



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

Filipe Renato Pereira Dias

Avaliação dos efeitos do BMAA sobre parâmetros glutamatérgicos, oxidativos e inflamatórios em células astrogliais C6: Potencial papel glioprotetor do resveratrol

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira Dias, Filipe Renato
Avaliação dos efeitos do EMBA sobre parâmetros
glutamatérgicos, oxidativos e inflamatórios em células
astrogliais C6: Potencial papel glioprotetor do
resveratrol / Filipe Renato Pereira Dias. -- 2022.
89 f.
Orientador: André Quincozes dos Santos.

Coorientadora: Larissa Daniele Bobermin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. EMBA. 2. Glioproteção. 3. Gliotoxicidade. 4.
Resveratrol. I. Quincozes dos Santos, André, orient.
II. Bobermin, Larissa Daniele, coorient. III. Título.

Filipe Renato Pereira Dias

Avaliação dos efeitos do BMAA sobre parâmetros glutamatérgicos, oxidativos e inflamatórios em células astrogliais C6: Potencial papel glioprotetor do resveratrol

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

Orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Coorientadora: Dra. Larissa Daniele Bobermin

Porto Alegre

2022

Dedico esta dissertação a meu filho, Luiz Filipe, minha maior inspiração para sempre buscar o melhor de mim.

"O que é a ciência, senão um conjunto de discursos prontos para serem desmascarados, para serem falseados, para serem colocados à prova, para serem submetidos a transformações."

(Clóvis de Barros Filho)

Agradecimentos

Ao André, pela orientação. Por muitas vezes me fazer acreditar que é possível. Pela oportunidade. E pela preocupação com a excelência, demonstrada em cada vírgula corrigida.

À Lari, minha coorientadora, por toda a paciência e empenho. Tudo que aprendi no lab tem a tua mão, de forma direta ou indireta. Obrigado pelos ensinamentos e pela atenção especial dedicada ao meu trabalho, bem como à minha formação.

Aos meus pais Orlanda e Luiz (in memorian), pelo amor incondicional e por todo o empenho, comigo e com meus irmãos, nossos maiores exemplos.

Ao meu filho Luiz Filipe, luz da minha vida e brilho dos meus olhos, meu amor incondicional e minha maior força neste projeto.

À minha esposa Fernanda, pelo amor, pela compreensão, por todo o incentivo na busca dos meus sonhos e pela força, principalmente quando este projeto exigia minha ausência física.

Aos meus irmãos Fátima e Flávio e meus cunhados Cláudio e Marilene, por todas as vezes em que me ajudaram com o Luiz, pela certeza que sempre tive de que ele estaria bem com vocês.

Ao Vitor e Vanessa, por me apresentarem ao laboratório e pela disponibilidade em todas as vezes que precisei ficar em Porto Alegre.

A todos os colegas do LABGLIO. Em especial ao Rômulo, Nati e Vanessa, pela amizade e por muitas vezes cuidarem das minhas células na minha ausência.

A todo o corpo de serviço do Departamento de Bioquímica, em especial à Silvana, Giordano e Cléia. Vocês são essenciais para que nosso trabalho seja mais tranquilo, possível e eficiente.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, por resistirem tanto às constantes investidas contra a educação, proporcionando a oportunidade do meu desenvolvimento profissional.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 ASTRÓCITOS	6
1.2 CÉLULAS ASTROGLIAIS C6	7
1.3 METABOLISMO DO GLUTAMATO EM CÉLULAS ASTROGLIAIS	8
1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO	9
1.5 RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	11
1.6 BMAA.....	13
1.7 RESVERATROL	15
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
PARTE II	21
4 ARTIGO CIENTÍFICO	22
PARTE III	52
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	66
7 PERSPECTIVAS.....	67
8 APOIO FINANCEIRO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
10 LISTA DE FIGURAS	82

PARTE I

RESUMO

O aminoácido não proteico β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) é uma neurotoxina ambiental produzida principalmente por cianobactérias que tem sido associada ao desenvolvimento de condições neurodegenerativas, incluindo esclerose lateral amiotrófica (ELA), ELA associada ao complexo de demência de Parkinson e doença de Alzheimer. Seus principais mecanismos de neurotoxicidade conhecidos estão relacionados à indução de excitotoxicidade e estresse oxidativo em neurônios. Contudo, seus efeitos nas células astrogliais permanecem pouco conhecidos. Essas células exercem funções importantes para a manutenção da homeostase do sistema nervoso central (SNC), entre elas a captação e metabolismo de neurotransmissores, particularmente do glutamato, suporte metabólico, produção e liberação de moléculas antioxidantes como a glutatona (GSH), e a participação na resposta inflamatória. Assim, disfunções nessas células podem estar envolvidas nos mecanismos de dano do BMAA ao SNC. Por outro lado, a manutenção da funcionalidade astrogliar pode representar uma potencial estratégia protetora. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a ação glioprotetora do polifenol resveratrol frente a diferentes estímulos nocivos. Assim, neste estudo buscamos avaliar as possíveis disfunções astrogliais induzidas pelo BMAA, bem como investigamos o potencial papel glioprotetor do resveratrol, como uma estratégia preventiva frente à exposição ao BMAA. Nossos dados demonstram que o BMAA alterou parâmetros glutamatérgicos, aumentando a captação de glutamato e a atividade e expressão da enzima glutamina sintetase. Observamos também uma diminuição das defesas antioxidantes relacionadas à enzima superóxido dismutase (atividade e expressão), ao conteúdo de GSH e à expressão da enzima glutamato-cisteína ligase, a qual participa da biossíntese de GSH. Além disso, o BMAA induziu resposta inflamatória, aumentando os níveis extracelulares e expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β e interleucina-6, além de regular positivamente a expressão do fator nuclear kappa B (NF κ B) e das enzimas ciclo-oxigenase 2 e óxido nítrico sintase induzível. O BMAA também diminuiu a expressão gênica da interleucina-10, dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A}, da fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K), Akt e do coativador 1-alfa do receptor-gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), que são importantes vias relacionadas a respostas anti-inflamatórias, de sobrevivência celular e de biogênese mitocondrial. Por outro lado, o resveratrol preveniu a maioria destas alterações celulares e moleculares induzidas pelo BMAA, além de modular positivamente a expressão do fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), da enzima heme oxigenase 1 (HO-1) e do PGC-1 α , os quais têm sido apontados como importantes mecanismos moleculares associados aos efeitos do resveratrol. Assim, o presente trabalho demonstrou potenciais efeitos gliotóxicos do BMAA, bem como, pela primeira vez na literatura científica, caracterizou a atividade glioprotetora do resveratrol frente a toxicidade induzida pelo BMAA.

Palavras-chaves: BMAA, glioproteção, gliotoxicidade, resveratrol.

ABSTRACT

The non-protein amino acid β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) is an environmental neurotoxin produced mainly by cyanobacteria that has been associated with development of neurodegenerative conditions, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), ALS and Parkinsonism-Dementia Complex (ALS-PDC), and Alzheimer's disease. The mainly mechanisms of BMAA neurotoxicity are related to induction of excitotoxicity and oxidative stress in neurons. However, little is known about its effects on astroglial cells. These cells play important functions for maintaining central nervous system (CNS) homeostasis, including uptake and metabolism of neurotransmitters, in particular of glutamate, metabolic support, production and release of antioxidant molecules, such as glutathione (GSH), and participation in inflammatory response. Therefore, astroglial dysfunctions might be involved in the mechanisms underlying BMAA damage to the CNS. In this regard, our research group has demonstrated the glioprotective role of polyphenol resveratrol against different harmful stimuli. Thus, the aim of this study was to evaluate whether BMAA induced astroglial dysfunctions, as well as to investigate the potential glioprotective role of resveratrol, as a preventive strategy against BMAA exposure. Our data showed that BMAA changed glutamatergic parameters, increasing glutamate uptake and both expression and activity of glutamine synthetase. In addition, we observed a decrease in antioxidant defenses related to superoxide dismutase (activity and expression), GSH content and expression of glutamate-cysteine ligase that participates in GSH biosynthesis. BMAA also induced inflammatory response by increasing extracellular levels and gene expression of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β and interleukin-6, in addition to upregulate the expression of nuclear factor kappa B (NF κ B), cyclooxygenase 2, and inducible nitric oxide synthase. Moreover, BMAA decreased the gene expression of interleukin-10, adenosine receptors A₁ and A_{2A}, phosphoinositide-3-kinase (PI3K), Akt, and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 1-alpha coactivator (PGC-1 α), which are important pathways related to anti-inflammatory responses, cell survival and mitochondrial biogenesis. In contrast, resveratrol prevented most of BMAA-induced cellular and molecular alterations, in addition to upregulate nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), and PGC-1 α , which have been pointed out as important molecular mechanisms associated with resveratrol effects. Therefore, the present study demonstrated the potential gliotoxic effects of BMAA, as well as for the first time, characterized the glioprotective activity of resveratrol against BMAA-induced toxicity.

Keywords: BMAA, glioprotection, gliotoxicity, resveratrol.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS-PDC	ELA associada ao complexo de demência de Parkinson (do inglês <i>amyotrophic lateral sclerosis-Parkinson dementia complex</i>)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazolenopropionato
AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
BMAA	β -N-metilamino-L-alanina
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DA	Doença de Alzheimer
EAAC1	Carreador de aminoácidos excitatórios 1
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GCL	Glutamato-cisteína ligase
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa reduzida
HO-1	Heme oxigenase 1
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
NF κ B	Fator nuclear kappa B

NLRP3	Receptor do tipo NOD com domínio pirina 3
NMDA	N-metil D-Aspartato
Nrf-2	Fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2
PGC-1 α	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-cinase
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
SIRT1	Sirtuína1
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASTRÓCITOS

Os astrócitos compõem parte significativa do cérebro de mamíferos, e embora desempenhem funções importantes e variadas, até cerca de duas a três décadas atrás, eram especialmente atribuídas a eles funções passivas, como a de suporte estrutural aos neurônios. No cenário atual, um número crescente de estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, comprovam que os astrócitos são células que participam ativamente no funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (Krencik et al., 2017). Os astrócitos podem se comunicar com muitos neurônios, estabelecendo múltiplos contatos com as sinapses (Lee et al., 2021), tornando-os elementos importantes na modulação da transmissão sináptica. Assim, a coordenação de neurotransmissores pelas células astrogliais tem implicação direta em características como duração e eliminação das sinapses (Rial et al., 2016).

Além disso, pode-se destacar como principais funções dos astrócitos: a. homeostase iônica do SNC (Mack and Wolburg, 2013); b. manutenção da homeostasia redox, através da eliminação de espécies reativas de oxigênio, principalmente as originadas pela fosforilação oxidativa (Chen et al., 2020); c. suporte energético neuronal, formando lactato a partir do metabolismo da glicose e do glicogênio e o destinando aos neurônios (Dienel, 2019); d. formação e conservação da barreira hematoencefálica, angiogênese e modulação da microcirculação sanguínea no SNC (Liebner et al., 2018; Wang and Bordey, 2008); e. síntese de proteínas da matriz extracelular, moléculas de adesão e fatores tróficos que controlam a maturação neuronal e a sinaptogênese (Jones and Bouvier, 2014); f. homeostase e metabolismo de neurotransmissores (Kofuji and Araque, 2021;

Souza et al., 2019); g. proteção contra danos no SNC através da resposta imune, da remoção de componentes tóxicos, como metais pesados ou amônia, bem como através da reatividade astrocitária, com a finalidade de manter a integridade morfofuncional do SNC (Eidizadeh et al., 2015; Sofroniew, 2020).

Muitas destas evidências que apontam o papel dos astrócitos na homeostase funcional do SNC, bem como muito do conhecimento sobre as células astrogliais, se devem às metodologias de cultivo celular (isolamento em cultura). Este modelo permite o estudo das características astrocitárias em condições basais e neurotóxicas. As culturas podem ser obtidas diretamente de animais (culturas primárias), ou através do uso de linhagens de células astrogliais que mimetizem as características dos astrócitos, como a linhagem de células astrogliais C6 (Galland et al., 2019).

1.2 CÉLULAS ASTROGLIAIS C6

Com origem na década de 60, através de injeções em ratos do agente alquilante N-nitrosometilureia (Benda et al., 1968), a linhagem C6 tem sido amplamente utilizada em estudos neuroquímicos. Neste sentido, a expressão de proteínas gliais, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e S100B pela linhagem C6, atestam o seu caráter astrocitário (Benda et al., 1971).

Embora apresente limitações, a linhagem C6 constitui um importante modelo para estudos que envolvam a funcionalidade astrogliar, particularmente relacionadas às propriedades bioquímicas, farmacológicas, metabólicas, bem como os mecanismos celulares e de transdução de sinal associados a tais eventos (Bobermin

et al., 2012; Cechin et al., 2005; Feng and Zhang, 2004; Funchal et al., 2005; Galland et al., 2019).

As células da linhagem C6 utilizadas neste estudo vêm demonstrando em muitos trabalhos do nosso grupo funções características atribuídas aos astrócitos, tais como a captação de glutamato, a atividade da enzima glutamina sintetase (GS), a síntese da glutatona (GSH), a expressão e secreção da proteína S100B, e respostas oxidativas e inflamatórias. Além do mais, nosso grupo tem demonstrado que as células C6 apresentam respostas similares aos astrócitos primários quando submetidas a estímulos metabólicos e/ou neurotóxicos (Bobermin et al., 2018, 2012; dos Santos et al., 2006; Galland et al., 2019; Quincozes-Santos et al., 2017, 2014, 2013).

1.3 METABOLISMO DO GLUTAMATO EM CÉLULAS ASTROGLIAIS

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos (Danbolt, 2001). A neurotransmissão glutamatérgica é um evento que requer um controle rígido no qual os astrócitos possuem um papel chave (Barros and Dey, 2018; Danbolt et al., 2016; Niciu et al., 2012). A excitotoxicidade glutamatérgica é um termo que descreve a neurotransmissão excitatória desregulada, com concentrações elevadas de glutamato no meio extracelular, e que via de regra, leva a dano e/ou morte celular (Heath and Shaw, 2002). No SNC, o principal responsável pela remoção do glutamato extracelular é o astrócito, através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT). Os transportadores de glutamato são subdivididos em EAAT1, EAAT2, também referidos em roedores como GLAST e GLT-1, respectivamente, EAAT3, EAAT4 e EAAT5. O transportador EAAT3 é referido em

roedores como EAAC1 e é o principal transportador de glutamato expresso nas células C6 (Davis et al., 1998; Mahmoud et al., 2019).

Uma vez captado pelas células astrogliais, o glutamato pode tomar diferentes destinos, sendo convertido a glutamina pela enzima GS, com a finalidade de exportação e posterior reconversão a glutamato através da enzima glutaminase nos neurônios, constituindo assim o ciclo glutamato-glutamina (Yudkoff, 2017). Atuando no metabolismo energético, o glutamato pode também sofrer degradação através da enzima glutamato-desidrogenase, tendo como produto o α -cetoglutarato, o qual entra no ciclo do ácido tricarboxílico (Karaca et al., 2015). Nas células astrogliais, o glutamato também está relacionado à síntese de moléculas envolvidas na homeostase redox, como a GSH (McBean, 2017).

Neste sentido, a desregulação nos processos envolvendo o metabolismo do glutamato está relacionada com mecanismos de gliotoxicidade, com forte impacto sobre a manutenção da homeostasia do SNC, além de alterações sobre as respostas oxidativas e inflamatórias.

1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são estruturas químicas com um elétron desemparelhado, com significativa reatividade e com tendência a se combinarem com outras moléculas (Di Meo and Venditti, 2020). Espécies reativas de oxigênio (ERO) se referem a radicais livres de O_2 , como radicais superóxido e hidroxila, e moléculas derivadas do O_2 que podem gerar radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Também podem existir outras espécies reativas, como as de nitrogênio

(ERN), que têm como principais representantes o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻) (Devasagayam et al., 2004).

O estresse oxidativo/nitrosativo é um estado de desequilíbrio entre as ERO/ERN e os mecanismos de defesa antioxidante (Singh et al., 2019). Essa condição contribui para a produção de moléculas pró-oxidantes responsáveis por provocar danos em constituintes de estruturas celulares. Inúmeros estudos têm demonstrado o papel do estresse oxidativo em uma série de distúrbios que acometem o SNC, bem como a associação de certas circunstâncias patológicas a uma grande produção de ERO/ERN pelas células gliais (Chen et al., 2017; Khatri et al., 2018; Musgrove et al., 2019). Nesse contexto, doenças que alteram a homeostase redox também podem desencadear respostas que visem ao aumento de defesas antioxidantes, a fim de tentar suprimir os níveis elevados de espécies reativas relacionadas ao desequilíbrio (Sandberg et al., 2014).

As células astrogliais também são fundamentais em relação à manutenção da homeostase redox, pois a síntese de GSH está intimamente associada à função de defesa antioxidante, uma vez que a GSH é considerada o mais importante antioxidante não-enzimático do SNC (Bolaños, 2016; Fernandez-Fernandez et al., 2012). A síntese do tripeptídeo glutamato-cisteína-glicina (GSH) ocorre em duas etapas, sendo a primeira através da ação da enzima glutamato-cisteína ligase (GCL), que liga o glutamato à cisteína e é limitante da biossíntese de GSH. Posteriormente, a enzima glutationa sintetase adiciona a glicina (Lu, 2013). De modo relevante, as células astrogliais também disponibilizam defesas antioxidantes para as células neuronais. Assim, uma parte da GSH sintetizada nos astrócitos é exportada para o meio extracelular, onde é hidrolisada em seus aminoácidos

constituintes que servem como precursores para a síntese de GSH neuronal (Chen et al., 2020; Dringen et al., 1999).

Além disso, entre os mecanismos de defesa antioxidante dos astrócitos estão enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que protege a célula de reações danosas do superóxido, catalisando a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Essa enzima apresenta diferentes isoformas, como a Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1), presente no citoplasma e a Mn-superóxido dismutase (SOD2), presente na mitocôndria (Flynn and Melov, 2013). Outras enzimas, como catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase também estão presentes nas células astrogliais (Fernandez-Fernandez et al., 2012).

1.5 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A resposta inflamatória para remoção de agentes patogênicos ou substâncias que causam toxicidade ao SNC envolve a reatividade dos astrócitos e da microglia, através da ativação de vias de sinalização e da liberação de moléculas pró-inflamatórias (Burda and Sofroniew, 2014). Entre as citocinas pró-inflamatórias liberadas, podemos citar o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), bem como a ativação de fatores de transcrição, como do fator nuclear da cadeia κ de linfócitos B (NF κ B), que controla a atividade de muitos genes associados à função imunológica (Zusso et al., 2019). Entretanto, outras vias de sinalização celular estão relacionadas à promoção de efeitos citoprotetores, através da síntese de mediadores anti-inflamatórios, como a interleucina-10 (IL-10) (Jensen et al., 2013).

A ativação do NFκB resulta, entre outros efeitos, na produção de pró-IL-1β e do receptor do tipo NOD com domínio pirina 3 (NLRP3), um dos inflamassomas mais caracterizados. Os inflamassomas são complexos macromoleculares ativados em resposta a sinais de dano/perigo que participam da clivagem e processamento de IL-1β, via caspase 1, em sua forma madura para posterior liberação (Heneka et al., 2018). Além disso, a ativação do NFκB frente a estímulos nocivos pode promover a síntese das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (Blanco et al., 2004), as quais produzem NO e prostaglandinas, respectivamente, que podem atuar como importantes mediadores pró-inflamatórios (Ghasemi and Fatemi, 2014; Minghetti, 2004).

A proteína S100B é amplamente expressa no cérebro, predominantemente por astrócitos. Em resposta a estímulos nocivos, a S100B pode ser liberada para o meio extracelular e mediar respostas inflamatórias através de sua interação com o receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) (Angelopoulou et al., 2021). É importante ressaltar que a S100B é um importante marcador de reatividade glial (Gonçalves et al., 2008).

Outro fator relevante na modulação do processo inflamatório no SNC são os receptores de adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃). Assim, o sistema adenosinérgico é capaz de modular as respostas gliais, incluindo aquelas relacionadas à inflamação, podendo diminuir os níveis de TNF-α e IL-1β, além de aumentar a produção de IL-10 (Bobermin et al., 2019; Borea et al., 2016; Mills et al., 2012).

Os danos que acometem o SNC podem impactar na homeostase das células gliais, alterando parâmetros glutamatérgicos, oxidativos e inflamatórios, prejudicando sua funcionalidade e, conseqüentemente, de outras populações celulares, como os neurônios (Pekny et al., 2014; Pekny and Nilsson, 2005). Alguns fatores ambientais,

como a exposição a neurotoxinas, podem levar ao rompimento desta homeostase (Etchegoyen et al., 2018; Zhao et al., 2017).

1.6 BMAA

O beta-N-metilamino-L-alanina (BMAA) (Figura 1) é um aminoácido não proteico e hidrofílico, altamente neurotóxico, produzido pela maioria das cianobactérias (Caller et al., 2018) e diatomáceas (Jiang et al., 2014). Este aminoácido tem sido associado ao aparecimento esporádico de várias doenças neurodegenerativas, tais como a esclerose lateral amiotrófica (ELA); a ELA associada ao complexo de Parkinson-demência (ALS-PDC, do inglês *amyotrophic lateral sclerosis-Parkinson dementia complex*); e a doença de Alzheimer (DA) (Cox et al., 2016). Neste contexto, o estudo de seus mecanismos de neurotoxicidade tem assumido grande relevância nos últimos anos (de Munck et al., 2015).

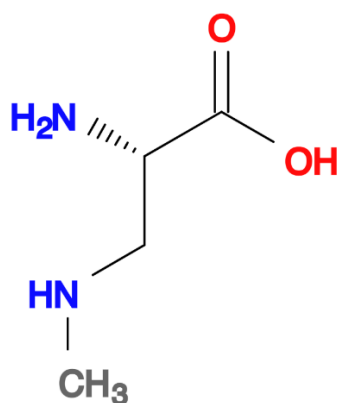


Figura 1: Estrutura química do aminoácido β -N-metilamino-L-alanina (BMAA). Fonte: Mind the Graph, 2022 (Licenças Creative Commons)

Historicamente, o BMAA foi descoberto na segunda metade do século passado pela alta incidência (aproximadamente 100 vezes maior que no resto do

mundo) de ALS-PDC no povo indígena Chamorro em Guam, uma ilha do Pacífico. O descarte da herança mendeliana como fator responsável levou à suposição e posterior confirmação sobre uma causa esporádica, neste caso pela ingesta habitual de tortilhas feitas com farinha de sementes de cicadáceas, além do consumo de raposas voadoras (espécie de morcego endêmica da região) em cerimoniais religiosos dos Chamorros, ambos com alto teor de BMAA incorporado (Banack et al., 2010). A descoberta do BMAA e, posteriormente da sua relação com a neurodegeneração motora, denotam o mesmo como provável fator desencadeante de doenças neurodegenerativas, visto que estudos posteriores têm confirmado tal associação, tanto com doenças de ordem motora como de ordem cognitiva em outras partes do mundo (Nunes-Costa et al., 2020; Pablo et al., 2009; Silva et al., 2020).

Quanto a presença ambiental do BMAA, destaca-se que as florações de cianobactérias têm aumentado em frequência, tamanho e duração, de forma síncrona com o aumento da eutrofização e das temperaturas globais (Dunlop e Guilleman, 2019). Além disso, a presença do BMAA já foi observada em corpos hídricos ou incorporado a espécies que os habitam, incluindo espécies utilizadas para a alimentação humana, em diferentes lugares do mundo, como Suécia, Austrália, Estados Unidos e França (Jiang et al., 2014; Violi et al., 2019; Metcalf et al., 2021; Réveillon et al., 2016). No Brasil quase não há estudos para a detecção do BMAA, porém, já foi constatada a presença de BMAA em amostras coletadas de lagoas de estabilização da Estação de Tratamento de Esgoto no município de Juazeiro do Norte - CE (Oliveira, 2011). Essa evidência constata que florações de cianobactérias no Brasil também são capazes de produzir esse aminoácido neurotóxico.

A maioria dos estudos dos efeitos do BMAA no SNC tem como alvo os neurônios. A superativação dos receptores pós-sinápticos N-metil D-Aspartato (NMDA) é o mecanismo mais frequentemente relatado a ação do BMAA (Chiu et al., 2012). Além disso, é proposto que o BMAA possa ser internalizado em células neuronais e ser incorporado incorretamente na estrutura primária de proteínas em substituição a um ou mais aminoácidos de serina, gerando mal dobramento e podendo causar perda funcional e agregados (Dunlop et al., 2013; Proctor et al., 2019). Nesse sentido, o BMAA tem sido utilizado como um modelo para o estudo da ELA esporádica (de Munck et al., 2015).

Assim, revela-se uma necessidade de elucidar as funções e mecanismos da neurotoxicidade do BMAA, particularmente em células astrogliais, visto seu importante papel para a homeostase do SNC. Previamente, já foi demonstrado *in vitro* o influxo de BMAA em astrócitos através do trocador cistina/glutamato x_c^- e sua possível incorporação em proteínas (Albano and Lobner, 2018; Dunlop et al., 2013). Além disso, o BMAA inibe por competição a captação de cistina, levando à diminuição da síntese de GSH e conseqüentemente de sua disponibilidade. Hong et al., 2014 também observou astrogliose reativa induzida pela exposição ao BMAA em modelos *in vivo* (Yin et al., 2014).

1.7 RESVERATROL

A modulação da funcionalidade astrogliar vem sendo explorada como possível alvo para intervenções terapêuticas, e o uso de moléculas de origem natural tem demonstrado resultados promissores neste sentido. Em tal contexto, o polifenol não-flavonoide resveratrol possui notável relevância. Sendo encontrado em inúmeras

plantas (Pervaiz, 2003), o resveratrol pertence à classe das fitoalexinas, um grupo de compostos químicos de baixo peso molecular, produzido pelas plantas em resposta a estímulos externos, como em infecções por micro-organismos, radiações UV e privação de nutrientes.

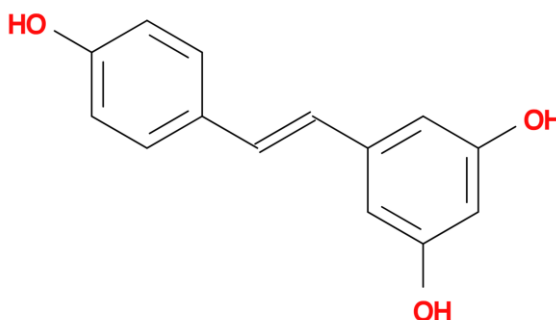


Figura 2: Estrutura química do resveratrol. Fonte: Mind the Graph, 2022 (Licenças Creative Commons)

O resveratrol apresenta inúmeros efeitos biológicos, como atividade antioxidante, uma vez que ele atua como “*scavenger*” (sequestrador) de espécies reativas, bem como ação cardioprotetora. Neste sentido, o resveratrol desempenha um papel central no “paradoxo francês”, correlação inversa observada entre a ingestão de vinho tinto e a incidência de doenças cardiovasculares (Jardim et al., 2018; Renaud and de Lorgeril, 1992). Sua atividade cardioprotetora envolve entre outros fatores a diminuição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (Frémont et al., 1999), ação vasodilatadora (Das and Das, 2010; Lekakis et al., 2005) e inibição da agregação plaquetária (Bertelli et al., 1995). Porém, suas ações benéficas não se limitam apenas à periferia corporal.

O SNC também é alvo terapêutico do resveratrol, pois ele atravessa a barreira hematoencefálica e exerce importantes efeitos em condições fisiológicas e patológicas (Jardim et al., 2018), sendo demonstrados notáveis efeitos

neuroprotetores em estudos com modelos experimentais de isquemia, Doença de Parkinson e DA. Tais efeitos são mediados por sua ação antioxidante (Ahmed et al., 2017) ou por modulação de proteínas como a heme oxigemase 1 (HO-1), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e sirtuína 1 (SIRT1) (Quincozes-Santos et al., 2021). Este polifenol ainda modula fatores de transcrição como o NFκB (Moraes et al., 2020) e o fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2), vias de sinalização como o coativador gama-1α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1α), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) e fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K)/Akt (Bastianetto et al., 2015; Bobermin et al., 2019; Griñán-Ferré et al., 2021).

A SIRT1 pertence a uma família de proteínas e histonas desacetilases com várias funções celulares (Jiao and Gong, 2020), incluindo a regulação da inflamação (Malaguarnera, 2019; Wang et al., 2017; Zhu et al., 2011). A PGC-1α é um importante regulador da atividade mitocondrial, controlando a transcrição de genes envolvidos no metabolismo energético (Jornayvaz and Shulman, 2010), enquanto a AMPK atua como um sensor metabólico, desempenhando um papel fundamental na homeostase energética (Hardie et al., 2012; Saxton and Sabatini, 2017). A PI3K e a sua principal molécula a jusante, Akt, estão associadas à sobrevivência celular com papéis cruciais sobre o crescimento e diferenciação celular, transporte e metabolismo de glicose (Linton et al., 2019).

Já a via de sinalização do Nrf-2 pode mediar a regulação de genes associados às defesas antioxidantes e resposta anti-inflamatória, sendo altamente expressa em células astrogliais (Sigfridsson et al., 2018). A enzima HO-1 tem sua expressão controlada pelo Nrf-2, sendo altamente induzível frente a diferentes estímulos estressores (Zhao et al., 2017). A HO-1 cataboliza o heme em monóxido

de carbono (CO), biliverdina (convertida a bilirrubina) e ferro livre (Chen-Roetling et al., 2017). Neste sentido, nosso grupo vem demonstrando que a HO-1 está relacionada com a modulação de funções astrocitárias críticas para a manutenção da homeostase no SNC em resposta a estímulos nocivos (Arús et al., 2017; Bellaver et al., 2015a, 2015b).

Nosso grupo tem mostrado também que o resveratrol modula importantes funções gliais como captação de glutamato, atividade da GS, níveis de GSH, resposta inflamatória e liberação de fatores tróficos (Arús et al., 2017; Bellaver et al., 2016; Bobermin et al., 2015, 2012). Sendo assim, o resveratrol surge como um potencial agente farmacológico relacionado à excitotoxicidade glutamatérgica, ao estresse oxidativo e à neuroinflamação, representando uma possível nova estratégia terapêutica em condições de dano que acometam o SNC.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando o BMAA como uma neurotoxina capaz de induzir excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e neuroinflamação, e tais eventos estarem relacionados aos mecanismos patológicos da ELA, torna-se relevante estudar a toxicidade do BMAA, bem como seus mecanismos, em células astrogliais C6, um modelo experimental amplamente aceito para estudar funções astrocitárias. Adicionalmente, a investigação dos efeitos do resveratrol frente ao potencial dano induzido pelo BMAA pode contribuir para a caracterização do efeito glioprotetor desta molécula frente a toxicidade do BMAA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do BMAA sobre a funcionalidade astrogliar em células C6, bem como o potencial glioprotetor do resveratrol frente à exposição de BMAA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito de diferentes concentrações de BMAA sobre a viabilidade celular, a captação de glutamato e a produção de ERO;

2. Avaliar as ações do BMAA e do resveratrol sobre parâmetros relacionados ao metabolismo do glutamato em células astrogliais através da captação de glutamato e expressão do transportador EAAC1, bem como da atividade e expressão da GS;

3. Investigar os efeitos do BMAA e do resveratrol no perfil redox celular através da produção de ERO, níveis de GSH e expressão da GCL, atividade e expressão da enzima SOD;

4. Avaliar os efeitos do BMAA e do resveratrol em relação à liberação e/ou expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, S100B, NLRP3, subunidade p65 do NF κ B, COX-2 e iNOS;

5. Avaliar a expressão dos receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃;

6. Investigar os efeitos do BMAA e do resveratrol sobre a expressão de Nrf2, HO-1, SIRT1, PGC-1 α , AMPK, PI3K e Akt.

PARTE II

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Glioprotective effects of resveratrol against BMAA-induced astroglial dysfunctions

Filipe Renato Pereira Dias, Rômulo Rodrigo de Souza Almeida, Vanessa Sovrani, Natalie K. Thomaz, André Quincozes-Santos, Larissa Daniele Bobermin

Artigo aceito para publicação no periódico *Neurotoxicity Research*

DOI: 10.1007/s12640-022-00492-9

PARTE III

5 DISCUSSÃO

O BMAA é um aminoácido não proteico, produzido por uma grande variedade de cianobactérias e diatomáceas, e sua presença já foi descrita em diversas regiões do mundo como China, Austrália, Suécia e Polônia (Błaszczuk et al., 2021; Li et al., 2010; Salomonsson et al., 2015; Violi et al., 2019). Além disso, outros estudos descrevem o bioacúmulo do BMAA ao longo da cadeia alimentar (de forma livre ou incorporado a proteínas), o que disponibiliza quantidades significativas desse aminoácido para humanos expostos a alimentos contaminados (Cox et al., 2003; Wang et al., 2021). No entanto, no Brasil quase não existem estudos avaliando a presença ambiental do BMAA. Já no que diz respeito a sua ação no SNC, o BMAA é altamente neurotóxico e relacionado ao surgimento de doenças neurodegenerativas, principalmente ELA e ALS-PDC (Cox et al., 2018).

Atualmente, os mecanismos mais caracterizados para a ação neurotóxica do BMAA são a excitotoxicidade e o estresse oxidativo (Delcourt et al., 2017; Lobner, 2009; Okle et al., 2013). Esses mecanismos envolvem, pelo menos em parte, reações para a carbamilação do BMAA livre com o CO₂ ou bicarbonato (Diaz-parga et al., 2018). Os produtos dessa reação são carbamatos de BMAA estruturalmente semelhantes ao glutamato (Zimmerman et al., 2016), que atuam como agonistas dos receptores de glutamato, principalmente via NMDA e AMPA. Assim, é proposto que esses carbamatos ativem de forma exagerada os receptores pós-sinápticos, despolarizando os neurônios excessivamente (Diaz-parga et al., 2018).

De forma relevante, pouco se demonstrou até agora sobre a ação do BMAA na glia, particularmente nas células astrogliais. Entre as populações celulares que compõem o SNC, os astrócitos desempenham diferentes funções que contribuem para a manutenção da sua homeostasia (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

Particularmente, o metabolismo de neurotransmissores, a homeostase redox e a resposta inflamatória adequados estão diretamente relacionados a funções protetoras endógenas das células astrogliais (Guillamón-Vivancos et al., 2015). Por outro lado, a tríade excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação é mencionada em vários estudos associada ao desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas (Chamorro et al., 2016; Quincozes-Santos et al., 2021). Assim, a manutenção da funcionalidade astrocitária representa uma importante via de defesa frente aos estímulos nocivos que podem comprometer a homeostase do SNC, e pode ser positivamente modulada por moléculas exógenas, como o resveratrol (Bélangier et al., 2011; Bhatia et al., 2019; Dringen and Hirrlinger, 2003; Schousboe et al., 2013; Shinozaki et al., 2017; Yi et al., 2019).

Nos últimos anos, o estudo de moléculas protetoras de origem natural com foco no SNC vem ganhando destaque, uma vez que elas podem modular diversos mecanismos biológicos simultaneamente, representando um notável potencial terapêutico (Bastianetto et al., 2015; Griñán-Ferré et al., 2021; Sovrani et al., 2021). Muitos estudos vêm mostrando os efeitos neuroprotetores do resveratrol em diversos modelos de doenças neurodegenerativas, como AD, Parkinson e ELA (Mancuso et al., 2014; Moussa et al., 2017; Yáñez et al., 2011; Zhang et al., 2018). Tais efeitos podem estar associados às suas ações antioxidante, anti-inflamatória e sobre a atividade de neurotransmissores, bem como na modulação de diversas vias de sinalização, relacionadas ao metabolismo, apoptose e sobrevivência celular (Yan et al., 2020). No entanto, mais estudos são necessários para ampliar a compreensão dos mecanismos de ação celulares e moleculares do resveratrol.

Nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que o resveratrol pode modular importantes funções astrogliais, como captação de glutamato, atividade da GS,

níveis de GSH e resposta inflamatória, tanto em condições basais quanto frente a estímulos nocivos, como a amônia, LPS e moléculas pró-oxidantes (H₂O₂) (Arús et al., 2017; Bobermin et al., 2019, 2015; Quincozes-Santos et al., 2013)(Bobermin et al., 2015; Quincozes-Santos et al., 2013; Arús et al., 2017; Bobermin et al., 2019). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações celulares, neuroquímicas e moleculares causadas pelo BMAA em células astrogliais, bem como avaliar o potencial glioprotetor do resveratrol frente à gliotoxicidade do BMAA.

O modelo celular utilizado foi a linhagem de células astrogliais C6, uma das linhagens astrogliais mais utilizadas em estudos neuroquímicos (Park et al., 2019). Embora apresentem algumas limitações, as células astrogliais C6 representam um bom modelo de estudo, sendo utilizadas na investigação de parâmetros bioquímicos e metabólicos relacionados aos astrócitos. Importantes marcadores gliais, como GFAP e S100B, são expressos na linhagem C6 (Benda et al., 1971), bem como proteínas/enzimas, neurotransmissores, mediadores inflamatórios e moléculas antioxidantes (Baber and Haghghat, 2010; Quincozes-Santos et al., 2013; Zhang et al., 2020). Particularmente frente a estímulos tóxicos ou alterações metabólicas, as células astrogliais têm mostrado respostas semelhantes às observadas em culturas primárias de astrócitos (Bobermin et al., 2012; Quincozes-Santos et al., 2017, 2014). Todo esse conjunto de evidências reforçam o caráter astrogliar da linhagem C6.

Considerando que a neurotoxicidade do BMAA tem sido relacionada à indução de excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo, foram avaliados os efeitos da exposição a diferentes concentrações de BMAA (100, 300 e 500 µM) por um período de 24 h em células astrogliais C6 sobre a viabilidade celular, a oxidação de DCFH (como uma medida da produção de ERO/ERN) e a captação de glutamato. Nenhuma das concentrações testadas de BMAA afetou a viabilidade das células

astrogliais. Chiu et al. observou um aumento significativo da atividade mitocondrial em concentrações de BMAA a partir de 100 μ M em células gliais olfativas, porém utilizando um tempo de exposição de 48 h (Chiu et al., 2013).

Nossos dados demonstraram que apenas a maior concentração de BMAA (500 μ M) foi capaz de induzir aumento na produção de ERO/ERN em células astrogliais. Este resultado está de acordo com a literatura, uma vez que os mesmos autores observaram o aumento na produção de ERO/ERN em células gliais apenas em concentrações de BMAA acima de 500 μ M (Chiu et al., 2013). Foi observado também que todas as concentrações do nosso estudo aumentaram a captação de glutamato de maneira significativa. A partir desses resultados, foi escolhida a concentração de 500 μ M de BMAA para os experimentos posteriores, a fim de avaliar os efeitos glioprotetores do resveratrol.

Como mencionado acima, as células astrogliais têm um papel importante no metabolismo do glutamato. Assim, observou-se no presente trabalho que o BMAA foi capaz de promover alterações celulares relacionadas à homeostase glutamatérgica, como o aumento na captação de glutamato. Esse aumento pode estar relacionado, pelo menos em parte, à capacidade de os carbamatos de BMAA atuarem como análogos do glutamato, sendo sugerido que estes carbamatos tenham maior afinidade de ligação com os receptores e transportadores glutamatérgicos que o próprio glutamato (Diaz-parga et al., 2018). No entanto, em relação à expressão de EAAC1, o principal transportador de glutamato presente em células C6, o BMAA não induziu mudanças, sugerindo que seu efeito na captação não depende exclusivamente da expressão do transportador. Nessa perspectiva, é importante ressaltar que muitos efeitos sobre a captação de glutamato envolvem a redistribuição dos transportadores para e a partir da membrana plasmática, através

de vias de sinalização como da proteína cinase C e da PI3K (Bobermin et al., 2013; Dall'Igna et al., 2013; Robinson, 2006).

Além disso, observou-se que o resveratrol *per se* aumentou a captação de glutamato. Embora o resveratrol não tenha modulado de maneira estatisticamente significativa o efeito do BMAA na captação, notou-se uma tendência de um aumento ainda maior. Pelo menos na presença do BMAA, o resveratrol aumentou a expressão do EAAC1, provavelmente devido à ativação de vias que controlam expressão de EAAC1, como por exemplo Nrf2 (Escartin et al., 2011). No contexto da exposição ao BMAA, o aumento da captação de glutamato pode apresentar um papel dual, uma vez que os transportadores de glutamato podem ser uma via de entrada do BMAA nas células. Além disso, uma maior disponibilidade intracelular de glutamato pode estimular o influxo do BMAA através do trocador x_c^- , o qual depende o efluxo de glutamato para seu funcionamento e tem sido apontado como um importante mecanismo de transporte do BMAA em células neurais (Albano and Lobner, 2018).

Após ser captado, o glutamato pode seguir diferentes destinos metabólicos nas células astrogliais. Assim, foi analisada a atividade e expressão da enzima GS, responsável pela conversão do glutamato em glutamina. Os resultados encontrados demonstraram que o BMAA induziu um aumento na atividade da GS, bem como da expressão de seu RNAm, provavelmente devido a uma maior disponibilidade de glutamato. A GS é a principal enzima envolvida no metabolismo do glutamato astrogliar. Assim, é responsável por manter a concentração de glutamato intracelular em níveis baixos, permitindo uma depuração eficiente do glutamato por seus transportadores (Trabelsi et al., 2017).

Mudanças na atividade e expressão gênica da GS vêm sendo reportadas em diversas desordens do SNC (Jayakumar and Norenberg, 2016). No entanto, na presença de resveratrol, tanto a atividade quanto a expressão da GS foram mantidas em níveis semelhantes ao controle. Uma vez que o resveratrol não impediu o aumento da captação de glutamato induzido pelo BMAA, é possível que o glutamato esteja sendo metabolizado por vias alternativas (por exemplo, oxidação ou síntese de GSH). Outros estudos demonstram que concentrações maiores de resveratrol (250 μM) podem modular a atividade da GS (Vieira de Almeida et al., 2007). Esse efeito não foi observado na concentração de 10 μM , mas o fato do resveratrol atenuar os efeitos do BMAA sugere que ele pode contribuir para a manutenção da homeostasia do ciclo glutamato-glutamina.

O dano oxidativo tem sido relatado em diversos distúrbios que acometem o SNC (Butterfield and Halliwell, 2019; Raza et al., 2019; Smith et al., 2019). As células astrogliais possuem importantes mecanismos relacionados à defesa antioxidante e que podem ser modulados tanto por estímulos nocivos como por moléculas antioxidantes. O estresse oxidativo pode ocorrer como mecanismo patológico primário e/ou como evento secundário, originado de processos como a disfunção mitocondrial e a excitotoxicidade (Vargas and Johnson, 2009). Nosso grupo tem demonstrado que o resveratrol modula de forma eficaz as respostas das células astrogliais frente a diferentes estímulos pró-oxidantes (Bobermin et al., 2018; Quincozes-Santos et al., 2013). De forma geral, observou-se que o resveratrol foi capaz de prevenir o aumento da produção de ERO induzida pelo BMAA. Esse efeito por ser atribuído parcialmente a sua atividade antioxidante intrínseca, bem como mediado pela ativação dos diferentes mecanismos antioxidantes celulares (Kung et al., 2021).

A GSH é uma importante defesa antioxidante não-enzimática para o CNS, o que a torna um alvo para a glioproteção. A diminuição do conteúdo de GSH como consequência da exposição ao BMAA, neste estudo, possivelmente foi associada a uma diminuição da expressão da enzima GCL. Além disso, outro mecanismo pelo qual o BMAA pode diminuir os níveis de GSH é a redução na importação de cistina. Como mencionado previamente, o influxo de BMAA em astrócitos pode ocorrer através do trocador xc⁻. Assim, o BMAA pode inibir por competição a captação de cistina, principal fonte de cisteína para a síntese de GSH (Albano and Lobner, 2018). Apesar de não termos observado os efeitos *per se* do resveratrol na concentração de 10 µM no conteúdo de GSH, ele foi capaz prevenir as alterações causadas pelo BMAA, também em relação à expressão da enzima GCL. Cabe ressaltar que essa enzima também é controlada por Nrf2, um importante alvo molecular do resveratrol (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014).

O BMAA também diminuiu tanto a atividade da SOD quanto a expressão gênica das isoformas SOD1 e SOD2, os quais também podem representar mecanismos associados com o dano oxidativo do BMAA. A enzima SOD tem um papel importante na defesa antioxidante, protegendo as células dos danos causados pelo ânion superóxido. Em relação aos astrócitos, o papel protetor da SOD frente aos danos oxidativos pode ocorrer ainda através da sua secreção, impedindo a oxidação da GSH extracelular (Pope et al., 2008). Diaz-Parga et al. relatou o efeito quelante sobre metais como Mg²⁺, Zn²⁺ e Cu²⁺ pelo BMAA livre e seus carbamatos (Diaz-parga et al., 2021). Além de seu potencial em se ligar a metais presentes no SNC, é sugerida a incorporação do BMAA na estrutura primária da enzima SOD1 (Proctor et al., 2019). Assim, esses mecanismos podem causar perda ou deficiência funcional dessa enzima, representando uma via alternativa para os efeitos oxidativos

do BMAA. Por outro lado, o resveratrol demonstrou um papel protetor nos danos do BMAA relacionados à SOD, evitando a diminuição de sua atividade e da expressão das duas isoformas analisadas.

Os resultados deste estudo também apontam que o BMAA foi capaz de modular a resposta inflamatória. As células astrogliais são fundamentais na modulação da neuroinflamação, uma vez que produzem e liberam mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, os quais também estão associados à reatividade glial (Giovannoni and Quintana, 2020; Moulson et al., 2021). O TNF- α e a IL-1 β são citocinas primárias e sinalizam para que haja a produção e secreção de outros mediadores, como a IL-6 (Hamby and Sofroniew, 2010). As alterações inflamatórias são eventos classicamente descritos em diversas doenças neurodegenerativas, como AD, Parkinson e ELA (Liddel and Barres, 2017). Nesse sentido, a resposta inflamatória mediada por células astrogliais pode ser um importante mecanismo relacionado à neurotoxicidade do BMAA. No entanto, os efeitos do resveratrol foram significativos em impedir as consequências do BMAA na resposta inflamatória, tanto em relação à liberação quanto à expressão desses mediadores. Esses resultados corroboram as propriedades anti-inflamatórias do resveratrol em células astrogliais, que têm sido observadas em diferentes condições experimentais, como na gliotoxicidade induzida por amônia (Bobermin et al., 2012), lipopolissacarídeo (Bobermin et al., 2022) e peptídeo beta-amiloide (Zhao et al., 2018).

A atividade anti-inflamatória do resveratrol também pode ser reforçada pelos seus efeitos na expressão de S100B e IL-10. Tanto a expressão como níveis extracelulares aumentados da proteína S100B têm sido associados a processos inflamatórios e neurodegenerativos (Angelopoulou et al., 2021; de Souza et al.,

2009). Pelo menos na concentração de BMAA e no tempo analisados, a expressão gênica de S100B não foi modulada nas células astrogliais. Por outro lado, a diminuição dos níveis do RNAm de S100B causada pelo resveratrol pode estar relacionada a seus efeitos glioprotetores. Além disso, previamente, nosso grupo de pesquisa mostrou que o resveratrol foi capaz de conter o aumento da liberação de S100B induzido por amônia (Bobermin et al., 2012). Em relação à IL-10, o resveratrol não apenas preveniu o efeito do BMAA na redução de sua expressão, como a modulou positivamente em condições basais. A IL-10 pode reprimir a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Zhang and An, 2007), além de atenuar a ativação do NF κ B.

O BMAA causou um aumento na expressão da subunidade p65 de NF κ B, o que pode contribuir para uma maior ativação desse fator de transcrição. Em um estudo recente, foi observado um aumento dos níveis nucleares da subunidade p65 em neurônios corticais tratados com BMAA (Silva et al., 2020). O resveratrol, por sua vez, não apenas preveniu o efeito do BMAA como reduziu a expressão desse fator de transcrição, que é um dos principais reguladores na transcrição de diversos fatores relacionados à inflamação, como citocinas, quimiocinas, enzimas e receptores (Giridharan and Srinivasan, 2018). Entre esses alvos transcricionais do NF κ B estão os genes de NLRP3, COX-2 e iNOS (Jung et al., 2019; Patel et al., 2017). As enzimas COX-2 e iNOS estão envolvidas na síntese de prostaglandinas e de NO, os quais também atuam como importantes mediadores inflamatórios (Ghasemi and Fatemi, 2014; Minghetti, 2004). BMAA e resveratrol modularam de maneira oposta a expressão gênica das enzimas COX-2 e iNOS, indicando os efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, respectivamente, dessas moléculas. Apesar do NLRP3 participar da maturação e conseqüente liberação da IL-1 β

(Heneka et al., 2018), e estar envolvido nos efeitos do BMAA em neurônios (Silva et al., 2020), não foi observada alteração da sua expressão gênica em células astrogliais.

A sinalização adenosinérgica desempenha importantes funções no SNC, e em células gliais está envolvida na modulação da resposta inflamatória (Almeida et al., 2017; Borea et al., 2016; Newell et al., 2015). Nesse sentido, Tsutsui et al. observou que a ativação do receptor A₁ atenuou a neuroinflamação em um modelo de esclerose múltipla, e que a expressão de IL-1 β e iNOS no cérebro de animais que não expressavam o receptor A₁ foi significativamente maior (Tsutsui, 2004). Quanto ao receptor A_{2A}, sua estimulação também é capaz de atenuar respostas inflamatórias induzidas por receptores do tipo Toll na microglia (van der Putten et al., 2009). Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente o envolvimento dos receptores de adenosina na atividade anti-inflamatória do resveratrol em astrócitos (Bobermin et al., 2019). Aqui, observou-se que o BMAA modulou negativamente a expressão dos receptores de adenosina, particularmente dos subtipos A₁ e A_{2A}, e que o resveratrol preveniu tal modulação causada pelo BMAA. Assim, o papel glioprotetor do resveratrol frente ao dano inflamatório causado pelo BMAA pode estar relacionado, pelo menos em parte, com a modulação dos receptores de adenosina.

Tanto os efeitos gliotóxicos do BMAA quanto os efeitos glioprotetores do resveratrol observados neste trabalho podem estar correlacionados com a modulação da expressão de diversas vias de sinalização que coordenam efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e mitocondriais. O Nrf2 regula a transcrição da enzima HO-1 e uma série de genes que codificam proteínas antioxidantes, incluindo SOD e GCL (Ahmed et al., 2017; Bellezza et al., 2018; Hayes and Dinkova-Kostova,

2014). A HO-1 exerce importantes efeitos anti-inflamatórios, já que alguns de seus produtos, como bilirrubina e CO, podem inibir a atividade da iNOS e a ativação do NFκB (Bellezza et al., 2018; Mancuso et al., 2014). Nosso grupo demonstrou o envolvimento da atividade da HO-1 na atenuação da ativação de NFκB pelo resveratrol (Bellaver et al., 2015b), bem como na modulação de outros parâmetros funcionais de células astrogliais, como a captação de glutamato e o metabolismo da GSH (Arús et al., 2017; Bellaver et al., 2015b). Embora os dados deste estudo não tenham mostrado um efeito do BMAA sobre a expressão de Nrf2 e HO-1, o resveratrol *per se* aumentou a expressão de ambas, corroborando o papel dessa via nos efeitos glioprotetores do resveratrol.

O PGC-1α é o regulador chave da biogênese mitocondrial, modulando proteínas que são essenciais para a transcrição do DNA mitocondrial e que ajudam a manter o número de cópias mitocondriais (Chen et al., 2013). Além de ampliar a capacidade antioxidante mitocondrial, níveis aumentados de PGC-1α diminuem a produção e secreção de IL-6 (Nijland et al., 2014). Tais efeitos anti-inflamatórios podem ser regulados por meio da interação molecular do PGC-1α com a subunidade p65 do NFκB (Rius-Pérez et al., 2020). Neste trabalho, foi observado um declínio expressivo dos níveis de RNAm de PGC-1α induzido pelo BMAA, apontando essa via como um potencial mecanismo para seus efeitos mitocondriais. O resveratrol, por outro lado, foi capaz de prevenir essa redução, bem como aumentou a expressão de PGC-1α em condições basais. Assim, a ação antioxidante do resveratrol em relação à expressão de SOD1 pode estar também relacionada com a ativação de PGC-1α (Qi et al., 2015).

A proteína AMPK regula diversas funções metabólicas e apresenta um potencial efeito modulatório na neuroinflamação (Peixoto et al., 2017), como por

exemplo, na inibição indireta da ativação do NFκB através de vias a jusante, como SIRT-1 e PGC-1α (Jeon, 2016). Além disso, a AMPK apresenta um papel na defesa antioxidante, podendo regular positivamente genes que codificam a enzima SOD (Greer et al., 2007). A ativação da desacetilase SIRT1, que também possui um papel regulatório em processos inflamatórios (Hwang et al., 2013), tem sido apontada como um dos principais mecanismos relacionados aos efeitos benéficos do resveratrol (Bhullar and Hubbard, 2015). No entanto, pelo menos em relação à transcrição, não foram observadas alterações de AMPK e SIRT1 em resposta tanto ao resveratrol quanto ao BMAA no modelo celular, concentrações e tempo de exposição utilizados nesta dissertação.

A via de sinalização PI3K/Akt regula uma variedade de processos biológicos e está intimamente ligada à sobrevivência celular, metabolismo celular e apoptose (Yan et al., 2020). Sua ativação pode inibir a apoptose induzida pelo estresse oxidativo, aumentando a expressão de SOD e contribuindo para a neuroproteção (Jiang et al., 2015). Além disso, alterações da sinalização mediada por PI3K e Akt promovem um aumento na inflamação (Merighi et al., 2006) e têm sido descritas em processos neurodegenerativos (Gabbouj et al., 2019). Assim, a diminuição da expressão de PI3K e Akt induzida pelo BMAA pode estar envolvida em suas ações gliotóxicas, enquanto a prevenção de tais efeitos pode representar um mecanismo adicional de proteção pelo resveratrol, que já têm sido associado à PI3K e Akt (Bastianetto et al., 2015).

As células astrogliais exercem funções críticas no SNC, tanto em condições fisiológicas, quanto patológicas. Os termos gliotoxicidade e glioproteção referem-se às alterações dessas funções, que refletem impactos diretos e indiretos na homeostase do SNC. Tais alterações implicam na capacidade dessas células em

protegerem a si mesmas e a outras populações celulares do SNC. Assim, a modulação da funcionalidade astrogliial pode representar um alvo para novas estratégias protetoras e, potencialmente, para o desenvolvimento de fármacos para condições patológicas que acometam o SNC (Quincozes-Santos et al., 2021).

Assim, este trabalho demonstrou a ação do BMAA sobre diversos parâmetros que estão envolvidos significativamente na homeostase do SNC. Até onde sabemos, nosso trabalho mostra pela primeira vez as modulações ocasionadas pelo BMAA sobre parâmetros glutamatérgicos, redox e inflamatórios em células astrogliais. Além disso, avaliamos os efeitos do resveratrol e seus possíveis mecanismos frente ao dano causado pelo BMAA, demonstrando uma potencial glioproteção pelo resveratrol, particularmente em relação à homeostase redox e à inflamação.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o BMAA modula importantes parâmetros celulares e moleculares astrogliais relacionados à homeostase e metabolismo do glutamato, ao equilíbrio redox, resposta inflamatória e vias de sinalização intracelulares, evidenciando o seu potencial gliotóxico. Os dados demonstram ainda que a toxicidade do BMAA pode ser prevenida pelo resveratrol, através da modulação e manutenção da funcionalidade astrogliar, corroborando suas ações glioprotetoras.

7 PERSPECTIVAS

- Caracterizar os efeitos do BMAA em cultura primária de astrócitos provenientes de ratos Wistar adultos;
- Investigar os mecanismos de transporte do BMAA em astrócitos através da análise da expressão e atividade do trocador x_c^- e da utilização de inibidores farmacológicos para esse trocador, bem como para os transportadores de glutamato (EAATs/EAAC1);
- Avaliar a expressão e atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo da GSH, como glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione S-transferase em cultura de astrócitos;
- Avaliar o conteúdo proteico e/ou ativação da subunidade p65 de NF κ B, NLRP3, PGC-1 α , PI3K, Akt, Nrf2, HO-1, AMPK e SIRT1 em cultura de astrócitos;
- Avaliar o potencial glioprotetor do resveratrol frente a toxicidade do BMMA em cultura de astrócitos de animais adultos, focando em diferentes concentrações e tempos de exposição ao resveratrol.
- Avaliar respostas de células neuronais ao meio condicionado de astrócitos expostos ao BMAA na presença e ausência de resveratrol, buscando compreender os efeitos da comunicação entre astrócitos e neurônios frente a toxicidade do BMAA e nos mecanismos glioprotetores do resveratrol.

8 APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, T., Javed, Sehrish, Javed, Sana, Tariq, A., Šamec, D., Tejada, S., Nabavi, S.F., Braidy, N., Nabavi, S.M., 2017. Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights. *Mol. Neurobiol.* 54, 2622–2635. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9839-9>
- Albano, R., Lobner, D., 2018. Transport of BMAA into Neurons and Astrocytes by System xc-. *Neurotox. Res.* 33, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9739-4>
- Almeida, R.F., Comasseto, D.D., Ramos, D.B., Hansel, G., Zimmer, E.R., Loureiro, S.O., Ganzella, M., Souza, D.O., 2017. Guanosine Anxiolytic-Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems. *Mol. Neurobiol.* 54, 423–436. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9660-x>
- Angelopoulou, E., Paudel, Y.N., Piperi, C., 2021. Emerging role of S100B protein implication in Parkinson's disease pathogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 1445–1453. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03673-x>
- Arús, B.A., Souza, D.G., Bellaver, B., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., 2017. Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 428, 67–77. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2917-5>
- Baber, Z., Haghghat, N., 2010. Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. *Metab. Brain Dis.* 25, 413–418. <https://doi.org/10.1007/s11011-010-9223-9>
- Banack, S.A., Caller, T.A., Stommel, E.W., 2010. The Cyanobacteria Derived Toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Toxins* 2, 2837–2850. <https://doi.org/10.3390/toxins2122837>
- Barros, M., Dey, S., 2018. Feed-forward and Feedback Control in Astrocytes for Ca²⁺-based Molecular Communications Nanonetworks. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 1–1. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2018.2887222>
- Bastianetto, S., Ménard, C., Quirion, R., 2015. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1852, 1195–1201. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.011>
- Bélanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2011. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- Bellaver, B., Bobermin, L.D., Souza, D.G., Rodrigues, M.D.N., de Assis, A.M., Wajner, M., Gonçalves, C.-A., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2016. Signaling mechanisms underlying the glioprotective effects of resveratrol against mitochondrial dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1862, 1827–1838. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.018>
- Bellaver, B., Souza, D.G., Bobermin, L.D., Gonçalves, C.-A., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2015a. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. *Purinergic Signal.* 11, 571–580. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9475-2>
- Bellaver, B., Souza, D.G., Bobermin, L.D., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., Quincozes-Santos, A., 2015b. Resveratrol Protects Hippocampal Astrocytes Against LPS-Induced Neurotoxicity Through HO-1, p38 and ERK Pathways. *Neurochem. Res.* 40, 1600–1608. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1636-8>

- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., Donato, R., 2018. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1865, 721–733. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W., 1968. Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science* 161, 370–371. <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.370>
- Benda, P., Someda, K., Messer, J., Sweet, W.H., 1971. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J. Neurosurg.* 34, 310–323. <https://doi.org/10.3171/jns.1971.34.3.0310>
- Bertelli, A.A., Giovannini, L., Giannessi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M., Bertelli, A., 1995. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue React.* 17, 1–3.
- Bhatia, T.N., Pant, D.B., Eckhoff, E.A., Gongaware, R.N., Do, T., Hutchison, D.F., Gleixner, A.M., Leak, R.K., 2019. Astrocytes Do Not Forfeit Their Neuroprotective Roles After Surviving Intense Oxidative Stress. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 87. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00087>
- Bhullar, K.S., Hubbard, B.P., 2015. Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1852, 1209–1218. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.01.012>
- Blanco, A.M., Pascual, M., Valles, S.L., Guerri, C., 2004. Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF- κ B: *NeuroReport* 15, 681–685. <https://doi.org/10.1097/00001756-200403220-00021>
- Błaszczuk, A., Siedlecka-Kroplewska, K., Woźniak, M., Mazur-Marzec, H., 2021. Presence of β -N-methylamino-L-alanine in cyanobacteria and aquatic organisms from waters of Northern Poland; BMAA toxicity studies. *Toxicol.* 194, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2021.02.007>
- Bobermin, L.D., de Souza Almeida, R.R., Weber, F.B., Medeiros, L.S., Medeiros, L., Wyse, A.T.S., Gonçalves, C.-A., Quincozes-Santos, A., 2022. Lipopolysaccharide Induces Gliotoxicity in Hippocampal Astrocytes from Aged Rats: Insights About the Glioprotective Roles of Resveratrol. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02664-8>
- Bobermin, L.D., Hansel, G., Scherer, E.B.S., Wyse, A.T.S., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., Gonçalves, C.-A., 2015. Ammonia impairs glutamatergic communication in astroglial cells: protective role of resveratrol. *Toxicol. In Vitro* 29, 2022–2029. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.08.008>
- Bobermin, L.D., Quincozes-Santos, A., Guerra, M.C., Leite, M.C., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., Gottfried, C., 2012. Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells. *PLoS ONE* 7, e52164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052164>
- Bobermin, L.D., Roppa, R.H.A., Quincozes-Santos, A., 2019. Adenosine receptors as a new target for resveratrol-mediated glioprotection. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1865, 634–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.004>
- Bobermin, L.D., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., Quincozes-Santos, A., 2018. Resveratrol prevents ammonia-induced mitochondrial dysfunction and cellular redox imbalance in C6 astroglial cells. *Nutr. Neurosci.* 21, 276–285. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1284375>
- Bobermin, L.D., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., Quincozes-Santos, A., 2013. Lipoic acid protects C6 cells against ammonia exposure through Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-

- transporter and PKC pathway. *Toxicol. In Vitro* 27, 2041–2048. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.07.006>
- Bolaños, J.P., 2016. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J. Neurochem.* 139, 115–125. <https://doi.org/10.1111/jnc.13486>
- Borea, P.A., Gessi, S., Merighi, S., Varani, K., 2016. Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.02.006>
- Burda, J.E., Sofroniew, M.V., 2014. Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron* 81, 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Butterfield, D.A., Halliwell, B., 2019. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 148–160. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>
- Caller, T., Henegan, P., Stommel, E., 2018. The Potential Role of BMAA in Neurodegeneration. *Neurotox. Res.* 33, 222–226. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9752-7>
- Cechin, S.R., Dunkley, P.R., Rodnight, R., 2005. Signal Transduction Mechanisms Involved in the Proliferation of C6 Glioma Cells Induced by Lysophosphatidic Acid. *Neurochem. Res.* 30, 603–611. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-2747-4>
- Chamorro, Á., Dirnagl, U., Urra, X., Planas, A.M., 2016. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol.* 15, 869–881. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00114-9)
- Chen, F., Liu, Y., Wong, N.-K., Xiao, J., So, K.-F., 2017. Oxidative Stress in Stem Cell Aging. *Cell Transplant.* 26, 1483–1495. <https://doi.org/10.1177/0963689717735407>
- Chen, S., Fan, Q., Li, A., Liao, D., Ge, J., Laties, A.M., Zhang, X., 2013. Dynamic mobilization of PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis for the protection of RGC-5 cells by resveratrol during serum deprivation. *Apoptosis* 18, 786–799. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0837-3>
- Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., Xu, J., Guo, G., Tong, A., Zhou, L., 2020. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif.* 53. <https://doi.org/10.1111/cpr.12781>
- Chen-Roetling, J., Kamalopathy, P., Cao, Y., Song, W., Schipper, H.M., Regan, R.F., 2017. Astrocyte heme oxygenase-1 reduces mortality and improves outcome after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Neurobiol. Dis.* 102, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.03.008>
- Chiu, A.S., Gehringer, M.M., Braidy, N., Guillemin, G.J., Welch, J.H., Neilan, B.A., 2013. Gliotoxicity of the cyanotoxin, β -methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Sci. Rep.* 3, 1482. <https://doi.org/10.1038/srep01482>
- Chiu, A.S., Gehringer, M.M., Braidy, N., Guillemin, G.J., Welch, J.H., Neilan, B.A., 2012. Excitotoxic potential of the cyanotoxin β -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicol.* 60, 1159–1165. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2012.07.169>
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13380–13383. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235808100>

- Cox, P.A., Davis, D.A., Mash, D.C., Metcalf, J.S., Banack, S.A., 2016. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20152397. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2397>
- Cox, P.A., Kostrzewa, R.M., Guillemin, G.J., 2018. BMAA and Neurodegenerative Illness. *Neurotox. Res.* 33, 178–183. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9753-6>
- Dall'Igna, O.P., Bobermin, L.D., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2013. Riluzole increases glutamate uptake by cultured C6 astroglial cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.06.002>
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)
- Danbolt, N.C., Furness, D.N., Zhou, Y., 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem. Int.* 98, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.009>
- Das, M., Das, D.K., 2010. Resveratrol and cardiovascular health. *Mol. Aspects Med.* 31, 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.001>
- 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-07-02475.1998>
- de Munck, E., Muñoz-Sáez, E., Miguel, B.G., Solas, M.T., Martínez, A., Arahuetes, R.M., 2015. Morphometric and neurochemical alterations found in I-BMAA treated rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 1232–1245. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.022>
- de Souza, D.F., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L.S., Rigo, M.M., Gottfried, C., Leal, R.B., Gonçalves, C.-A., 2009. S100B secretion is stimulated by IL-1 β in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J. Neuroimmunol.* 206, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.10.012>
- Delcourt, N., Claudepierre, T., Maignien, T., Arnich, N., Mattei, C., 2017. Cellular and Molecular Aspects of the β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) Mode of Action within the Neurodegenerative Pathway: Facts and Controversy. *Toxins* 10, 6. <https://doi.org/10.3390/toxins10010006>
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India* 52, 794–804.
- Di Meo, S., Venditti, P., 2020. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Diaz-parga, P., Goto, J.J., Krishnan, V.V., 2021. On the Differential Roles of Mg²⁺, Zn²⁺, and Cu²⁺ in the Equilibrium of β -N-Methyl-Amino-L-Alanine (BMAA) and its Carbamates. *Neurotox. Res.* 39, 6–16. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00157-0>
- Diaz-parga, P., Goto, J.J., Krishnan, V.V., 2018. Chemistry and Chemical Equilibrium Dynamics of BMAA and Its Carbamate Adducts. *Neurotox. Res.* 33, 76–86. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9801-2>

- Dienel, G.A., 2019. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiol. Rev.* 99, 949–1045. <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>
- dos Santos, A.Q., Nardin, P., Funchal, C., Vieira de Almeida, L.M., Jacques-Silva, M.C., Wofchuk, S.T., Gonçalves, C.-A., Gottfried, C., 2006. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 453, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.06.025>
- Dringen, R., Hirrlinger, J., 2003. Glutathione Pathways in the Brain. *Biol. Chem.* 384. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.059>
- Dringen, R., Pfeiffer, B., Hamprecht, B., 1999. Synthesis of the Antioxidant Glutathione in Neurons: Supply by Astrocytes of CysGly as Precursor for Neuronal Glutathione. *J. Neurosci.* 19, 562–569. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00562.1999>
- Dunlop, R.A., Cox, P.A., Banack, S.A., Rodgers, K.J., 2013. The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of L-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *PLoS ONE* 8, e75376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075376>
- Eidizadeh, A., Khajehalichalehshtari, M., Freyer, D., Trendelenburg, G., 2015. Assessment of the Therapeutic Potential of Metallothionein-II Application in Focal Cerebral Ischemia In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 10, e0144035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144035>
- Escartin, C., Joon Won, S., Malgorn, C., Auregan, G., Berman, A.E., Chen, P.-C., Deglon, N., Johnson, J.A., Won Suh, S., Swanson, R.A., 2011. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Facilitates Neuronal Glutathione Synthesis by Upregulating Neuronal Excitatory Amino Acid Transporter 3 Expression. *J. Neurosci.* 31, 7392–7401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6577-10.2011>
- Etchegoyen, M., Nobile, M.H., Baez, F., Posesorski, B., González, J., Lago, N., Milei, J., Otero-Losada, M., 2018. Metabolic Syndrome and Neuroprotection. *Front. Neurosci.* 12, 196. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00196>
- Feng, Z., Zhang, J., 2004. Protective effect of melatonin on β -amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1790–1801. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.023>
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., Bolaños, J.P., 2012. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* 443, 3–11. <https://doi.org/10.1042/BJ20111943>
- Flynn, J.M., Melov, S., 2013. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027>
- Frémont, L., Belguendouz, L., Delpal, S., 1999. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.* 64, 2511–2521. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00209-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00209-X)
- Funchal, C., dos Santos, A.Q., Jacques-Silva, M.C., Zamoner, A., Gottfried, C., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R., 2005. Branched-Chain α -Keto Acids Accumulating in Maple Syrup Urine Disease Induce Reorganization of Phosphorylated GFAP in C6-Glioma Cells. *Metab. Brain Dis.* 20, 205–217. <https://doi.org/10.1007/s11011-005-7208-x>
- Gabbouj, S., Ryhänen, S., Marttinen, M., Wittrahm, R., Takalo, M., Kempainen, S., Martiskainen, H., Tanila, H., Haapasalo, A., Hiltunen, M., Natunen, T., 2019.

- Altered Insulin Signaling in Alzheimer's Disease Brain – Special Emphasis on PI3K-Akt Pathway. *Front. Neurosci.* 13, 629. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00629>
- Galland, F., Seady, M., Taday, J., Smaili, S.S., Gonçalves, C.A., Leite, M.C., 2019. Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochem. Int.* 131, 104538. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104538>
- Ghasemi, M., Fatemi, A., 2014. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 45, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.06.002>
- Giovannoni, F., Quintana, F.J., 2020. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends Immunol.* 41, 805–819. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007>
- Giridharan, S., Srinivasan, M., 2018. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J. Inflamm. Res.* Volume 11, 407–419. <https://doi.org/10.2147/JIR.S140188>
- Gonçalves, C.-A., Concli Leite, M., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin. Biochem.* 41, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003>
- Greer, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., Brunet, A., 2007. The Energy Sensor AMP-activated Protein Kinase Directly Regulates the Mammalian FOXO3 Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* 282, 30107–30119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705325200>
- Griñán-Ferré, C., Bellver-Sanchis, A., Izquierdo, V., Corpas, R., Roig-Soriano, J., Chillón, M., Andres-Lacueva, C., Somogyvári, M., Sóti, C., Sanfeliu, C., Pallàs, M., 2021. The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy. *Ageing Res. Rev.* 67, 101271. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101271>
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., Matías-Guiu, J., 2015. Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología* 30, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
- Hamby, M.E., Sofroniew, M.V., 2010. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7, 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.003>
- Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A., 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., 2014. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 39, 199–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
- Heath, P.R., Shaw, P.J., 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26, 438–458. <https://doi.org/10.1002/mus.10186>
- Heneka, M.T., McManus, R.M., Latz, E., 2018. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 610–621. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>
- Hwang, J., Yao, H., Caito, S., Sundar, I.K., Rahman, I., 2013. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic. Biol. Med.* 61, 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.015>

- Jardim, F.R., de Rossi, F.T., Nascimento, M.X., da Silva Barros, R.G., Borges, P.A., Prescilio, I.C., de Oliveira, M.R., 2018. Resveratrol and Brain Mitochondria: a Review. *Mol. Neurobiol.* 55, 2085–2101. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0448-z>
- Jayakumar, A.R., Norenberg, M.D., 2016. Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders, in: Schousboe, A., Sonnewald, U. (Eds.), *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle, Advances in Neurobiology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 327–350. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_13
- Jensen, C.J., Massie, A., De Keyser, J., 2013. Immune Players in the CNS: The Astrocyte. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 824–839. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9480-6>
- Jeon, S.-M., 2016. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp. Mol. Med.* 48, e245–e245. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.81>
- Jiang, J., Wang, Z.-H., Qu, M., Gao, D., Liu, X.-P., Zhu, L.-Q., Wang, J.-Z., 2015. Stimulation of EphB2 attenuates tau phosphorylation through PI3K/Akt-mediated inactivation of glycogen synthase kinase-3 β . *Sci. Rep.* 5, 11765. <https://doi.org/10.1038/srep11765>
- Jiang, L., Eriksson, J., Lage, S., Jonasson, S., Shams, S., Mehine, M., Ilag, L.L., Rasmussen, U., 2014. Diatoms: A Novel Source for the Neurotoxin BMAA in Aquatic Environments. *PLoS ONE* 9, e84578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084578>
- Jiao, F., Gong, Z., 2020. The Beneficial Roles of SIRT1 in Neuroinflammation-Related Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2020/6782872>
- Jones, E.V., Bouvier, D.S., 2014. Astrocyte-Secreted Matricellular Proteins in CNS Remodelling during Development and Disease. *Neural Plast.* 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/321209>
- Jornayvaz, F.R., Shulman, G.I., 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 47, 69–84. <https://doi.org/10.1042/bse0470069>
- Jung, Y.J., Tweedie, D., Scerba, M.T., Greig, N.H., 2019. Neuroinflammation as a Factor of Neurodegenerative Disease: Thalidomide Analogs as Treatments. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 313. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00313>
- Karaca, M., Frigerio, F., Migrenne, S., Martin-Levilain, J., Skytt, D.M., Pajacka, K., Martin-del-Rio, R., Gruetter, R., Tamarit-Rodriguez, J., Waagepetersen, H.S., Magnan, C., Maechler, P., 2015. GDH-Dependent Glutamate Oxidation in the Brain Dictates Peripheral Energy Substrate Distribution. *Cell Rep.* 13, 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.003>
- Khatri, N., Thakur, M., Pareek, V., Kumar, S., Sharma, S., Datusalia, A.K., 2018. Oxidative Stress: Major Threat in Traumatic Brain Injury. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 17, 689–695. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180627120501>
- Kofuji, P., Araque, A., 2021. G-Protein-Coupled Receptors in Astrocyte–Neuron Communication. *Neuroscience* 456, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.025>
- Krencik, R., van Asperen, J.V., Ullian, E.M., 2017. Human astrocytes are distinct contributors to the complexity of synaptic function. *Brain Res. Bull.* 129, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.012>
- Kung, H.-C., Lin, K.-J., Kung, C.-T., Lin, T.-K., 2021. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroprotection of Polyphenols with Respect to Resveratrol

- in Parkinson's Disease. *Biomedicines* 9, 918. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080918>
- Lee, K.H., Cha, M., Lee, B.H., 2021. Crosstalk between Neuron and Glial Cells in Oxidative Injury and Neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13315. <https://doi.org/10.3390/ijms222413315>
- Lekakis, J., Rallidis, L.S., Andreadou, I., Vamvakou, G., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L., Kremastinos, D.T., 2005. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease: *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 12, 596–600. <https://doi.org/10.1097/00149831-200512000-00013>
- Li, A., Tian, Z., Li, J., Yu, R., Banack, S.A., Wang, Z., 2010. Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Toxicon* 55, 947–953. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.023>
- Liddel, S.A., Barres, B.A., 2017. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46, 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liebner, S., Dijkhuizen, R.M., Reiss, Y., Plate, K.H., Agalliu, D., Constantin, G., 2018. Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 135, 311–336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- Linton, M.F., Moslehi, J.J., Babaev, V.R., 2019. Akt Signaling in Macrophage Polarization, Survival, and Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2703. <https://doi.org/10.3390/ijms20112703>
- Lobner, D., 2009. Mechanisms of β - N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 56–60. <https://doi.org/10.3109/17482960903269062>
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830, 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Mack, A.F., Wolburg, H., 2013. A Novel Look at Astrocytes: Aquaporins, Ionic Homeostasis, and the Role of the Microenvironment for Regeneration in the CNS. *The Neuroscientist* 19, 195–207. <https://doi.org/10.1177/1073858412447981>
- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., Gris, D., 2019. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells* 8, 184. <https://doi.org/10.3390/cells8020184>
- Malaguarrera, 2019. Influence of Resveratrol on the Immune Response. *Nutrients* 11, 946. <https://doi.org/10.3390/nu11050946>
- Mancuso, R., del Valle, J., Modol, L., Martinez, A., Granado-Serrano, A.B., Ramirez-Núñez, O., Pallás, M., Portero-Otin, M., Osta, R., Navarro, X., 2014. Resveratrol Improves Motoneuron Function and Extends Survival in SOD1G93A ALS Mice. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0253-y>
- McBean, G., 2017. Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes. *Antioxidants* 6, 62. <https://doi.org/10.3390/antiox6030062>
- Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Leung, E., MacLennan, S., Baraldi, P.G., Borea, P.A., 2006. Modulation of the Akt/Ras/Raf/MEK/ERK pathway by A3 adenosine receptor. *Purinergic Signal.* 2, 627–632. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9020-4>
- Mills, J.H., Kim, D.-G., Krenz, A., Chen, J.-F., Bynoe, M.S., 2012. A2A Adenosine Receptor Signaling in Lymphocytes and the Central Nervous System

- Regulates Inflammation during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 188, 5713–5722. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200545>
- Minghetti, L., 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 901–910. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.9.901>
- Moraes, D.S., Moreira, D.C., Andrade, J.M.O., Santos, S.H.S., 2020. Sirtuins, brain and cognition: A review of resveratrol effects. *IBRO Rep.* 9, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.06.004>
- Moulson, A.J., Squair, J.W., Franklin, R.J.M., Tetzlaff, W., Assinck, P., 2021. Diversity of Reactive Astroglia in CNS Pathology: Heterogeneity or Plasticity? *Front. Cell. Neurosci.* 15, 703810. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.703810>
- Moussa, C., Hebron, M., Huang, X., Ahn, J., Rissman, R.A., Aisen, P.S., Turner, R.S., 2017. Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 14, 1. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0779-0>
- Musgrove, R.E., Helwig, M., Bae, E.-J., Aboutaleb, H., Lee, S.-J., Ulusoy, A., Di Monte, D.A., 2019. Oxidative stress in vagal neurons promotes parkinsonian pathology and intercellular α -synuclein transfer. *J. Clin. Invest.* 129, 3738–3753. <https://doi.org/10.1172/JCI127330>
- Newell, E.A., Exo, J.L., Verrier, J.D., Jackson, T.C., Gillespie, D.G., Janesko-Feldman, K., Kochanek, P.M., Jackson, E.K., 2015. 2',3'-cAMP, 3'-AMP, 2'-AMP and adenosine inhibit TNF- α and CXCL10 production from activated primary murine microglia via A2A receptors. *Brain Res.* 1594, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.059>
- Niciu, M.J., Kelmendi, B., Sanacora, G., 2012. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.08.008>
- Nijland, P.G., Witte, M.E., van het Hof, B., van der Pol, S., Bauer, J., Lassmann, H., van der Valk, P., de Vries, H.E., van Horssen, J., 2014. Astroglial PGC-1 α increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: implications for multiple sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 170. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0170-2>
- Nunes-Costa, D., Magalhães, J.D., G-Fernandes, M., Cardoso, S.M., Empadinhas, N., 2020. Microbial BMAA and the Pathway for Parkinson's Disease Neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* 12, 26. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00026>
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U., Dietrich, D.R., 2013. L-BMAA Induced ER Stress and Enhanced Caspase 12 Cleavage in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells at Low Nonexcitotoxic Concentrations. *Toxicol. Sci.* 131, 217–224. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs291>
- Pablo, J., Banack, S.A., Cox, P.A., Johnson, T.E., Papapetropoulos, S., Bradley, W.G., Buck, A., Mash, D.C., 2009. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 120, 216–225. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01150.x>
- Park, E., Gim, J., Kim, D.K., Kim, C.-S., Chun, H.S., 2019. Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Glutamate-Induced Cytotoxicity in C6 Glioma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 42, 94–102. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00603>
- Patel, M.N., Carroll, R.G., Galván-Peña, S., Mills, E.L., Olden, R., Triantafyllou, M., Wolf, A.I., Bryant, C.E., Triantafyllou, K., Masters, S.L., 2017. Inflammasome

- Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends Mol. Med.* 23, 165–180. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.12.007>
- Peixoto, C.A., Oliveira, W.H. de, Araújo, S.M. da R., Nunes, A.K.S., 2017. AMPK activation: Role in the signaling pathways of neuroinflammation and neurodegeneration. *Exp. Neurol.* 298, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.08.013>
- Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–434. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M., 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci. Lett.* 565, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071>
- Pervaiz, S., 2003. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 17, 1975–1985. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0168rev>
- Pope, S.A.S., Milton, R., Heales, S.J.R., 2008. Astrocytes Protect Against Copper-Catalysed Loss of Extracellular Glutathione. *Neurochem. Res.* 33, 1410–1418. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9602-3>
- Proctor, E.A., Mowrey, D.D., Dokholyan, N.V., 2019. β -Methylamino-L-alanine substitution of serine in SOD1 suggests a direct role in ALS etiology. *PLOS Comput. Biol.* 15, e1007225. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007225>
- Qi, Y., Yin, X., Wang, S., Jiang, H., Wang, X., Ren, M., Su, X., Lei, S., Feng, H., 2015. PGC-1 α Silencing Compounds the Perturbation of Mitochondrial Function Caused by Mutant SOD1 in Skeletal Muscle of ALS Mouse Model. *Front. Aging Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00204>
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., de Assis, A.M., Gonçalves, C.-A., Souza, D.O., 2017. Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1863, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.09.013>
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., Gottfried, C., 2013. Resveratrol Protects C6 Astrocyte Cell Line against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress through Heme Oxygenase 1. *PLoS ONE* 8, e64372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064372>
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Souza, D.G., Bellaver, B., Gonçalves, C.-A., Souza, D.O., 2014. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. *J. Neurochem.* 130, 61–74. <https://doi.org/10.1111/jnc.12694>
- Quincozes-Santos, A., Santos, C.L., de Souza Almeida, R.R., da Silva, A., Thomaz, N.K., Costa, N.L.F., Weber, F.B., Schmitz, I., Medeiros, L.S., Medeiros, L., Dotto, B.S., Dias, F.R.P., Sovrani, V., Bobermin, L.D., 2021. Gliotoxicity and Glioprotection: the Dual Role of Glial Cells. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02574-9>
- Raza, C., Anjum, R., Shakeel, N. ul A., 2019. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci.* 226, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
- Renaud, S., de Lorgeril, M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339, 1523–1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-F)
- Rial, D., Lemos, C., Pinheiro, H., Duarte, J.M., Gonçalves, F.Q., Real, J.I., Prediger, R.D., Gonçalves, N., Gomes, C.A., Canas, P.M., Agostinho, P., Cunha, R.A.,

2016. Depression as a Glial-Based Synaptic Dysfunction. *Front. Cell. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00521>
- Rius-Pérez, S., Torres-Cuevas, I., Millán, I., Ortega, Á.L., Pérez, S., 2020. PGC-1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2020/1452696>
- Robinson, M.B., 2006. Acute Regulation of Sodium-Dependent Glutamate Transporters: A Focus on Constitutive and Regulated Trafficking, in: Sitte, H.H., Freissmuth, M. (Eds.), *Neurotransmitter Transporters, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 251–275. https://doi.org/10.1007/3-540-29784-7_13
- Salomonsson, M.L., Fredriksson, E., Alfjorden, A., Hedeland, M., Bondesson, U., 2015. Seafood sold in Sweden contains BMAA: A study of free and total concentrations with UHPLC–MS/MS and dansyl chloride derivatization. *Toxicol. Rep.* 2, 1473–1481. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.002>
- Sandberg, M., Patil, J., D'Angelo, B., Weber, S.G., Mallard, C., 2014. NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology* 79, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.11.004>
- Saxton, R.A., Sabatini, D.M., 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schousboe, A., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., 2013. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front. Endocrinol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00102>
- Shinozaki, Y., Shibata, K., Yoshida, K., Shigetomi, E., Gachet, C., Ikenaka, K., Tanaka, K.F., Koizumi, S., 2017. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y 1 Receptor Downregulation. *Cell Rep.* 19, 1151–1164. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.047>
- Sigfridsson, E., Marangoni, M., Johnson, J.A., Hardingham, G.E., Fowler, J.H., Horsburgh, K., 2018. Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 protects against optic tract damage and behavioural alterations in a mouse model of cerebral hypoperfusion. *Sci. Rep.* 8, 12552. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30675-4>
- Silva, D.F., Candeias, E., Esteves, A.R., Magalhães, J.D., Ferreira, I.L., Nunes-Costa, D., Rego, A.C., Empadinhas, N., Cardoso, S.M., 2020. Microbial BMAA elicits mitochondrial dysfunction, innate immunity activation, and Alzheimer's disease features in cortical neurons. *J. Neuroinflammation* 17, 332. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02004-y>
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S., 2019. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24, 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Smith, E.F., Shaw, P.J., De Vos, K.J., 2019. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 710, 132933. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.052>
- Sofroniew, M.V., 2020. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends Immunol.* 41, 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>
- Souza, D.G., Almeida, R.F., Souza, D.O., Zimmer, E.R., 2019. The astrocyte biochemistry. *Semin. Cell Dev. Biol.* 95, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.002>

- Sovrani, V., Bobermin, L.D., Schmitz, I., Leipnitz, G., Quincozes-Santos, A., 2021. Potential Glioprotective Strategies Against Diabetes-Induced Brain Toxicity. *Neurotox. Res.* 39, 1651–1664. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00393-3>
- Trabelsi, Y., Amri, M., Becq, H., Molinari, F., Aniksztejn, L., 2017. The conversion of glutamate by glutamine synthase in neocortical astrocytes from juvenile rat is important to limit glutamate spillover and peri/extrasynaptic activation of NMDA receptors: GS Inhibition Reduces EAATs Efficiency. *Glia* 65, 401–415. <https://doi.org/10.1002/glia.23099>
- Tsutsui, S., 2004. A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.* 24, 1521–1529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4271-03.2004>
- van der Putten, C., Zuiderwijk-Sick, E.A., van Straalen, L., de Geus, E.D., Boven, L.A., Kondova, I., IJzerman, A.P., Bajramovic, J.J., 2009. Differential Expression of Adenosine A₃ Receptors Controls Adenosine A_{2A} Receptor-Mediated Inhibition of TLR Responses in Microglia. *J. Immunol.* 182, 7603–7612. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803383>
- Vargas, M.R., Johnson, J.A., 2009. The Nrf2–ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, e17. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001094>
- Verkhatsky, A., Nedergaard, M., 2018. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 98, 151.
- Vieira de Almeida, L.M., Piñeiro, C.C., Leite, M.C., Brolese, G., Tramontina, F., Feoli, A.M., Gottfried, C., Gonçalves, C.-A., 2007. Resveratrol Increases Glutamate Uptake, Glutathione Content, and S100B Secretion in Cortical Astrocyte Cultures. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 661–668. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9152-2>
- Violi, J.P., Mitrovic, S.M., Colville, A., Main, B.J., Rodgers, K.J., 2019. Prevalence of β -methylamino-L-alanine (BMAA) and its isomers in freshwater cyanobacteria isolated from eastern Australia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.046>
- Wang, C., Yan, C., Qiu, J., Liu, C., Yan, Y., Ji, Y., Wang, G., Chen, H., Li, Y., Li, A., 2021. Food web biomagnification of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in a diatom-dominated marine ecosystem in China. *J. Hazard. Mater.* 404, 124217. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124217>
- Wang, D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* S030100820800110X. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.015>
- Wang, G., Hu, Z., Fu, Q., Song, X., Cui, Q., Jia, R., Zou, Y., He, C., Li, L., Yin, Z., 2017. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide-mediated acute inflammation in rats by inhibiting the TLR4/NF- κ Bp65/MAPKs signaling cascade. *Sci. Rep.* 7, 45006. <https://doi.org/10.1038/srep45006>
- Yan, Y., Yang, H., Xie, Y., Ding, Y., Kong, D., Yu, H., 2020. Research Progress on Alzheimer's Disease and Resveratrol. *Neurochem. Res.* 45, 989–1006. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03007-0>
- Yáñez, M., Galán, L., Matías-Guiu, J., Vela, A., Guerrero, A., García, A.G., 2011. CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: Protection by resveratrol but not riluzole. *Brain Res.* 1423, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.09.025>
- Yi, W., Schlüter, D., Wang, X., 2019. Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating

- the darkness of CNS autoimmunity. *Brain. Behav. Immun.* 80, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.029>
- Yin, H.Z., Yu, S., Hsu, C.-I., Liu, J., Acab, A., Wu, R., Tao, A., Chiang, B.J., Weiss, J.H., 2014. Intrathecal infusion of BMAA induces selective motor neuron damage and astrogliosis in the ventral horn of the spinal cord. *Exp. Neurol.* 261, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.003>
- Yudkoff, M., 2017. Interactions in the Metabolism of Glutamate and the Branched-Chain Amino Acids and Ketoacids in the CNS. *Neurochem. Res.* 42, 10–18. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2057-z>
- Zhang, J.-M., An, J., 2007. Cytokines, Inflammation, and Pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- Zhang, L., Yu, X., Ji, M., Liu, S., Wu, X., Wang, Y., Liu, R., 2018. Resveratrol alleviates motor and cognitive deficits and neuropathology in the A53T α -synuclein mouse model of Parkinson's disease. *Food Funct.* 9, 6414–6426. <https://doi.org/10.1039/C8FO00964C>
- Zhang, Y., Luan, D., Liu, Y., Li, H., Dong, J., Zhang, X., Yuan, L., Zhong, Z., Jiang, L., Li, X., Ye, M., Tong, J., 2020. Helicid Reverses Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Promotes GDNF Levels in C6 Glioma Cells through Modulation of Prepronociceptin. *Chem. Biodivers.* 17. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000063>
- Zhao, H., Wang, Q., Cheng, X., Li, X., Li, N., Liu, T., Li, J., Yang, Q., Dong, R., Zhang, Y., Zhang, L., 2018. Inhibitive Effect of Resveratrol on the Inflammation in Cultured Astrocytes and Microglia Induced by A β 1–42. *Neuroscience* 379, 390–404. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.047>
- Zhao, M., Lewis Wang, F.S., Hu, X., Chen, F., Chan, H.M., 2017. Acrylamide-induced neurotoxicity in primary astrocytes and microglia: Roles of the Nrf2-ARE and NF- κ B pathways. *Food Chem. Toxicol.* 106, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.007>
- Zhu, X., Liu, Q., Wang, M., Liang, M., Yang, X., Xu, X., Zou, H., Qiu, J., 2011. Activation of Sirt1 by Resveratrol Inhibits TNF- α Induced Inflammation in Fibroblasts. *PLoS ONE* 6, e27081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027081>
- Zimmerman, D., Goto, J.J., Krishnan, V.V., 2016. Equilibrium Dynamics of β -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) and Its Carbamate Adducts at Physiological Conditions. *PLOS ONE* 11, e0160491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160491>
- Zusso, M., Lunardi, V., Franceschini, D., Pagetta, A., Lo, R., Stifani, S., Frigo, A.C., Giusti, P., Moro, S., 2019. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- κ B pathway. *J. Neuroinflammation* 16, 148. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1538-9>

10 LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do aminoácido β -N-metilamino-L-alanina (BMAA).

Figura 2: Estrutura química do resveratrol.