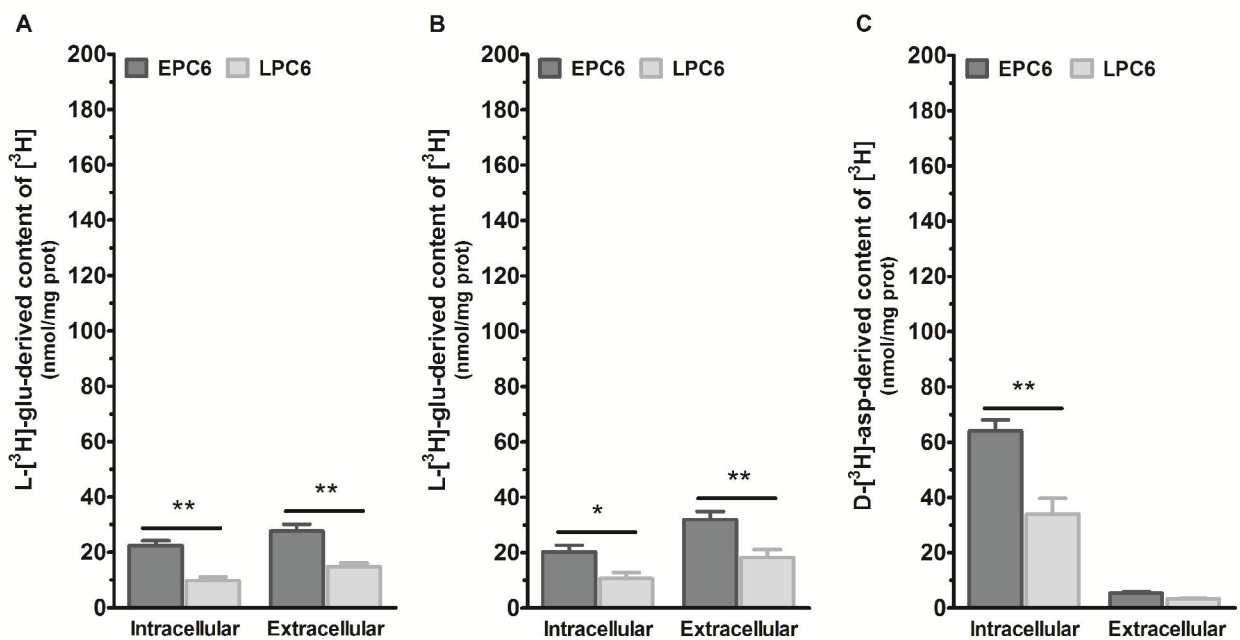


Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig. 6**

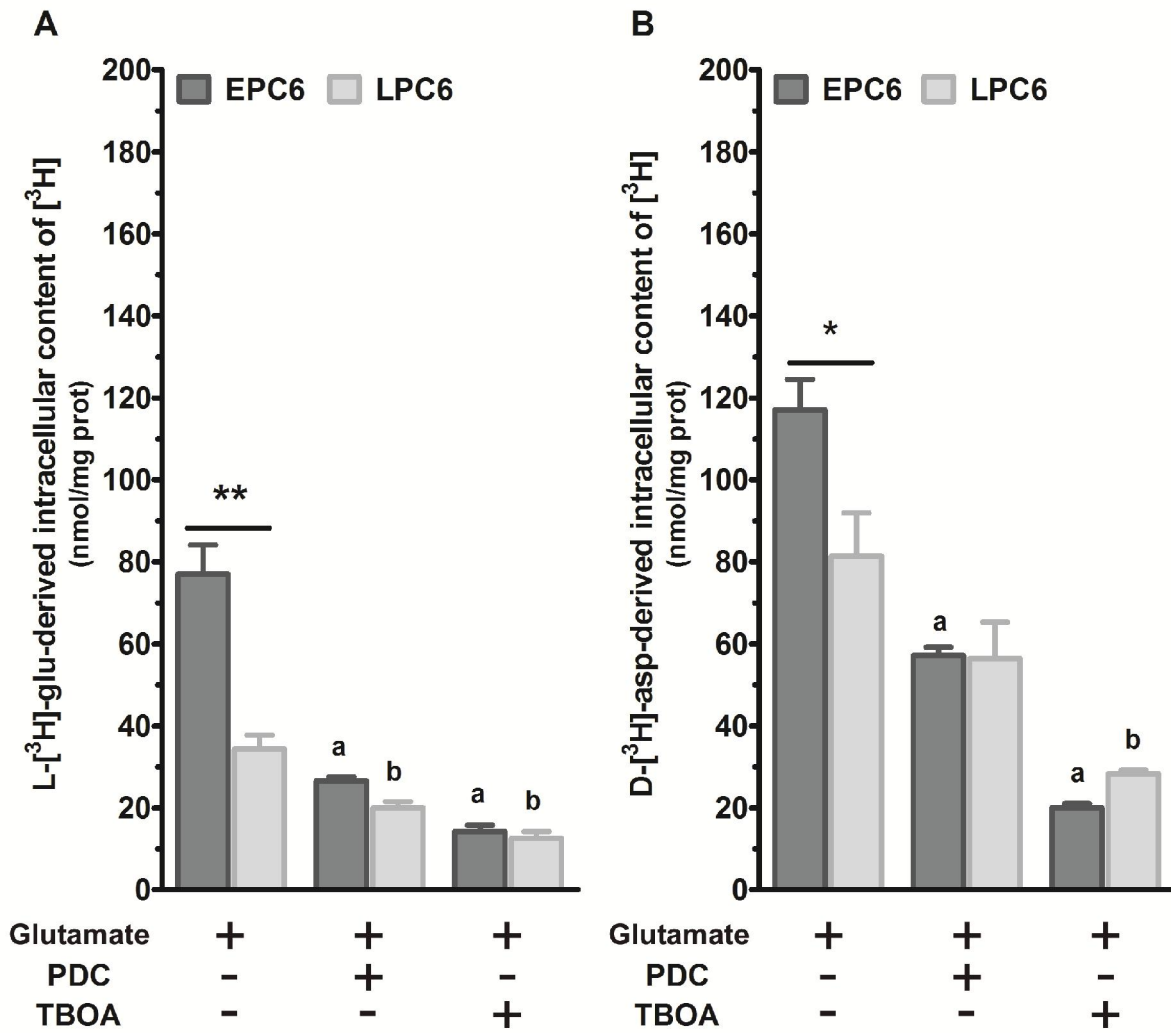


Fig. 7

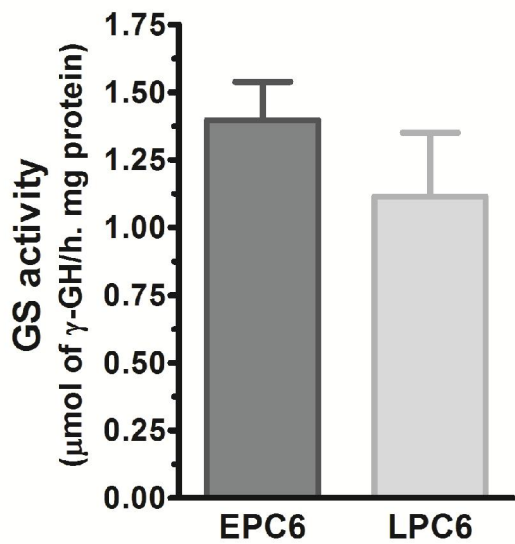
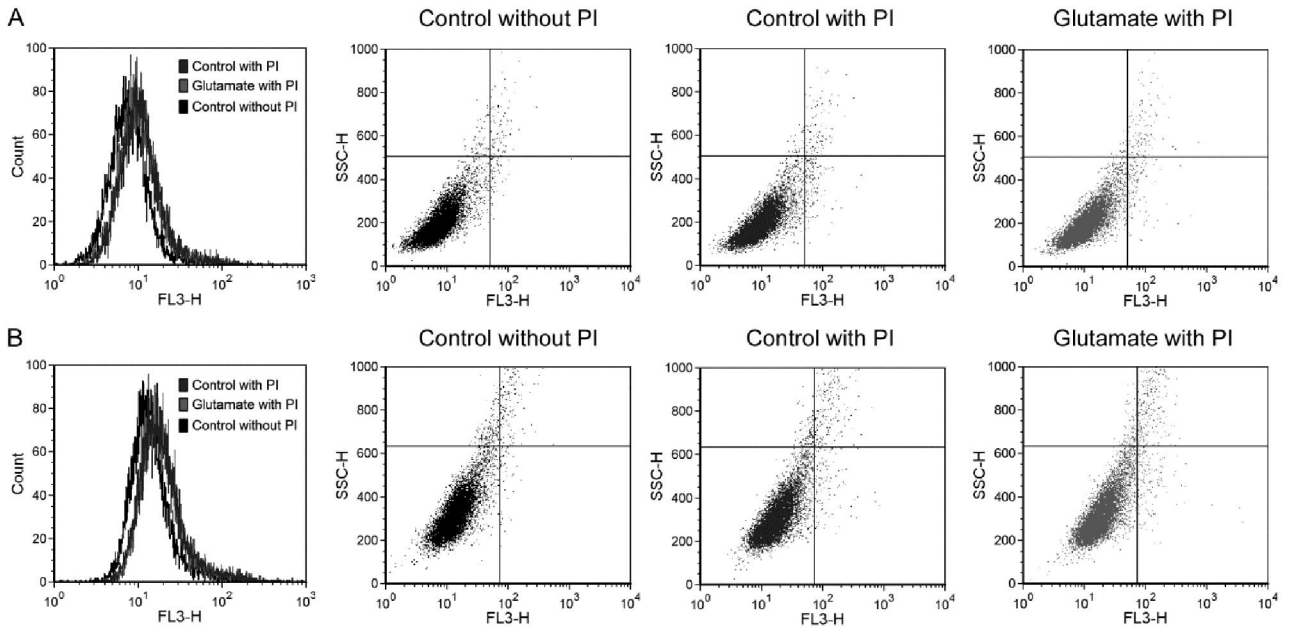
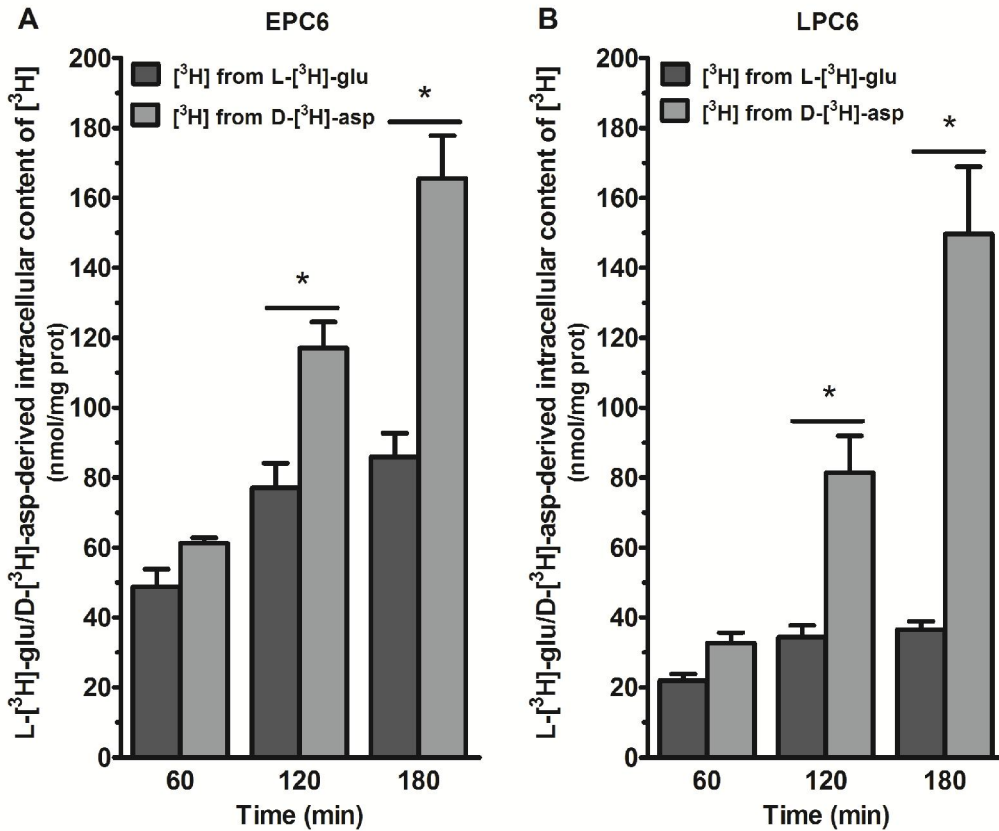


Fig. 8



**Supplementary Fig. 1**



**Supplementary Fig. 2**



---

**Parte III**  
**DISCUSSÃO**

---

A linhagem C6 tem sido amplamente utilizada como modelo de investigação de diversos aspectos da biologia celular. Entretanto, dependendo do número de passagens em cultura, esta linhagem apresenta variações nas suas características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (Parker *et al.*, 1980; Mangoura *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Goya *et al.*, 1996). As células da linhagem C6 de passagens recentes (PRC6) são mais delgadas e menores em relação às passagens tardias (PTC6) (Parker *et al.*, 1980), conforme observado na **Fig. 1**. Vários estudos demonstraram que as PRC6 são mais glioblásticas e menos diferenciadas, assemelhando-se a glioblastomas, quando comparadas com as PTC6, as quais são mais diferenciadas e assemelham-se a astrócitos maduros (Parker *et al.*, 1980; Mangoura *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Goya *et al.*, 1996). Além disso, após seis dias de cultivo, as PRC6 apresentam metade da atividade da enzima glutamina sintetase quando comparadas às PTC6, cuja atividade é similar àquela observada em astrócitos (Parker *et al.*, 1980). Devido às características expostas acima, diversos autores têm utilizado culturas de PRC6 como modelo de estudo da biologia de gliomas (Grobben *et al.*, 2002; Barth & Kaur, 2009), enquanto que as culturas de PTC6 vêm sendo empregadas como modelo para investigações de diversos parâmetros relacionados a astrogliã madura, como por exemplo, a captação de glutamato (Mangoura *et al.*, 1989; Kazazoglou *et al.*, 1996; Quincozes-Santos *et al.*, 2010b). No entanto, até o presente momento, não há relatos na literatura descrevendo o perfil de culturas da linhagem C6 com relação a parâmetros do sistema glutamatérgico.

As culturas PRC6 e PTC6 apresentaram um aumento dependente do tempo no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu, o qual atingiu o platô aos 120 minutos de incubação (**Fig. 2**). Além disso, as PRC6 apresentaram um conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] 55% maior em relação às PTC6 (**Fig. 2**). Os menores níveis de [<sup>3</sup>H] intracelular observados nas culturas de passagens tardias poderiam estar relacionados a

uma maior permeabilidade da membrana plasmática. Através da incubação com iodeto de propídio e sua quantificação por citometria de fluxo, não se observou alterações significativas na permeabilidade e integridade de membrana entre as culturas PRC6 e PTC6 (**Fig. 3 e Fig. 1 suplementar**). Este resultado indica que a diferença no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu não se deve ao seu maior efluxo do meio intracelular para meio extracelular devido a uma perda na integridade da membrana plasmática.

O imunoc conteúdo dos transportadores de glutamato Na<sup>+</sup> dependentes foi avaliado através da técnica de Western Blot para verificar se o perfil de conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] em PRC6 e PTC6 está relacionado a uma diferença na quantidade expressa desses transportadores. Em ambas as culturas foi imunodetectado somente o transportador EAAC1 e não GLAST e GLT-1 (**Fig. 4**), confirmando dados prévios da literatura obtidos com a mesma técnica (Dowd *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1998) e com RT-PCR (Palos *et al.*, 1999). Como tanto PRC6 e PTC6 apresentaram os mesmos níveis de imunoc conteúdo de EAAC1 em todos os tempos de incubação com glutamato (**Fig. 4**), podemos concluir que a diferença no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu não ocorre por diferenças na expressão total de EAAC1.

Apesar de o glutamato ser captado principalmente por transportadores Na<sup>+</sup> dependentes de alta afinidade (Danbolt, 2001), outros sistemas de transporte de baixa afinidade já foram descritos (Danbolt, 2001; de Groot & Sontheimer, 2011), os quais poderiam estar relacionados à diferença na captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu. Com o intuito de verificar se outros sistemas de transporte estariam contribuindo para o maior acúmulo de [<sup>3</sup>H] intracelular derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu nas células PRC6, as culturas foram incubadas na presença ou ausência de PDC ou TBOA, inibidores específicos de

transportadores de glutamato  $\text{Na}^+$  dependentes de alta afinidade (Waagepetersen *et al.*, 2001). O tratamento com os inibidores reduziu de forma similar a captação de L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu em ambas as culturas (**Fig. 7A**). Esta redução é semelhante à observada em culturas de astrócitos e fatias de hipocampo (Waagepetersen *et al.*, 2001). Portanto, este resultado indica que a captação de L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu nas culturas de C6 de passagens recente e tardia ocorre principalmente via transportadores  $\text{Na}^+$  dependentes de alta afinidade (**Fig. 4C**).

Para verificar se a menor capacidade da PTC6 em manter seu conteúdo intracelular de [ $^3\text{H}$ ] proveniente da captação de L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu estaria relacionada à sua maior liberação, foi realizado um protocolo de liberação da radioatividade. Em ambas as culturas de C6, 50% da radioatividade incorporada na forma de L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu foi liberada para o meio extracelular (**Fig. 6A**), indicando que ambas as células apresentam a mesma capacidade de liberar a radioatividade intracelular derivada da captação de L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu. Além disso, visto que metade do [ $^3\text{H}$ ] captado na forma de L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu é liberado para o meio extracelular em ambas as culturas, é provável que ocorra a formação de um estado de equilíbrio, ou estado estacionário, entre captação e liberação. Este equilíbrio pode estar relacionado com o estabelecimento do platô de conteúdo intracelular de [ $^3\text{H}$ ] observado em ambas as culturas após os 120 minutos de incubação com o L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu (**Fig 2**). Para investigar se a liberação de L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu ocorre via reversão do transporte  $\text{Na}^+$  dependente de alta afinidade, ambas as culturas foram tratadas com TBOA, um inibidor não transportável da captação de glutamato (Waagepetersen *et al.*, 2001). O inibidor não teve efeito sobre o perfil de liberação de radioatividade intracelular proveniente da captação de L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu (**Fig. 6B**). Estes resultados podem indicar que outro metabólito marcando com [ $^3\text{H}$ ] está sendo liberado ao invés do próprio L-[ $^3\text{H}$ ]-Glu.

Além do seu papel como neurotransmissor em muitos tipos celulares, o glutamato apresenta um importante papel como metabólito (McKenna, 2007). Para verificar se a metabolização do L-[<sup>3</sup>H]-Glu estaria influenciando no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] proveniente da captação, ambas as culturas foram incubadas com D-[<sup>3</sup>H]-Asp, um análogo não-metabolizável do L-[<sup>3</sup>H]-Glu (Waagepetersen *et al.*, 2001). Tanto PRC6 quanto as PTC6 apresentaram um aumento dependente do tempo no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] proveniente da captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp, não atingindo um platô até 180 minutos de incubação (**Fig. 5**). Cabe salientar que a captação deste aminoácido marcado ocorreu principalmente via EAAC1, visto que o bloqueio dos transportadores Na<sup>+</sup> dependentes de alta afinidade por PDC e TBOA reduziu a captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp em ambas as culturas aos mesmos níveis já observados na literatura usando-se culturas de astrócitos e fatias de hipocampo (Waagepetersen *et al.*, 2001) (**Fig. 7B**). A radioatividade intracelular derivada da captação do D-[<sup>3</sup>H]-Asp foi maior tanto em PRC6 quanto em PTC6 a partir de 120 minutos de incubação quando comparadas com a radioatividade intracelular proveniente da captação do L-[<sup>3</sup>H]-Glu (**Fig. 2 suplementar**). A não ocorrência de um platô sugere um acúmulo intracelular de D-[<sup>3</sup>H]-Asp, o qual pode estar relacionado à sua não metabolização e/ou sua não liberação para o meio extracelular.

Com objetivo de investigar se o [<sup>3</sup>H] derivado do D-[<sup>3</sup>H]-Asp poderia ser liberado para o meio extracelular, foi realizado um protocolo de liberação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp similar àquele utilizado para o L-[<sup>3</sup>H]-Glu. Apenas 10% do [<sup>3</sup>H] derivado da captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp é liberado para o meio extracelular após 2h de incubação em ambas as culturas (**Fig. 6C**), indicando que o acúmulo intracelular deste aminoácido deve-se a sua liberação diminuída. Além disso, estes resultados reforçam a idéia de que o que está sendo liberado para o meio extracelular após a captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu não é

o próprio aminoácido, mas sim um derivado metabólico marcado com [<sup>3</sup>H]. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de um envolvimento de outra via de liberação deste aminoácido.

A atividade da glutamina sintetase (GS) foi muito bem caracterizada na literatura tanto nas PRC6 quanto nas PTC6 (Parker *et al.*, 1980). Ambas as culturas apresentaram o mesmo nível de atividade da GS (**Fig. 8**), o que está de acordo com a literatura (Parker *et al.*, 1980). Este resultado sugere que a atividade da GS não está interferindo nos níveis intracelulares de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu em PRC6 e PTC6.

Embora os resultados até agora apresentados indiquem que o L-[<sup>3</sup>H]-Glu está sendo metabolizado durante o período de incubação com L-[<sup>3</sup>H]-Glu, eles não explicam os menores níveis intracelulares de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu em PTC6 quando comparadas com as PRC6. O aumento no conteúdo intracelular de [<sup>3</sup>H] derivado da captação de D-[<sup>3</sup>H]-Asp aos 60 e 120 minutos nas PRC6 quando comparadas às PTC6 (**Fig 5**) poderia sugerir que as PRC6 possuem uma maior capacidade de transporte tanto de L-[<sup>3</sup>H]-Glu como de D-[<sup>3</sup>H]-Asp quando comparadas às PTC6. Na literatura, é sabido que existe um *pool* intracelular relativamente grande de EAAC1 *in vivo* e *in vitro* e que ele pode ser mobilizado para a membrana plasmática celular ou ser internalizado novamente (González *et al.*, 2007; Sheldon *et al.*, 2008). Apesar de não termos observado diferenças no imunoc conteúdo total do transportador EAAC1 entre PRC6 e PTC6 (**Fig. 4**), é possível que a maior capacidade das PRC6 em captar os aminoácidos marcados possa estar relacionada a uma elevada translocação destes transportadores para a superfície da membrana plasmática dessas células (González *et al.*, 2007; Sheldon *et al.*, 2008). Outra possibilidade seria que as PTC6

tivessem uma mobilização lenta de EAAC1 para a membrana quando comparada à PRC6 (González *et al.*, 2007; Sheldon *et al.*, 2008).

---

**Parte IV**  
**CONCLUSÕES**

---



Este trabalho demonstrou que as passagens recentes e tardias da linhagem C6 diferem na sua capacidade de acumular intracelularmente o [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu. A caracterização de alguns parâmetros glutamatérgicos nestas culturas, as quais são muito utilizadas como modelo de gliomas e de astrócitos, respectivamente, contribui para um melhor entendimento de trabalhos futuros cujo objetivo seja avaliar o sistema glutamatérgico nestes modelos. Além disso, a comparação de parâmetros glutamatérgicos entre passagens recentes e tardias da linhagem C6 pode contribuir para a necessidade de se identificar corretamente nos trabalhos científicos qual passagem está sendo utilizada, possibilitando aos pesquisadores e leitores uma melhor compreensão dos resultados descritos.

---

**Parte V**  
**PERSPECTIVAS**

---

Avaliar os mecanismos celulares e neuroquímicos envolvidos na maior capacidade de linhagem C6 de baixa passagem de acumular o [<sup>3</sup>H] derivado da captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu através da realização do protocolo de captação de L-[<sup>3</sup>H]-Glu após a incubação de ambas as culturas em phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), o qual induz o translocamento de EAAC1 para a membrana celular (González *et al.*, 2007; Sheldon *et al.*, 2008)

Realizar estudos de interação de linhagens de glioma (U-87 MG, U-138 MG, STTG-1 e C6) e neurônios objetivando investigar as vias de sinalização celular envolvidas na morte neuronal através da:

- caracterização dos níveis de captação e liberação de glutamato, expressão de transportadores de glutamato Na<sup>+</sup>-dependentes, expressão do trocador de cistina/glutamato e a atividade deste trocador *in vitro* nas culturas de glioma humano e de rato quando cultivadas isoladas ou em co-cultivo com neurônios corticais.
- quantificação e caracterização dos processos de morte neuronal (apoptose e necrose) em co-culturas de linhagens de gliomas e neurônios corticais.
- avaliação do envolvimento de NMDARs extrassinápticos nos processos de morte neuronal em co-culturas de linhagens de gliomas e neurônios corticais.
- caracterização dos níveis de captação e liberação de glutamato, expressão de transportadores de glutamato Na<sup>+</sup>-dependentes, expressão do trocador de cistina/glutamato e a atividade deste trocador em fatias cerebrais de ratos implantados com a linhagem de glioma C6.
- avaliação do efeito da administração de antagonistas de NMDARs extrassinápticos sobre o crescimento e a invasibilidade tumoral em ratos implantados com a linhagem C6.

---

**Parte VI**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Ahmed, K.A., Sawa, T., Ihara, H., Kasamatsu, S., Yoshitake, J., Rahaman, M.M., Okamoto, T., Fujii, S. & Akaike, T. (2011) Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signaling. *Biochem J*.
- Alaimo, A., Gorojod, R.M. & Kotler, M.L. (2011) The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochem Int*, **59**, 297-308.
- Anderson, C.M. & Swanson, R.A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, **32**, 1-14.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P. & Amara, S.G. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4155-4160.
- Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Kimoto, N., Kikkawa, Y., Takeshima, M., Miyoshi, K. & Murata, M. (2010) Neuroprotective effects of zonisamide target astrocyte. *Ann Neurol*, **67**, 239-249.
- Auer, R.N., Del Maestro, R.F. & Anderson, R. (1981) A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci*, **8**, 325-331.
- Balcar, V.J. & Li, Y. (1992) Heterogeneity of high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate in the mammalian central nervous system. *Life Sci*, **51**, 1467-1478.
- Barth, R.F. & Kaur, B. (2009) Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol*, **94**, 299-312.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. & Sweet, W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, **161**, 370-371.
- Braganhol, E., Hupples, D., Bernardi, A., Wink, M.R., Lenz, G. & Battastini, A.M. (2009) A comparative study of ectonucleotidase and P2 receptor mRNA profiles in C6 cell line cultures and C6 ex vivo glioma model. *Cell Tissue Res*, **335**, 331-340.
- Burger, P.C., Heinz, E.R., Shibata, T. & Kleihues, P. (1988) Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, **68**, 698-704.
- Castillo, C.A., León, D.A., Ballesteros-Yáñez, I., Iglesias, I., Martín, M. & Albasanz, J.L. (2010) Glutamate differently modulates metabotropic glutamate receptors in neuronal and glial cells. *Neurochem Res*, **35**, 1050-1063.
- Chen, J.H., Huang, S.M., Chen, C.C., Tsai, C.F., Yeh, W.L., Chou, S.J., Hsieh, W.T. & Lu, D.Y. (2011) Ghrelin induces cell migration through GHS-R, CaMKII, AMPK, and NF- $\kappa$ B signaling pathway in glioma cells. *J Cell Biochem*, **112**, 2931-2941.

- Choi, D.W. (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*, **23**, 1261-1276.
- Collingridge, G.L. & Lester, R.A. (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev*, **41**, 143-210.
- Dai, C. & Holland, E.C. (2001) Glioma models. *Biochim Biophys Acta*, **1551**, M19-27.
- Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, **65**, 1-105.
- Davis, K.E., Straff, D.J., Weinstein, E.A., Bannerman, P.G., Correale, D.M., Rothstein, J.D. & Robinson, M.B. (1998) Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci*, **18**, 2475-2485.
- de Groot, J. & Sontheimer, H. (2011) Glutamate and the biology of gliomas. *Glia*, **59**, 1181-1189.
- DeAngelis, L.M. (2001) Brain tumors. *N Engl J Med*, **344**, 114-123.
- Dehnes, Y., Chaudhry, F.A., Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J. & Danbolt, N.C. (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci*, **18**, 3606-3619.
- Dohrmann, G.J., Farwell, J.R. & Flannery, J.T. (1976) Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg*, **44**, 442-448.
- Dowd, L.A., Coyle, A.J., Rothstein, J.D., Pritchett, D.B. & Robinson, M.B. (1996) Comparison of Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport activity in synaptosomes, C6 glioma, and *Xenopus* oocytes expressing excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Mol Pharmacol*, **49**, 465-473.
- Durand, G.M., Kovalchuk, Y. & Konnerth, A. (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature*, **381**, 71-75.
- El Sayed, S.M., Abou El-Magd, R.M., Shishido, Y., Chung, S.P., Sakai, T., Watanabe, H., Kagami, S. & Fukui, K. (2011) D-amino acid oxidase gene therapy sensitizes glioma cells to the antiglycolytic effect of 3-bromopyruvate. *Cancer Gene Ther*.
- Eloqayli, H., Melø, T.M., Haukvik, A. & Sonnewald, U. (2011) [2,4-(13)C]β-hydroxybutyrate metabolism in astrocytes and C6 glioblastoma cells. *Neurochem Res*, **36**, 1566-1573.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P. & Amara, S.G. (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, **375**, 599-603.
- Flowers, A. (2000) Brain tumors in the older person. *Cancer Control*, **7**, 523-538.

- Fonnum, F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*, **42**, 1-11.
- Furuta, A., Rothstein, J.D. & Martin, L.J. (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci*, **17**, 8363-8375.
- Gegelashvili, G. & Schousboe, A. (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull*, **45**, 233-238.
- Gether, U., Andersen, P.H., Larsson, O.M. & Schousboe, A. (2006) Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 375-383.
- González, M.I., Susarla, B.T., Fournier, K.M., Sheldon, A.L. & Robinson, M.B. (2007) Constitutive endocytosis and recycling of the neuronal glutamate transporter, excitatory amino acid carrier 1. *J Neurochem*, **103**, 1917-1931.
- Goya, L., Feng, P.T., Aliabadi, S. & Timiras, P.S. (1996) Effect of growth factors on the in vitro growth and differentiation of early and late passage C6 glioma cells. *Int J Dev Neurosci*, **14**, 409-417.
- Grobben, B., De Deyn, P.P. & Slegers, H. (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*, **310**, 257-270.
- Hamel, W. & Westphal, M. (2000) Growth factors in gliomas revisited. *Acta Neurochir (Wien)*, **142**, 113-137; discussion 137-118.
- Hanse, E., Durand, G.M., Garaschuk, O. & Konnerth, A. (1997) Activity-dependent wiring of the developing hippocampal neuronal circuit. *Semin Cell Dev Biol*, **8**, 35-42.
- Headley, P.M. & Grillner, S. (1990) Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 205-211.
- Hu, W.H., Walters, W.M., Xia, X.M., Karmally, S.A. & Bethea, J.R. (2003) Neuronal glutamate transporter EAAT4 is expressed in astrocytes. *Glia*, **44**, 13-25.
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Bonini, J.S., Medina, J.H. & Cammarota, M. (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*, **29**, 496-505.
- Kanai, Y. & Hediger, M.A. (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, **360**, 467-471.
- Kazazoglou, T., Fleischer-Lambropoulos, E., Geladopoulos, T., Kentroti, S., Stefanis, C. & Vernadakis, A. (1996) Differential responsiveness of late passage C-6 glial cells and advanced passages of astrocytes derived from aged mouse cerebral

- hemispheres to cytokines and growth factors: glutamine synthetase activity. *Neurochem Res*, **21**, 609-614.
- Kleihues, P. & Cavenee, W. (2000) *Pathology and genetic tumors of the nervous system*. IARC Press.
- Kleihues, P., Ohgaki, H. & Aguzzi, A. (1995) Gliomas. In Kettenmann, H., Ransom, B. (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, pp. 1044 - 1060.
- Komuro, H. & Rakic, P. (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, **260**, 95-97.
- Kostourou, V., Cartwright, J.E., Johnstone, A.P., Boulton, J.K., Cullis, E.R., Whitley, G. & Robinson, S.P. (2011) The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *Br J Cancer*, **104**, 83-90.
- Krebs, H.A. (1935) Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J*, **29**, 1951-1969.
- Kurihara, H., Hashimoto, K., Kano, M., Takayama, C., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. & Watanabe, M. (1997) Impaired parallel fiber->Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor delta2 subunit. *J Neurosci*, **17**, 9613-9623.
- Lee, K., Kentroti, S., Billie, H., Bruce, C. & Vernadakis, A. (1992) Comparative biochemical, morphological, and immunocytochemical studies between C-6 glial cells of early and late passages and advanced passages of glial cells derived from aged mouse cerebral hemispheres. *Glia*, **6**, 245-257.
- Lehre, K.P. & Danbolt, N.C. (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci*, **18**, 8751-8757.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. & Danbolt, N.C. (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*, **15**, 1835-1853.
- Liu, C., Sage, J.C., Miller, M.R., Verhaak, R.G., Hippenmeyer, S., Vogel, H., Foreman, O., Bronson, R.T., Nishiyama, A., Luo, L. & Zong, H. (2011) Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell*, **146**, 209-221.
- Logan, W.J. & Snyder, S.H. (1972) High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res*, **42**, 413-431.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W. & Kleihues, P. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, **114**, 97-109.



- Loureiro, S.O., Heimfarth, L., Reis, K., Wild, L., Andrade, C., Guma, F.T., Gonçalves, C.A. & Pessoa-Pureur, R. (2011) Acute ethanol exposure disrupts actin cytoskeleton and generates reactive oxygen species in c6 cells. *Toxicol In Vitro*, **25**, 28-36.
- Lu, D.Y., Leung, Y.M., Cheung, C.W., Chen, Y.R. & Wong, K.L. (2010) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration and matrix metalloproteinase-13 expression in glioma cells. *Biochem Pharmacol*, **80**, 1201-1209.
- Mangoura, D., Sakellaridis, N., Jones, J. & Vernadakis, A. (1989) Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res*, **14**, 941-947.
- Maragakis, N.J. & Rothstein, J.D. (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol*, **58**, 365-370.
- McDonald, J.W. & Johnston, M.V. (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev*, **15**, 41-70.
- McKenna, M.C. (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res*, **85**, 3347-3358.
- Miller, J.A., Runkle, S.A., Tjalkens, R.B. & Philbert, M.A. (2011) 1,3-Dinitrobenzene-induced metabolic impairment through selective inactivation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Toxicol Sci*, **122**, 502-511.
- Morrone, F.B., Oliveira, D.L., Gamermann, P., Stella, J., Wofchuk, S., Wink, M.R., Meurer, L., Edelweiss, M.I., Lenz, G. & Battastini, A.M. (2006) In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer*, **6**, 226.
- Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata, S. & Okada, M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev*, **26**, 230-235.
- Nardin, P., Tramontina, A.C., Quincozes-Santos, A., Tortorelli, L.S., Lunardi, P., Klein, P.R., Wartchow, K.M., Bobermin, L.D., Gottfried, C., Elisabetsky, E. & Gonçalves, C.A. (2011) In vitro S100B secretion is reduced by apomorphine: effects of antipsychotics and antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **35**, 1291-1296.
- Nedergaard, M., Takano, T. & Hansen, A.J. (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 748-755.
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2005a) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, **109**, 93-108.

- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2005b) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**, 479-489.
- Olney, J.W. (2003) Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol*, **3**, 101-109.
- Ozawa, S., Kamiya, H. & Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, **54**, 581-618.
- Palos, T.P., Zheng, S. & Howard, B.D. (1999) Wnt signaling induces GLT-1 expression in rat C6 glioma cells. *J Neurochem*, **73**, 1012-1023.
- Parker, K.K., Norenberg, M.D. & Vernadakis, A. (1980) "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science*, **208**, 179-181.
- Pilkington, G.J. (1994) Tumour cell migration in the central nervous system. *Brain Pathol*, **4**, 157-166.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E. & Kanner, B.I. (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, **360**, 464-467.
- Quincozes-Santos, A., Andrezza, A.C., Gonçalves, C.A. & Gottfried, C. (2010a) Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells. *Toxicol In Vitro*, **24**, 916-920.
- Quincozes-Santos, A., Rosa, R.B., Leipnitz, G., de Souza, D.F., Seminotti, B., Wajner, M. & Gonçalves, C.A. (2010b) Induction of S100B secretion in C6 astroglial cells by the major metabolites accumulating in glutaric acidemia type I. *Metab Brain Dis*, **25**, 191-198.
- Quintero, M., Cabañas, M.E. & Arús, C. (2010) <sup>13</sup>C-labelling studies indicate compartmentalized synthesis of triacylglycerols in C6 rat glioma cells. *Biochim Biophys Acta*, **1801**, 693-701.
- Rabacchi, S., Bailly, Y., Delhay-Bouchaud, N. & Mariani, J. (1992) Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science*, **256**, 1823-1825.
- Rauen, T., Jeserich, G., Danbolt, N.C. & Kanner, B.I. (1992) Comparative analysis of sodium-dependent L-glutamate transport of synaptosomal and astroglial membrane vesicles from mouse cortex. *FEBS Lett*, **312**, 15-20.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P. & Welty, D.F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, **16**, 675-686.

- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N. & Kuncl, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, **13**, 713-725.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A. & Mora, F. (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev*, **122**, 1-29.
- Sheldon, A.L., González, M.I., Krizman-Genda, E.N., Susarla, B.T. & Robinson, M.B. (2008) Ubiquitination-mediated internalization and degradation of the astroglial glutamate transporter, GLT-1. *Neurochem Int*, **53**, 296-308.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. & Stoffel, W. (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10955-10959.
- Takano, T., Lin, J.H., Arcuino, G., Gao, Q., Yang, J. & Nedergaard, M. (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med*, **7**, 1010-1015.
- Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R. & Nakanishi, S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, **8**, 169-179.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M. & Wada, K. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, **276**, 1699-1702.
- Tsuchioka, M., Hisaoka, K., Yano, R., Shibasaki, C., Kajiatani, N. & Takebayashi, M. (2011) Riluzole-induced glial cell line-derived neurotrophic factor production is regulated through fibroblast growth factor receptor signaling in rat C6 glioma cells. *Brain Res*, **1384**, 1-8.
- Vajkoczy, P., Goldbrunner, R., Farhadi, M., Vince, G., Schilling, L., Tonn, J.C., Schmiedek, P. & Menger, M.D. (1999) Glioma cell migration is associated with glioma-induced angiogenesis in vivo. *Int J Dev Neurosci*, **17**, 557-563.
- Vanhoutte, N., Abarca-Quinones, J., Jordan, B.F., Gallez, B., Maloteaux, J.M. & Hermans, E. (2009) Enhanced expression of the high affinity glutamate transporter GLT-1 in C6 glioma cells delays tumour progression in rat. *Exp Neurol*, **218**, 56-63.
- Vanhoutte, N. & Hermans, E. (2008) Glutamate-induced glioma cell proliferation is prevented by functional expression of the glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett*, **582**, 1847-1852.
- Vernadakis, A., Lee, K., Kentroti, S. & Brodie, C. (1992) Role of astrocytes in aging: late passage primary mouse brain astrocytes and C-6 glial cells as models. *Prog Brain Res*, **94**, 391-409.

- Waagepetersen, H.S., Shimamoto, K. & Schousboe, A. (2001) Comparison of effects of DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) and L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-2,4-PDC) on uptake and release of [3h]D-aspartate in astrocytes and glutamatergic neurons. *Neurochem Res*, **26**, 661-666.
- Wesseling, P., Ruiters, D.J. & Burger, P.C. (1997) Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol*, **32**, 253-265.
- Weyerbrock, A., Walbridge, S., Saavedra, J.E., Keefer, L.K. & Oldfield, E.H. (2011) Differential effects of nitric oxide on blood-brain barrier integrity and cerebral blood flow in intracerebral C6 gliomas. *Neuro Oncol*, **13**, 203-211.
- Yasuda, K., Itakura, M., Aoyagi, K., Sugaya, T., Nagata, E., Ihara, H. & Takahashi, M. (2011) PKC-dependent inhibition of CA2+-dependent exocytosis from astrocytes. *Glia*, **59**, 143-151.
- Ye, Z.C. & Sontheimer, H. (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res*, **59**, 4383-4391.
- Zhai, H., Acharya, S., Gravanis, I., Mehmood, S., Seidman, R.J., Shroyer, K.R., Hajjar, K.A. & Tsirka, S.E. (2011) Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. *J Neurosci*, **31**, 14346-14360.
- Zhou, J., Li, Y., Yan, G., Bu, Q., Lv, L., Yang, Y., Zhao, J., Shao, X., Deng, Y., Zhu, R., Zhao, Y. & Cen, X. (2011) Protective role of taurine against morphine-induced neurotoxicity in C6 cells via inhibition of oxidative stress. *Neurotox Res*, **20**, 334-342.