

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**ESTUDO ONTOGÊNICO DA UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES  
ENERGÉTICOS EM CEREBELO DE RATOS**

**DENISE BUENO**

**ORIENTADOR**

**Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.**

**Porto Alegre**

**1999**

**Dedico este trabalho :**

**Aos meus pais e aos meus irmãos  
que me ensinaram a buscar objetivos.**

**Ao Walmir que na sua cumplicidade  
do dia-a-dia tanto me fortaleceu.**

**A Lidia pelo sorriso diário que  
ilumina todos os dias.**

**Ao bebê que ainda não chegou,  
mas que já me fala do futuro.**

**E a Elisa ( *in memoriam* ) que me  
ensinou o que é persistência.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcos L.S. Perry que através do seu conhecimento, orientação e presença constante tornou possível a realização desta tese.

À Professora Vera Treis Trindade que como exemplo de educadora tem me acompanhado, não só quando foi paraninfa da minha turma de formatura, como em todos os momentos de dúvidas e incertezas profissionais.

À colega Ana Maria Azevedo pela acolhida no grupo.

À colega Ione R. Azzolin pelos ensinamentos .

À colega Maria Terezinha O. Govinatzki pela alegria da convivência no grupo de trabalho .

Ao bolsista Fabiano Nagel por sua valiosa colaboração.

Ao Professor Carlos Alexandre Netto pelo estímulo e apoio.

Ao Professor Clóvis M.D. Wannmacher pelo exemplo de mestre.

Ao Professor Diogo O. Souza pelo incentivo aos alunos do pós-graduação do Departamento de Bioquímica.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica da UFRGS pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica pelos préstimos a nível de biotério, lavagem de material e manutenção dos equipamentos.

Aos demais colegas do Departamento de Bioquímica que em etapas distintas deste trabalho foram importantes contribuindo para a conclusão deste.

Ao pessoal das secretarias do Departamento de Bioquímica e do pós-graduação pela grande ajuda nas diversas etapas desta tese, especialmente a Cléia.

Ao Paulo, Ana, Norma, Vera, Miriam, Cleusa e Tânia pela valorosa amizade da troca de idéias.

Aos meus amigos pelo apoio.

A minha família que soube compreender os momentos de ausência.

Ao CNPq, FAPERGS, FINEP e PROPESP- UFRGS, pelos auxílios à pesquisa.

## ARTIGOS PUBLICADOS

-Artigo publicado com dados desta Tese :

BUENO, D. , AZZOLIN,I.R. and PERRY, M.L.S. Ontogenetic study of glucose and lactate utilisation by cerebellum slices. **Medical Science Research**, v.22, p.631-632, 1994.

-Artigo publicado durante a execução desta Tese :

GOVINATZKI, M.T.O., VELLEDA, L.S. , TRINDADE, V.M.T. , NAGEL, F.M. , BUENO,D. and PERRY, M.L.S. Amino acid metabolism by rat hippocampus during the period of brain growth spurt. **Neurochemical Research**, v.22, p.23-26 ,1997.

# SUMÁRIO

<b><u>I. INTRODUÇÃO</u></b> .....	1
<b>I.1. Crescimento cerebral</b> .....	1
<b>I.2. Desenvolvimento cerebelar</b> .....	6
<b>I.3. Metabolismo energético cerebral</b> .....	11
<b>I.4. Estudo ontogênico do metabolismo cerebral</b> .....	12
<b>I.4.1. Período fetal tardio</b> .....	13
<b>I.4.2. Período neonatal precoce</b> .....	13
<b>I.4.3. Desenvolvimento da glicogenólise hepática ao nascimento</b> .....	17
<b>I.4.4. Desenvolvimento da gliconeogênese hepática ao nascimento</b> .....	18
<b>I.4.5. Período de lactação</b> .....	19
<b>I.4.6. Diferenças arteriovenosas de glicose e corpos cetônicos no cérebro de ratos durante o período de lactação</b> .....	20
<b>I.5. Transporte através da barreira hematoencefálica de glicose e corpos cetônicos em ratos imaturos</b> .....	22
<b>I.5.1. Mudanças ontogênicas no transporte da glicose</b> .....	23
<b>I.5.2. Mudanças ontogênicas no transporte dos ácidos monocarboxílicos</b> .....	25
<b>I.5.2.1. Transporte de corpos cetônicos</b> .....	25
<b>I.5.2.2. Transporte de lactato e piruvato</b> .....	26

<b>I.6. Utilização ontogênica de nutrientes energéticos pelo cérebro de ratos.....</b>	<b>27</b>
<b>I.6.1. Utilização de lactato cerebral no período perinatal.....</b>	<b>27</b>
<b>I.7. Regulação da glicogênese hepática no recém-nascido.....</b>	<b>30</b>
<b>I.8. Corpos cetônicos como substratos importantes no período de lactação.....</b>	<b>31</b>
<b>I.8.1. Mecanismos regulatórios da cetogênese.....</b>	<b>32</b>
<b>I.8.2. Efeito modulador da malonil-CoA durante a transição fetal-neonatal.....</b>	<b>34</b>
<b>I.8.3. Cetogênese no primeiro dia de vida pós-natal.....</b>	<b>35</b>
<b>I.9. Interação entre oxidação de ácidos graxos livres, cetogênese e gliconeogênese em ratos recém-nascidos.....</b>	<b>39</b>
<b>I.10. Utilização cerebral de corpos cetônicos.....</b>	<b>41</b>
<b>I.11. Síntese de lipídios cerebrais a partir de glicose e de corpos cetônicos.....</b>	<b>41</b>
<b>I.12. Síntese de lipídios a partir de glicose em cérebro de ratos imaturos.....</b>	<b>42</b>
<b>I.13. Síntese de lipídios a partir de corpos cetônicos em cérebros de ratos imaturos.....</b>	<b>43</b>
<b>I.13.1. Evolução pós-natal da velocidade de síntese de lipídios a partir de corpos cetônicos em cérebro de ratos.....</b>	<b>43</b>
<b>I.14. Interações entre a utilização de corpos cetônicos e glicose em cérebro de ratos imaturos.....</b>	<b>44</b>
<b>I.15. Mudanças ontogênicas na atividade enzimática .....</b>	<b>45</b>
<b>I.16. Metabolismo da glicina.....</b>	<b>46</b>
<b>I.17. Metabolismo da glutamina.....</b>	<b>50</b>
<b>I.18. Metabolismo do glicerol.....</b>	<b>51</b>

<b>II.OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>III.<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>.....</b>	<b>54</b>
<b>III.1. Materiais.....</b>	<b>54</b>
<b>III.1.1. Reagentes.....</b>	<b>54</b>
<b>III.1.2. Animais Experimentais.....</b>	<b>55</b>
<b>III.2. Métodos.....</b>	<b>55</b>
<b>III.2.1. Modelo Experimental de Ontogenia.....</b>	<b>55</b>
<b>III.2.2. Isolamento dos Cerebelos.....</b>	<b>56</b>
<b>III.2.3. Composição da Solução de         Krebs Ringer bicarbonato.....</b>	<b>56</b>
<b>III.2.4. Condições de incubação .....</b>	<b>57</b>
<b>III.2.5. Determinação da captação de CO<sub>2</sub>         a partir dos substratos utilizados.....</b>	<b>59</b>
<b>III.2.6. Determinação de lipídios         a partir dos substratos utilizados.....</b>	<b>59</b>
<b>III.2.7. Curvas de Concentração.....</b>	<b>60</b>
<b>III.2.8. Análise Estatística.....</b>	<b>60</b>
<b>IV.<u>RESULTADOS</u> .....</b>	<b>63</b>
<b>IV.1. Curvas de Concentração.....</b>	<b>63</b>
<b>IV.1.1. Curvas de Concentração para Glicose.....</b>	<b>63</b>
<b>IV.1.2. Curvas de Concentração para Lactato.....</b>	<b>66</b>
<b>IV.1.3. Curvas de Concentração para         βOH-Butirato.....</b>	<b>68</b>
<b>IV.1.4. Curvas de Concentração para Glicerol.....</b>	<b>70</b>
<b>IV.1.5. Curvas de Concentração para Glicina.....</b>	<b>72</b>

IV.1.6. Curvas de Concentração para Glutamina.....	74
IV.2. Metabolismo Ontogênico da Glicose, Lactato, βOH-Butirato, Glicerol, Glicina e Glutamina.....	76
IV.2.1. Metabolismo da Glicose em relação a idade dos animais.....	76
IV.2.2. Metabolismo do Lactato em relação a idade dos animais.....	79
IV.2.3. Metabolismo do βOH-Butirato em relação a idade dos animais.....	82
IV.2.4. Metabolismo do Glicerol em relação a idade dos animais.....	85
IV.2.5. Metabolismo da Glicina em relação a idade dos animais.....	87
IV.2.6. Metabolismo da Glutamina em relação a idade dos animais.....	90
IV.3. Perfil Ontogênico Comparativo da Utilização de nutrientes energéticos por fatias de cerebelo.....	93
IV.3.1. Idade fetal.....	93
IV.3.2. Idade de 10 dias.....	97
IV.3.3. Idade de 21 dias.....	101
IV.3.4. Idade adulta.....	105
IV.4. Competição de nutrientes energéticos.....	109
IV.5. Vias Metabólicas da Glicina marcada no Carbono 1 ou no carbono 2.....	113

<b>V. <u>DISCUSSÃO</u></b> .....	<b>116</b>
<b>VI. <u>CONCLUSÕES</u></b> .....	<b>146</b>
<b>VII. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	<b>149</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA I.1.Citoarquitetura do córtex cerebelar.....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURA I.2.Vias de catabolismo da glicina.....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA III.1.Metodologia empregada na incubação e avaliação da oxidação de substratos energéticos a CO<sub>2</sub> e determinação de lipídios.....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA III.2.Condições de incubação, avaliação da oxidação de substratos energéticos a CO<sub>2</sub> e determinação de lipídios.....</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA IV.1.Curva de concentração da glicose oxidada a CO<sub>2</sub> em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.....</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA IV.2.Curva de concentração da glicose convertida a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.....</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA IV.3.Curva de concentração do lactato oxidado a CO<sub>2</sub> em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURA IV.4.Curva de concentração do lactato convertido a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.....</b>	<b>67</b>
<b>FIGURA IV.5.Curva de concentração do βOH-Butirato oxidado a CO<sub>2</sub> em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.....</b>	<b>68</b>

<b>FIGURA IV.6.</b> Curva de concentração do $\beta$ OH-Butirato convertido a lipídios, em fatias de cerebello de ratos de 10 dias de idade.....	<b>69</b>
<b>FIGURA IV.7.</b> Curva de concentração do glicerol oxidado a $CO_2$ , em fatias de cerebello de ratos de 10 dias de idade.....	<b>70</b>
<b>FIGURA IV.8.</b> Curva de concentração do glicerol convertido a lipídios, em fatias de cerebello de ratos de 10 dias de idade.....	<b>71</b>
<b>FIGURA IV.9.</b> Curva de concentração da glicina oxidada a $CO_2$ , em fatias de cerebello de ratos de 10 dias de idade.....	<b>72</b>
<b>FIGURA IV.10.</b> Curva de concentração da glicina convertida a lipídios, em fatias de cerebello de ratos de 10 dias de idade.....	<b>73</b>
<b>FIGURA IV.11.</b> Curva de concentração da glutamina oxidada a $CO_2$ , em fatias de cerebello de ratos de 10 dias de idade.....	<b>74</b>
<b>FIGURA IV.12.</b> Curva de concentração da glutamina convertida a lipídios, em fatias de cerebello de ratos de 10 dias de idade.....	<b>75</b>
<b>FIGURA IV.13.</b> Oxidação da glicose a $CO_2$ , em fatias de cerebello de ratos em diferentes idades.....	<b>77</b>
<b>FIGURA IV.14.</b> Glicose convertida a lipídios, em fatias de cerebello de ratos em diferentes idades.....	<b>78</b>
<b>FIGURA IV.15.</b> Oxidação do lactato a $CO_2$ , em fatias de cerebello de ratos em diferentes idades.....	<b>80</b>

<b>FIGURA IV.16.</b> Lactato convertido a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos em diferentes idades.....	<b>81</b>
<b>FIGURA IV.17.</b> Oxidação do $\beta$ OH-Butirato a $\text{CO}_2$ , em fatias de cerebelo de ratos em diferentes idades.....	<b>83</b>
<b>FIGURA IV.18.</b> $\beta$ OH-Butirato convertido a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos em diferentes idades.....	<b>84</b>
<b>FIGURA IV.19.</b> Glicerol oxidado a $\text{CO}_2$ , em fatias de cerebelo de de ratos em diferentes idades.....	<b>85</b>
<b>FIGURA IV.20.</b> Glicerol convertido a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.....	<b>86</b>
<b>FIGURA IV.21.</b> Glicina oxidada a $\text{CO}_2$ , em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.....	<b>88</b>
<b>FIGURA IV.22.</b> Glicina convertida a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.....	<b>89</b>
<b>FIGURA IV.23.</b> Glutamina oxidada a $\text{CO}_2$ , em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.....	<b>91</b>
<b>FIGURA IV.24.</b> Glutamina convertida a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.....	<b>92</b>
<b>FIGURA IV.25.</b> Utilização dos nutrientes energéticos na idade fetal , oxidação a $\text{CO}_2$ da glicose, lactato, $\beta$ OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.....	<b>94</b>

<b>FIGURA IV.26.Utilização dos nutrientes energéticos na idade fetal, conversão a lipídios a partir da glicose, lactato, <math>\beta</math>OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.....</b>	<b>96</b>
<b>FIGURA IV.27.Utilização dos nutrientes energéticos na idade de 10 dias, oxidação a <math>\text{CO}_2</math> da glicose, lactato, <math>\beta</math>OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.....</b>	<b>98</b>
<b>FIGURA IV.28.Utilização dos nutrientes energéticos na idade de 10 dias, conversão a lipídios a partir da glicose, lactato, <math>\beta</math>OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.....</b>	<b>100</b>
<b>FIGURA IV.29.Utilização dos nutrientes energéticos na idade de 21 dias, oxidação a <math>\text{CO}_2</math> da glicose, lactato, <math>\beta</math>OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.....</b>	<b>102</b>
<b>FIGURA IV.30.Utilização dos nutrientes energéticos na idade de 21 dias, conversão a lipídios a partir da glicose, lactato, <math>\beta</math>OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.....</b>	<b>104</b>
<b>FIGURA IV.31.Utilização dos nutrientes energéticos na idade adulta , oxidação a <math>\text{CO}_2</math> da glicose, lactato, <math>\beta</math>OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.....</b>	<b>106</b>
<b>FIGURA IV.32.Utilização dos nutrientes energéticos na idade adulta, conversão a lipídios a partir da glicose, lactato, <math>\beta</math>OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.....</b>	<b>108</b>

**FIGURA IV.33. Competição entre glicose e lactato na oxidação a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade .....110**

**FIGURA IV.34. Competição entre glicose e lactato na conversão a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.....112**

**FIGURA IV.35. Oxidação da [1-<sup>14</sup>C] glicina e da [2-<sup>14</sup>C] glicina a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.....114**

**FIGURA IV.36. Conversão da [1-<sup>14</sup>C] glicina e da [2-<sup>14</sup>C] glicina a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.....115**

**FIGURA V.1. Períodos Perinatais.....118**

**FIGURA V.2. Níveis de Lactato e Glicose em fatias de hipocampo de rato antes, durante e após 23 minutos de hipóxia.....138**

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA III.1.Soluções estoque para o preparo do KRb.....57**

## ABREVIATURAS

**ATP-** Adenosina Trifosfato

**ATPase** - Adenosina Trifosfatase

**$\beta$ OH** - Betahidroxi

**CPT I** - Carnitina Palmitoil Transferase I

**CRM<sub>gli (oxi)</sub>** - Velocidade de Oxidação da glicose

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**DG** - Deoxiglicose

**DHAP** - Dihidroxiacetona Fosfato

**EPM** - Erro Padrão da Média

**GABA** - Ácido Gama Aminobutírico

**GFAB** - Proteína Glial Fibrilar Ácida

**Gli-** Glicose

**GLUT** - Transportadores de Glicose

**IGF** - Fator de Crescimento da Insulina

**Lac-** Lactato

**LDH** - Lactato Dehidrogenase

**MCT** - Transportadores de Ácidos Monocarboxílicos

**NAD<sup>+</sup>** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidado

**NADH** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido

**NMDA** - N-Metil-D-Aspartato

**PEPCK-** Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase

**POP** - fenil [5-feniloxazolona]

**POPOP** - 2-2-p –fenil-bis[5-feniloxazolona]

**Rb** - Rubídio

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**RMN** - Ressonância Nuclear Magnética

**SCG** - Sistema de Clivagem da Glicina

**SNC-** Sistema Nervoso Central

**Vgln** - Velocidade de síntese da glutamina

## RESUMO

O sistema nervoso central é capaz de utilizar uma variedade de substratos para obtenção de energia, entre eles incluem-se: glicose, corpos cetônicos, lactato, glicerol e glutamina. A utilização dos nutrientes energéticos pelo sistema nervoso central pode ser regulada em diversos níveis, tais como: transporte através dos capilares cerebrais, transporte através da membrana plasmática dos neurônios e células gliais, variações nas atividades das enzimas, e variações nos níveis plasmáticos dos nutrientes energéticos.

Os níveis plasmáticos dos nutrientes energéticos variam acentuadamente durante o desenvolvimento do rato. Esta mudança é ocasionada pela dieta ingerida que ocasiona modificações na liberação de hormônios e neurotransmissores visando uma adaptação metabólica à dieta ingerida. Durante a vida fetal o principal nutriente energético utilizado pelo sistema nervoso central do feto é a glicose proveniente da circulação materna; nas primeiras duas a três horas de vida extrauterina o lactato sangüíneo é o principal nutriente energético; após este período, a glicose é o principal nutriente energético até cerca de 12 horas de vida extrauterina; após este período, glicose e corpos cetônicos são os principais nutrientes energéticos utilizados pelo sistema nervoso central durante o período de lactação. Os níveis de corpos cetônicos sangüíneos no período de lactação vão depender

do teor lipídico do leite materno. No leite de rata, a concentração de lipídios está em torno de 13%, o que ocasiona uma concentração de corpos cetônicos em torno de 1,5 a 2,0 mM no lactente. Após o período de lactação, em torno do vigésimo primeiro dia de vida, a dieta a que os animais são submetidos possui uma elevada porcentagem de carboidratos, o que determina que a concentração dos corpos cetônicos diminua acentuadamente, sendo que neste período o principal nutriente energético utilizado pelo sistema nervoso central é a glicose.

Nesta tese realizamos um estudo ontogenético da oxidação a  $\text{CO}_2$ , bem como da conversão a lipídios, por fatias de cerebelo de ratos *in vitro* dos seguintes nutrientes energéticos (nas concentrações indicadas): 5,0 mM de glicose; 10,0 mM de lactato, 2,0 mM de  $\beta\text{OH}$ -Butirato; 1,0 mM de glicerol; 0,5 mM de glicina; e 2,0 mM de glutamina nas idades de aproximadamente 21 dias de gestação, 10 dias de vida pós-natal, 21 dias de vida pós-natal e na idade adulta (3 meses). O meio de incubação utilizado foi Krebs-Ringer bicarbonato. Com exceção da glicina ( $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ glicina,  $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ glicina) e o  $\beta\text{OH}$ -Butirato, marcado no carbono 3, os demais nutrientes energéticos foram uniformemente marcados com  $^{14}\text{C}$ .

Verificamos que o metabolismo de todos os nutrientes energéticos utilizados nesta tese variaram ontogeneticamente. A oxidação a  $\text{CO}_2$  da glicose, lactato, glicerol e glutamina aumentaram com a idade dos animais, enquanto a oxidação a  $\text{CO}_2$  do  $\beta\text{OH}$ -Butirato e glicina diminuíram com a idade dos animais. A síntese de lipídios a partir da glicose,  $\beta\text{OH}$ -Butirato e glicerol aumentaram com a idade dos animais. O lactato e a glutamina foram os principais

nutrientes energéticos oxidados a  $\text{CO}_2$  em todas as idades estudadas. Apenas na idade adulta a oxidação da glutamina a  $\text{CO}_2$  foi superior à oxidação do lactato. Nas idades de 7; 14 e 21 dias de idade o  $\beta\text{OH}$ -Butirato apresentou uma maior oxidação a  $\text{CO}_2$  do que o glicerol, a oxidação do glicerol na idade adulta foi significativamente superior a oxidação do  $\beta\text{OH}$ -Butirato. A oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  foi superior à oxidação do  $\beta\text{OH}$ -Butirato e do glicerol em todas as idades estudadas. A glicina apresentou uma acentuada diminuição na oxidação com o aumento das idades dos animais e na idade adulta foi juntamente com  $\beta\text{OH}$ -Butirato o composto menos oxidado a  $\text{CO}_2$ . Em relação à síntese de lipídios, a glicose e o lactato foram os principais nutrientes energéticos convertidos a lipídios. Aos 10 dias de vida pós-natal, a síntese de lipídios a partir de lactato foi superior à síntese a partir da glicose; nas demais idades estudadas a síntese de lipídios a partir dos dois substratos não apresentaram diferença entre si. Na idade adulta, a síntese de lipídios a partir do  $\beta\text{OH}$ -Butirato foi superior à síntese de lipídios a partir do glicerol e nas demais idades estudadas, não houve diferença entre a síntese de lipídios a partir dos dois substratos. A glutamina e a glicina foram os dois nutrientes energéticos que apresentaram menor conversão a lipídios em relação aos demais nutrientes energéticos em todas as idades estudadas.

## **ABSTRACT**

The CNS is capable of using a variety of substrates for obtainance of energy, and among them are included: glucose, ketone bodies, lactate, glycerol and glutamine. The utilization of the energetic nutrients by the CNS can be regulated in several levels, such as: transport through brain capillaries, transport through neuron and glial cells plasma membrane, variations in enzyme activities, and variations in plasma levels of the energetic nutrients. The plasma levels of the energetic nutrients vary markedly during the development of the animal, and this change is perpetrated by the ingested diet which causes modifications in hormone and neurotransmitters, aiming a metabolic adaptation to the ingested diet. During the fetal life the main energetic nutrient utilized by the fetus CNS is glucose derlled from matern circulation; in the first two or three hours of extra-uterine life blood lactate is the main energetic nutrient; after this period glucose is the main energetic nutrient until about twelve hours of extra-uterine life, and after this period glucose and ketone bodies become the major energetic nutrients utilized by the CNS during the whole lactation period. The levels of ketone bodies in the lactation period will depend on the fat content of matern milk, and in the rat milk the lipid concentration is around 13%, which allows a concentration of ketone bodies of 1.5 to 2.0 mM in the breastfeeding rat. After the period of lactation the diet to which the animals are submitted possesses a high percentage of carbohydrates, what determines a marked decrease in ketone bodies

concentration, and in this period the major energetic nutrient utilized by the CNS is glucose.

In this thesis we performed an ontogenic study of oxidation to CO<sub>2</sub>, as well as conversion to lipids, by rat cerebellum slices *in vitro* of the following energetic nutrients (in the indicated concentrations): 5,0 mM glucose; 10.0 mM lactate, 2.0 mM βOH-Butyrate; 1.0 mM glycerol; 0.5 mM glycine; and 1.0 mM glutamine. The incubation media utilized was Krebs-Ringer bicarbonate. With exception of glycine ([1-<sup>14</sup>C]glycine, [2-<sup>14</sup>C]glycine), the remaining energetic nutrients were uniformly labeled with <sup>14</sup>C.

In the present work we verified oxidation to CO<sub>2</sub> and conversion to lipids of the following energetic nutrients: 1-glucose, 2-lactate, 3-βOH-Butyrate, 4-glycerol, 5-glycine, 5-glutamine, by cerebellum slices of rats at the ages of 21.5 days of gestation, 10 days of post-natal life, 21 days of post-natal life and at adult age (3 months).

We verified that the metabolism of all the energetic nutrients utilized in this thesis varied ontogenetically. The oxidation to CO<sub>2</sub> of glucose, lactate, glycerol and glutamine increased with the age of the animals, while the oxidação to CO<sub>2</sub> of βOH-Butyrate and glycine decreased with the ages of the animals. Lipid synthesis from glucose, βOH-Butyrate and glycerol increased with the age of the animals. Lactate and glutamine were the main energetic nutrients oxidized to CO<sub>2</sub> in all ages studied. Only at adult age the oxidation of glutamine to CO<sub>2</sub> was superior to oxidation of lactate. At the ages of 7- 14- and 21 days of age βOH-Butyrate presented a higher oxidation to CO<sub>2</sub> than glycerol in all studied ages, but by its turn glycerol oxidation at adult age was significantly superior in comparison to oxidation of βOH-Butyrate at the

same age. Glucose oxidation to  $\text{CO}_2$  was higher than the oxidation of  $\beta\text{OH-Butyrate}$  and glycerol in all studied ages. Glycine at the ages of 21.5 days of gestation and at 10 days of post-natal life presented a higher oxidation rate than glucose, but due to the fact of presenting a marked decrease in the oxidation rate with the increasing in the age of the animals, it was, concurrently with  $\beta\text{OH-Butyrate}$ , the two least oxidized substrates to  $\text{CO}_2$ . In regard to lipid synthesis, glucose and lactate were the main energetic nutrients converted to lipids. At 10 days of post-natal life the synthesis of lipids from lactate was higher than the synthesis from glucose, and in the remaining ages studied the lipid synthesis from these two substrates did not present significant differences. At adult age the lipid synthesis from  $\beta\text{-OH-Butyrate}$  was higher than lipid synthesis from glycerol, and the remaining ages studied there was no difference in lipid synthesis from the two substrates. Glutamine and glycine were the two energetic nutrients that presented the lowest conversion to lipids in comparison to the remaining energetic nutrients in all ages studied.

## I. INTRODUÇÃO

### I.1. Crescimento Cerebral

O Sistema Nervoso Central, como qualquer outro órgão, tem seu crescimento caracterizado por três fases distintas: a) a primeira, onde ocorre aumento do número de células (hiperplasia); b) uma segunda fase em que a velocidade de divisão celular é mais lenta e o crescimento se dá, principalmente, pelo aumento do tamanho das células (hiperplasia com hipertrofia); c) e uma última fase, na qual não há divisão celular e todo o crescimento é por aumento de tamanho da célula (hipertrofia)(Morgane *et al.*, 1978). No caso do Sistema Nervoso Central, ocorre ainda a diferenciação celular. O cérebro não é um órgão homogêneo. Assim, o tempo destas três fases de crescimento difere, dependendo da região estudada. Ele é composto de várias regiões, cada qual com diferentes tipos de células controlando as mais diversas funções. Essas regiões apresentam características específicas de divisão celular. O desenvolvimento cerebral depende da velocidade da divisão celular em cada região, do momento em que esta é concluída, do tipo de células que estão se dividindo e se as células estão ou não em processo de migração para outros locais do Sistema Nervoso Central (Winick ,1970).

No rato, durante o período de vida pré-natal, a maioria das regiões cerebrais cresce por hiperplasia neuronal ( Winick,1972 ). A multiplicação dos neurônios ocorre, principalmente, durante a última semana de gestação, completando-se, praticamente, já no segundo dia de vida pós-natal (Dobbing *et al.*,1971). Entretanto, algumas áreas, como o bulbo olfatório, o hipocampo e o cerebelo, apresentam significativa divisão neuronal após o nascimento (Morgane *et al.*,1978). Assim, por exemplo, no cerebelo não ocorre divisão celular após os 16-17 dias de vida pós-natal, enquanto que, no hipocampo, a divisão celular está completa aos seis dias de idade (Morgane *et al.*,1978 ). Em momentos diferentes do desenvolvimento, as células neurais (neurônios e glias) podem, também, migrar do seu local de origem para outras regiões dentro do Sistema Nervoso Central (Altman *et al.*,1970).

O cerebelo apresenta moderada formação celular pré-natal, envolvendo, principalmente, a formação de células de Purkinje. Porém, apresenta um grande aumento no número de células neuronais após o nascimento. A proliferação de células gliais é, também, pós-natal e ocorre durante todo o período de lactação (Vicario *et al.*,1991).

As três primeiras semanas de vida neonatal constituem um período decisivo para o desenvolvimento do cérebro do rato. Este período, chamado de "surto de crescimento", é caracterizado por rápidas mudanças morfológicas e fisiológicas no órgão. Os parâmetros que determinam estrutura e função do cérebro, a saber, peso, espessura cortical, número neuronal e glial, e conexão e ultra-estrutura sináptica são os principais responsáveis pelas mudanças

ocorridas nesta fase. A vida fetal do animal, principalmente em seu terço final, é também de suma importância para o crescimento do cérebro. Entretanto, nesta época, o órgão encontra-se relativamente protegido pelos eficientes mecanismos homeostáticos de que é dotado o organismo materno (Dobbing *et al.*, 1971).

A análise das características do surto de crescimento levou Dobbing a formular a "hipótese do período vulnerável", segundo a qual o cérebro possui uma única oportunidade de crescer; no rato, esta fase corresponde exatamente às três primeiras semanas de vida intrauterina, época em que o órgão apresenta máxima velocidade de crescimento. O crescimento de um órgão pode ser acompanhado através da relação proteína/DNA como estimativa do tamanho celular (Winick & Noble, 1966). A proliferação glial e a arborização dendrítica neuronal são em grande parte responsáveis pelo acúmulo de proteína no cérebro durante o desenvolvimento (Birnbaum *et al.*, 1986).

Os dois grandes grupos de células do cérebro, neurônios e glia, diferem radicalmente entre si, a começar pela função. Enquanto o envolvimento dos neurônios com a função mental parece bem definido (Kraus *et al.*, 1974), o mesmo não acontece com as células gliais. A estas são atribuídas funções de sustentação e nutrição dos neurônios (Altman *et al.*, 1970), assim como de tamponamento do espaço extraneuronal em áreas de contato sináptico (Tsacopoulos & Magistretti, 1996), e também desempenham papel importante no transporte de aminoácidos e neurotransmissores no cérebro (Magistretti *et al.*, 1993).

O Sistema Nervoso Central apresenta uma grande complexidade em termos de diversidade de contatos celulares e uma grande

amplitude de processar informações através dos neurônios. A teoria neuronal, isto é, aquela que prevê que todo o processamento de informações é realizado pelos neurônios, vem sendo superada (Froés *et al.*, 1999).

Nos últimos dez anos, vários estudos tem demonstrado que a participação da rede glial pode prover suporte para a atividade neuronal e pode constituir uma via dinâmica para a sinalização química e elétrica no Sistema Nervoso Central (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Cornell- Bell & Finkbeiner, 1991).

Os astrócitos envolvidos nos processos sinápticos ficam expostos aos neurotransmissores liberados e disto, resultam consequências, tais como: 1- a resposta informotrópica dos astrócitos é ativada e os mesmos se movem aproximando-se da concentração mais elevada de neurotransmissores; 2- se a concentração de neurotransmissor atinge o limiar, a onda de cálcio é produzida. Durante a onda de cálcio o microambiente sináptico muda acentuadamente. A diminuição da concentração de cálcio na fenda inibe a liberação posterior de neurotransmissores, apesar do alcance do potencial de ação. Somente com o término da onda de cálcio astrocitária é que a concentração de cálcio retorna ao seu nível original na fenda sináptica, permitindo a liberação de neurotransmissores (Cornell-Bell *et al.*, 1991). Cabe salientar que os astrócitos são conectados um ao outro por meio de junções de fendas unidirecionais (*gap junctions*) que permitem a troca de várias moléculas biologicamente importantes (Robinson, 1993; Rash, 1997). Os astrócitos transferem cálcio unidirecionalmente entre si através das junções de fendas, durante a geração da onda de

cálcio(Finkbeiner,1992).

As conexões sinápticas desempenham papel importante nas funções do cérebro, sendo responsáveis pela transmissão dos impulsos nervosos. A sinaptogênese no cérebro de rato ocorre, principalmente, entre a segunda e quarta semanas de vida pós-natal, podendo diferir de região para região no cérebro. É estimado que o número de sinapses possa dobrar dia a dia, entre o quarto e o décimo primeiro dia de idade, e aumentar, em torno de cem vezes, dos quatro dias de idade até a maturidade cerebral. O aumento nas conexões sinápticas e a diferenciação dessas representam o começo do desenvolvimento químico e funcional do Sistema Nervoso Central. As perturbações no desenvolvimento das conexões sinápticas resultam em várias deficiências funcionais e comportamentais do sistema nervoso ( Morgane *et al.*,1978).

A mielinização é um processo no qual ocorre a deposição de mielina junto aos axônios, por ação dos oligodendrócitos no Sistema Nervoso Central e das células de Schwann no Sistema Nervoso Periférico. A membrana de mielina é formada por diversos lipídios e proteínas. A função da mielina é facilitar a condução dos impulsos nervosos através do axônio, evitando a geração de circuitos menores entre as fibras (Morell *et al.*,1994).

A mielinização do Sistema Nervoso Central do rato começa entre os dez e quinze dias de idade (Davison & Dobbing,1968) e alcança um pico de velocidade máxima aos vinte dias, após o qual a mesma declina, abruptamente, aos níveis do adulto. Entre os quinze e os trinta dias, ocorre um aumento de seis vezes na deposição de mielina, enquanto o peso cerebral aumenta em torno de 30-40 % . Estima-se

que aos vinte dias de idade, cada célula oligodendroglial produza uma quantidade de membrana miélica superior a três vezes à sua própria massa celular (Norton & Poduslo, 1973). A mielinização se processa nas diferentes regiões do sistema nervoso de acordo com seu desenvolvimento filogenético (Morell *et al.*, 1994).

## **I.2. Desenvolvimento Cerebelar**

O cerebelo é um importante centro regulador de controle da atividade motora, tanto no aspecto quantitativo quanto qualitativo do desempenho motor. Além disso, o cerebelo utiliza toda uma escala de informação sensorial (táctil, auditiva e visual) para constantemente orientar a ação motora, a fim de encontrar a força necessária, direção e velocidade de contração e relaxamento muscular (Johanson, 1980).

Um corte transversal do cerebelo mostra que a substância cinzenta forma uma fina camada superficial, a córtex cerebelar, a qual cobre a substância branca central, ou corpo medular.

A córtex cerebelar de rato adulto normal, histologicamente, divide-se em três camadas: a) externa ou molecular; b) intermediária, ganglionar ou de células de Purkinje; c) interna ou granular (Sokoloff, 1981).

Há seis tipos de neurônios na córtex cerebelar: a. células de Purkinje; b. células de Golgi; c. células estelares; d. células em cesto; e. células granulares; f. células de Lugaro (Smart & Dobbing, 1971) (Figura I.1).

A camada molecular está formada em grande parte pelas ramificações bifurcadas dos axônios das células granulares, pelas arborizações dendríticas das células de Purkinje e pelas células de Golgi. Contém ainda os corpos celulares, dendritos e axônios das

células estelares e das células em cesto. As células estelares situam-se na parte média e superior da camada molecular, enquanto que as células em cesto estão situadas no terço inferior da camada molecular.

A camada ganglionar, ou de células de Purkinje, contém os neurônios mais característicos do cerebelo: as células de Purkinje. Ocupa essa camada uma posição intermediária entre a camada molecular e a granular, sendo constituída por apenas uma camada de células.

A camada granular é a camada mais interna da córtex cerebelar. Contém uma população neuronal extraordinariamente rica, formada principalmente por células granulares. Também são encontradas nessa camada as células de Golgi, que se situam na parte superior da camada granular, imediatamente abaixo das células de Purkinje (Sokoloff, 1981).

Existem ainda na córtex cerebelar os axônios das fibras musgosas, que fazem sinapse com as células granulares, e as fibras trepadoras, que se ramificam na camada molecular.

As células granulares são o tipo de célula mais abundante no cerebelo de rato normal adulto: do total de células, 80% são neurônios e, destes, 85% são células granulares (Clark *et al.*, 1993).

Em cerebelo de rato normal adulto, para cada célula de Purkinje há, em média, cerca de trezentas células granulares (Clark *et al.*, 1993).

As células gliais do cerebelo de rato adulto normal consistem de oligodendrócitos, abundantes na substância branca e também presentes nas camadas granulares e de células de Purkinje, e de

astrócitos numa proporção de seis células (quatro oligodendrócitos e dois astrócitos) para cada célula de Purkinje (Clark *et al.*, 1993).

Na substância branca há apenas dois tipos de células: oligodendrócitos e astrócitos.

A composição celular da substância branca não varia do trigésimo quinto ao centésimo sexagésimo dia de vida pós-natal (Cremer *et al.*, 1982).

O cerebelo de rato normonutrido recém-nascido contém somente 3% do DNA de um cerebelo de rato adulto normal (Balazs, 1971). O crescimento celular deriva da proliferação pós-natal de células existentes na camada proliferativa externa (Altman *et al.*, 1970).

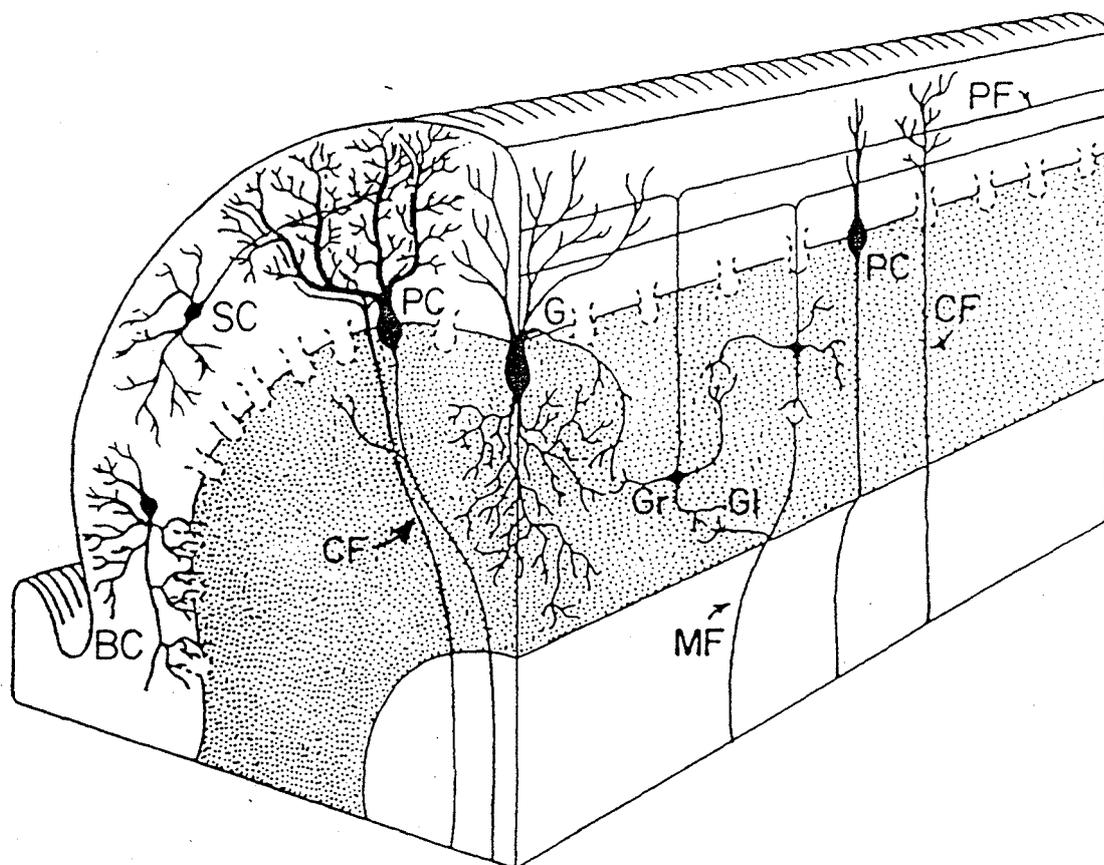
Esta camada persiste, no rato, até o vigésimo primeiro dia pós-natal. A camada proliferativa externa consiste de duas zonas: a zona superficial proliferativa e a zona pré-migratória básica. As células granulares imaturas migram desta camada proliferativa externa, onde ocorre a divisão celular, através da camada molecular até à camada granular. Esse processo de proliferação e migração das células granulares ocorre durante as três primeiras semanas pós-natal em cerebelo de ratos (Altman *et al.*, 1970).

À medida que as células granulares migram, elas alongam seus axônios formando as fibras paralelas, as quais formam sinapses com as células de Purkinje.

Uma característica do desenvolvimento cerebelar é o fato da neurogênese e gliogênese ocorrerem simultaneamente (Greenwood & Craig, 1987), enquanto que em outras regiões do Sistema Nervoso Central a gliogênese segue, com pequena sobreposição, a neurogênese (Bashan *et al.*, 1979). Tanto a proliferação quanto o

crescimento celular máximo ocorrem do nascimento ao vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (Cremer,1982).

O desenvolvimento definitivo do cerebelo ocorre até a quarta semana de vida pós-natal. Durante esse período, muitas mudanças ocorrem na composição bioquímica e celular do cerebelo(Cremer *et al.*,1976).



**Figura I.1. Citoarquitetura do córtex cerebelar.**

**BC, células em cesto.**

**CF, fibra trepadeira.**

**G, célula de Golgi.**

**Gl, glomérulos.**

**Gr, células granulosas.**

**MF, fibra musgosa.**

**PC, células de Purkinge.**

**PF, fibras paralelas.**

**SC, células estreladas.**

### **I.3. Metabolismo Energético Cerebral**

O Sistema Nervoso Central (SNC) é capaz de utilizar uma variedade de nutrientes energéticos, incluindo glicose (Vicario *et al.*, 1991), corpos cetônicos (Tildon & Roeder, 1984), glicerol e glutamina (Mckenna *et al.*, 1986).

A utilização de nutrientes energéticos pelo Sistema Nervoso Central pode ser regulada em diversos níveis: a) variação nos níveis plasmáticos de nutrientes (Pardridge, 1983); b) transporte através das células endoteliais capilares (Cremer, 1982); c) transporte através da membrana plasmática (Roeder & Tildon, 1983) e d) variação na atividade enzimática (Booth *et al.*, 1980).

Em virtude dos danos ocasionados por uma acentuada hipoglicemia na função cerebral e metabolismo energético e da aparente inabilidade de outros substratos, que não a glicose, para reverter os efeitos da mesma, esta foi considerada, por longo tempo, como substrato exclusivo para o Sistema Nervoso Central (Sokoloff, 1981).

Em 1966, estudos pioneiros de Cahil e colaboradores começaram a mostrar a contradição entre o uso obrigatório da glicose pelo cérebro e a relativa preservação da proteína corporal durante o jejum.

Em 1967, Owen e colaboradores concluíram que os corpos cetônicos,  $\beta$ OH-Butirato e acetoacetato, são responsáveis por cerca de dois terços da energia utilizada pelo cérebro durante o jejum prolongado.

Em 1971, Hawkins e colaboradores mediram as diferenças arteriovenosas de glicose e corpos cetônicos em cérebro de ratos em amamentação e concluíram que os corpos cetônicos parecem ser pelo menos tão importantes quanto a glicose como fonte de substrato energético cerebral.

Alguns anos depois, em 1976, Moore e colaboradores estudaram o transporte e metabolismo da glicose em ratos em amamentação em diferentes idades e encontraram baixa velocidade de utilização de glicose no cérebro de ratos neonatos, sugerindo um uso predominante de outras fontes energéticas.

Desde então, vários estudos têm sido realizados sobre o metabolismo e transporte de corpos cetônicos. Muitos desses estudos dedicaram-se a verificar as diferenças arteriovenosas cerebrais de  $\beta$ OH-Butirato e acetoacetato, o uso destes substratos metabólicos como precursores para a síntese de lipídios, seu transporte para o cérebro e atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de corpos cetônicos, assim como a regulação da utilização tanto da glicose como dos corpos cetônicos pelo cérebro imaturo.

#### **I.4. Estudo Ontogênico do Metabolismo Cerebral**

O nascimento representa uma mudança da dieta do feto de um alto conteúdo de carboidratos e baixo conteúdo em lipídios, para uma dieta pós-natal hiperlipídica e hipoglicídica.

Durante a gestação, o feto recebe da mãe um suprimento intravenoso contínuo de substratos energéticos, oxigênio, íons, vitaminas e água que cobrem as suas necessidades para o metabolismo

oxidativo e de crescimento.

Os substratos metabólicos provenientes para o feto via placentária são a glicose e os aminoácidos da circulação materna, além do lactato sintetizado na placenta (Bataglia & Meschia, 1978). Em muitas espécies, incluindo o rato, a placenta é pouco permeável a ácidos graxos livres e estes substratos não contribuem para o metabolismo fetal oxidativo. O glicogênio e triglicerídeos são duas reservas acumuladas pelos fetos, porém variam com a espécie, sendo que o rato quase não tem tecido adiposo branco ao nascer (Bataglia & Meschia, 1978).

#### **I.4.1. Período fetal tardio**

No rato, mais de 80% do crescimento fetal ocorre durante os últimos quatro dias de gestação (Mayor & Cuezva, 1985). O glicogênio acumula-se no fígado fetal do rato, alcançando uma alta concentração no vigésimo primeiro dia da vida fetal. A acumulação de glicogênio no fígado fetal de ratos é antecedida pelo desenvolvimento de atividades enzimáticas envolvidas nesta síntese; o aparecimento da glicogênio sintase hepática e da fosforilase é mediado por glicocorticóides (Bashan *et al.*, 1979). Bashan e colaboradores mostraram, em 1979, que a insulina age como mediador na acumulação do glicogênio durante o período fetal tardio .

#### **I.4.2. Período neonatal precoce**

A interrupção da fonte energética contínua transplacentária para

o feto ao nascimento impõe uma completa alteração metabólica desenvolvida pelo recém-nascido. Rapidamente, o feto passa de um período em que está alimentado para uma situação de absoluto jejum. Para sobreviver a este período neonatal, terá que estabelecer mecanismos de adaptação entre o período intra-uterino alimentado e o período extra-uterino de jejum. As reservas endógenas garantirão a sobrevivência do feto até o início do período alimentar, com fornecimento de leite materno, chamado de período de amamentação. O intervalo entre o nascimento e o período de início de alimentação é o período crítico de sobrevivência do feto. O rato recém-nascido tem que utilizar suas reservas energéticas até o início da amamentação e adaptar-se à dieta de alto conteúdo lipídico proveniente da amamentação (Girard, 1986). Durante este período, o rato neonato é inteiramente dependente da mobilização do seu estoque de glicogênio para sobreviver. O grande *pool* de glicogênio hepático acumulado durante a vida fetal tardia é rapidamente mobilizado após duas horas de vida pós-natal para fornecer glicose a tecidos dependentes exclusivamente dela, mantendo sua atividade funcional, tais como as hemácias, o tecido ocular e as gônadas.

O glicogênio hepático é praticamente consumido aproximadamente doze horas após o parto (Shelley, 1961), fazendo com que o recém-nascido seja dependente da glicose proveniente da lactose do leite ou da gliconeogênese (Girard *et al.*, 1985).

Em ratos, o período neonatal precoce é invariavelmente associado com uma profunda hipoglicemia, que espontaneamente retorna a uma normoglicemia em torno da terceira a quarta hora pós-natal (Cake *et al.*, 1971). Porém, a glicose sangüínea cai

progressivamente para níveis hipoglicêmicos na décima sexta hora (Cake *et al.*,1971). Os níveis de glicose permanecem entre 2,5 e 3,5 mM ao nascimento e caem para aproximadamente 1mM após uma hora de vida pós-natal (Girard *et al.*,1985).

A concentração de corpos cetônicos ao nascimento é de 0,2-0,4 mM e aumenta cerca de quatro vezes nas primeiras vinte quatro horas (Ferré *et al.*,1979). No período imediatamente pós-nascimento a concentração de corpos cetônicos cai durante as primeiras seis horas para valores próximos de 0,02mM e aumenta proporcionalmente entre a décima segunda e a décima sexta hora (Girard *et al.*,1985 ).

Os ácidos graxos livres plasmáticos estão baixos ao nascimento, 0,13 mM (Girard *et al.*,1985) o que representa aproximadamente 30% do valor do adulto (Yeh e Zee,1977) . Assim que os recém-nascidos começam com a dieta à base de leite, cuja composição é de : 9,2-12 % proteína ; 9,3 -15 % lipídios ; 2,8 -3,7% de carboidrato e 1,4-1,6 % cinzas, o alto teor de lipídios proveniente do leite materno faz com que a concentração de ácidos graxos livres aumente bruscamente para valores máximos no primeiro dia e permaneça em níveis altos por aproximadamente dez dias (Yeh e Zee,1977). Os níveis de ácidos graxos circulantes do rato ao nascer são baixos (0,2 mM), aumentando duas horas após o nascimento, sendo que por volta das dezesseis horas de vida pós-natal atingem níveis semelhantes ao do rato adulto (Girard *et al.*,1985).

Durante os três últimos dias de gestação, o feto de rato acumula substancial quantidade de lactato, provavelmente como conseqüência da atividade da glicólise anaeróbica da placenta e possivelmente por outros tecidos materno e fetal (Angeles *et al.*,1992). Após o

nascimento, há um aumento do lactato, havendo a utilização do mesmo dentro das duas primeiras horas de vida pós-natal de ratos e humanos (Medina *et al.*,1990). A concentração sangüínea de lactato está aumentada, sendo de aproximadamente 10 mM ; esse lactato é rapidamente utilizado durante as primeiras duas horas de vida extra-uterina do rato, chegando a concentração de 1mM após duas horas de vida pós-natal (Fulgsang *et al.*,1986). Medina e colaboradores, em 1990, mostraram que o lactato é utilizado durante o período perinatal pelo pulmão e cérebro de ratos e pelo cérebro de cães e humanos ; isso sugere que o lactato pode desempenhar um papel importante como nutriente energético de sustentação para o feto e tecidos neonatais durante o período perinatal.

Miller e colaboradores (1986) mostraram que o aumento da concentração de lactato sangüíneo em ratos, através da injeção intraperitoneal, ocasiona uma acentuada diminuição da utilização de glicose pelo cérebro.

Medina e colaboradores (1990) estudaram a cetogênese hepática de fetos de ratos com aproximadamente 19 dias, 20 dias e 21 dias, concluindo que a cetogênese a partir de lactato é dezenas de vezes superior à cetogênese a partir de oleato nas mesmas idades.

A cetogênese hepática em ratos a partir de ácidos graxos de cadeia longa só apresenta significância fisiológica após seis horas de vida pós-natal, após o início da amamentação, quando haverá alta concentração lipídica e um período no qual a enzima Carnitina Palmitoil Transferase I hepática apresenta uma baixa sensibilidade à inibição por malonil-CoA, aumentando, dessa forma, os níveis de corpos cetônicos (Cremer ,1982).

O lactato é um excelente substrato metabólico para o cérebro de neonato durante a vida extra-uterina imediata. O cérebro neonatal utiliza lactato não somente como substrato energético, mas também como fonte de carbono para a síntese de lipídios. Ele constitui, dessa forma, o substrato intermediário entre a glicose materna do período fetal e os corpos cetônicos, produto de oxidação dos ácidos graxos lácteos. Graças ao lactato, o cérebro pode desenvolver-se, ainda que em uma situação tão crítica como a pré-lactância (Medina *et al.*, 1990).

O consumo de lactato não requer, provavelmente, sinais hormonais condicionados ao parto. O oxigênio proveniente da ventilação pulmonar parece ser o único responsável pelo início e pela manutenção do consumo de lactato nestas circunstâncias. No período neonatal precoce, a velocidade de glicogenólise está baixa e a capacidade gliconeogênica de fígado é praticamente insignificante (Girard, 1986). Isso, em parte, ocasiona a hipoglicemia que ocorre neste período. Tem sido bem estabelecido que, durante o período pós-natal, o cérebro utiliza corpos cetônicos tanto como fonte energética como para síntese de lipídios (Krebs *et al.*, 1971).

#### **1.4.3. Desenvolvimento da glicogenólise hepática ao nascimento**

No fígado neonatal, a glicogenólise está estimulada pelo aumento de concentrações plasmáticas de catecolaminas secretadas como resposta à hipoxia dos recém-nascidos (Kraus *et al.*, 1974). Os níveis plasmáticos de catecolaminas são altos ao nascimento, diminuem rapidamente durante os primeiros trinta minutos de vida pós-natal e aumentam significativamente na segunda hora pós-natal.

Vários estudos têm descrito um efeito estimulatório da hipoglicemia na glicogenólise através da estimulação do aumento das catecolaminas plasmáticas na segunda hora pós-natal (Bashan *et al.*,1979). Este aumento nos níveis de catecolaminas circulantes coincide com a alta concentração de AMP cíclico registrada no fígado do neonato (Cuezva *et al.*,1980) e com o início da mobilização do glicogênio hepático (Cuezva *et al.*,1985). O processo catabólico está favorecido ao nascimento como consequência da diminuição na razão insulina/glucagon em virtude da rápida diminuição na concentração plasmática de insulina ao nascimento e por um simultâneo aumento significativo no glucagon plasmático (Cuezva *et al.*,1985). Porém, estas alterações hormonais acontecem durante os primeiros trinta minutos de vida pós-natal, quando a mobilização de glicogênio hepático ainda não é observada (Cuezva *et al.*,1985).

#### **I.4.4.Desenvolvimento da gliconeogênese hepática ao nascimento**

Determinações realizadas em fatias de fígado ou em animais intactos têm mostrado que a gliconeogênese hepática está ausente no fígado de animais fetais e aumenta cerca de duas horas após o nascimento (Hamosh *et al.*,1995). As enzimas envolvidas na gliconeogênese hepática, a piruvato carboxilase, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase mitocondrial, a frutose 1,6-difosfatase e a glicose-6-fosfatase têm uma atividade de 50-100 % do valor adulto no fígado de ratos logo após o nascimento. Porém, a atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica é baixa e aumenta consideravelmente duas horas após o nascimento (Hamosh *et al.*,1995). A fosfoenolpiruvato

carboxiquinase citosólica é considerada a enzima limitante da gliconeogênese (Hanson *et al.*, 1975).

#### **I.4.5. Período de lactação**

Durante o período de amamentação, o rato filhote permanece hipercetonêmico. Os níveis circulantes de  $\beta$ OHButirato e acetoacetato permanecem altos até o desmame, com níveis em torno de 1 e 2 mM (Hawkins *et al.*, 1971) exceto no estudo de Swiatek *et al.* (1984), no qual foram encontrados dados 30-50% inferiores aos outros dados relatados. Vários estudos relatam uma diminuição de 25-73% no  $\beta$ OHButirato e uma queda de 32-57 % nas concentrações sanguíneas de acetoacetato no final do período de amamentação, ou seja, em torno do vigésimo ao vigésimo primeiro dia de vida (Hawkins *et al.*, 1971). Essa alteração nos níveis de corpos cetônicos circulantes ocorre ao final do período de amamentação, quando os ratos começam a ingerir alimentos preponderantemente a base de carboidratos, além do leite materno.

A glicemia é baixa ao nascimento e aumenta durante os primeiros sete a dez dias de vida pós-natal (Krebs *et al.*, 1971) e não mudam significativamente após o final da amamentação e durante o estado adulto (Nehlig, 1991).

Após duas horas de vida pós-natal, a lactatemia se mantém em torno de 2 mM (Hawkins *et al.*, 1971).

#### **I.4.6. Diferenças arteriovenosas cerebrais entre a glicose e corpos cetônicos em ratos no período de lactação**

Nos ratos amamentados normonutridos, a diferença arteriovenosa cerebral, tanto de  $\beta$ OH-Butirato como de acetoacetato são altas durante todo o período de amamentação, havendo uma diminuição significativa próxima ao período de desmame (Schroeder *et al.*,1991). A captação de corpos cetônicos pelo cérebro tem se mostrado linear quando relacionada à sua concentração arterial, em ratos de todas as idades, incluindo os ratos adultos e em crianças (Zivin & Snarr,1972). A velocidade de captação de acetoacetato é duas a três vezes maior do que a de  $\beta$ OH-Butirato comparada à concentração arterial ( Webber & Edmond,1979). Em ratos de dez dias de idade (Kraus *et al.*,1974), mostrou-se que o cérebro está apto a captar e oxidar corpos cetônicos em níveis altos, assim como em animais em amamentação e em adultos (Schroeder *et al.*,1991).

A diferença arteriovenosa cerebral de glicose não muda na idade pós-natal (Hawkins *et al.*,1971). Existe uma significativa produção de lactato e piruvato no cérebro de rato em amamentação. Em ratos adultos, normonutridos, a quantidade de afluência unidirecional de glicose é cerca de duas vezes superior à metabolização da glicose (Cremer & Cunningham,1981) e o excesso de glicose captada sai do cérebro inalterada. Em animais amamentados, uma proporção substancial de glicose deixa o cérebro como lactato e piruvato (Dahlquist *et al.*,1976). A velocidade de glicólise é mais rápida nos ratos de dezoito dias de idade do que a utilização de piruvato na oxidação e síntese de lipídios (Cremer e Heath,1974). A perda de lactato e piruvato do cérebro é também consequência de uma contínua entrada de lactato e piruvato

proveniente do sangue em ratos imaturos. A entrada do lactato no cérebro dos quinze aos dezoito dias de vida dos ratos é cerca de dez vezes maior do que em adultos (Cremer,1982) .

A contribuição dos corpos cetônicos para a produção de energia pode ser aumentada em algumas situações. Depois de dezesseis a vinte e quatro horas de jejum, a captação cerebral de acetoacetato está aumentada e a captação de glicose está diminuída. A captação de  $\beta$ OH-Butirato não se altera dos dezessete aos vinte e dois dias de vida pós-natal dos ratos. No período de amamentação, a oxidação de corpos cetônicos está aumentada cerca de 20% em ratos mantidos em jejum (Hawkins et Al.,1971).

Após o desmame, com a introdução da dieta hiperglicídica, ocorrem mudanças nas atividades da glicoquinase, L-piruvatoquinase e na PEPCK, precedidas de alterações paralelas nas concentrações do RNAm destas enzimas. O aumento da concentração do RNAm da glicoquinase e da L-piruvatoquinase no desmame está diretamente relacionado à velocidade de transcrição destes genes (Lyonnet *et al.*,1988).

Em ratos em amamentação, administrando uma dieta rica em carboidratos, em poucas horas há uma diminuição na concentração da RNAm da PEPCK e um aumento na concentração da RNAm da GK sugerindo que, no desmame, a composição da dieta tem um papel fundamental na modulação de expressão destes genes (Perdereau *et al.*,1990).

### **1.5. Transporte através da barreira hematoencefálica de glicose e corpos cetônicos em ratos imaturos**

Está bem evidenciado a diminuição da permeabilidade da barreira hematoencefálica a solutos hidrofílicos desde o nascimento até o estado adulto (Johanson,1980). Nas primeiras cinco semanas de vida pós-natal de ratos, sistemas de transporte ativo desenvolvem-se nos capilares cerebrais, havendo uma redução na permeabilidade celular.

A glicose, que é o principal substrato metabólico do cérebro adulto, não atravessa a barreira hematoencefálica por difusão passiva em uma velocidade suficientemente rápida para satisfazer as necessidades metabólicas do cérebro. O transporte de glicose utiliza um processo estereoespecífico mediado por carreador, denominado difusão facilitada. Outros nutrientes energéticos de origem sangüínea chegam ao cérebro através de processos mediados por carreadores e por sistemas de transporte independentes (Pardridge,1983). Importantes vias metabólicas cerebrais parecem ser reguladas pelo fornecimento de substratos provenientes do sangue (Fernstrom,1976).

O estado nutricional e a eficiência dos transportadores da barreira hematoencefálica são importantes fatores no controle do suprimento adequado de nutrientes para o cérebro. Em uma alteração no estado nutricional, como no jejum, há um aumento do transporte de corpos cetônicos através da barreira hematoencefálica (Fulgsang *et al.*,1980).

### **1.5.1.Mudanças ontogênicas no transporte da glicose**

O sistema de transporte mais abundante na barreira hematoencefálica é o carreador de glicose (Crone,1965). A seqüência de DNA do transportador de glicose no cérebro de ratos e de humanos são 98% homólogos (Birnbaur *et al.*,1986). A expressão do gene do transportador de glicose pela barreira hematoencefálica parece ser regulada pela concentração sangüínea de glicose (McKenna *et al.*,1986).

O sistema de transporte mediado por carreador para a glicose não parece funcionar com toda a eficiência em ratos em amamentação. O transporte de glicose para o cérebro é menor em animais mais jovens, do que em adultos (Cremer *et al.*,1976).

A permeabilidade na barreira hematoencefálica da glicose em cérebro de ratos recém-nascidos nas condições normoglicêmicas representa 25-35 % dos valores encontrados em adultos (Fulsang *et al.*1986).

Cremer *et al.*, em 1981, e Daniel *et al.*, em 1978, mostraram que os valores de velocidade máxima de transporte mediado pelos carreadores de glicose são significativamente mais baixos no cérebro de ratos em amamentação comparados aos dos adultos. Os dados de Cremer *et al.* (1981) sugerem que um componente de difusão não saturável de transporte de glicose está presente no cérebro de ratos imaturos, além do transporte facilitado, mediado por carreador. Este componente de difusão, o qual existe em cérebro de ratos adultos (Gjedde,1981), dá uma grande contribuição em animais jovens, especialmente em altas concentrações de glicose sangüínea. Porém esse componente de difusão não foi encontrado por Daniel *et al.*(1978) em cérebro de ratos imaturos. Os valores de velocidade máxima para

o transporte de glicose ao cérebro variam em condições fisiológicas específicas tais como a hiperglicemia (Abdul-Rahman e Siesjö,1980) ou mediante o estímulo da atividade nervosa (Cremer *et al.*,1981), nas quais as velocidades de captação de glicose estariam aumentadas várias vezes em relação a ratos adultos normais anestesiados.

Em estudo de Sivitz e colaboradores, em 1989, sobre a regulação do transportador da glicose no cérebro em desenvolvimento de ratos foi mostrado uma diminuição significativa no conteúdo de RNAm do transportador de glicose imediatamente após o nascimento, seguido por um aumento gradual de volta ao nível pré-natal, sugerindo que o transportador de glicose cerebral de ratos é regulado pelo desenvolvimento. O fluxo de glicose no cérebro de ratos com duas semanas de vida é cerca de 20% dos níveis do adulto (Moore *et al.*,1976), possivelmente por causa das baixas concentrações de transportadores na barreira hematoencefálica imatura. A afinidade do sistema de transporte para hexoses em neonatos é semelhante ao de adultos, o que, provavelmente, se relaciona mais a um aumento na concentração de transportadores na barreira hematoencefálica do que a uma mudança na natureza molecular (Wasterlain e Dwyer,1983). A permeabilidade capilar para a 2-deoxiglicose após o nascimento aumenta com a idade dos animais (Zivin & Snarr,1972).

A diferença na quantidade de glicose transportada através da barreira hematoencefálica entre ratos em amamentação e adultos não está totalmente esclarecida (Dahlquist e Persson.,1976); a entrada de glicose é maior do que a quantidade utilizada em ambos os grupos. Em ratos adultos, a entrada de glicose no cérebro é cerca de duas

vezes a quantidade utilizada (Cremer *et al.*,1981). Em cérebro de ratos em amamentação, os quais estão aptos a utilizar corpos cetônicos como substratos alternativos, e em qualquer idade, o transporte de glicose não pode ser considerado como um fator limitante à utilização de glicose cerebral (Lund-Andersen.,1979).

### **I.5.2.Mudanças Ontogênicas no transporte dos ácidos monocarboxílicos**

O transporte dos ácidos monocarboxílicos pela barreira hematoencefálica está dividido entre os corpos cetônicos, lactato, piruvato e alfa cetoácidos, pois todos eles competem pelo transporte feito pelo mesmo carreador (Conn *et al.*,1983; Cremer *et al.*, 1974,1976,1982; Oldendorf, 1972, 1973). As altas concentrações de  $\beta$ OH-Butirato acarretam baixa captação de lactato, assim como altas concentrações de lactato reduzem a captação de  $\beta$ OH-Butirato, indicando que ambos os substrato são transportados pelo mesmo carreador (Cremer *et al.*,1976). O piruvato, lactato e  $\beta$ OH-Butirato são transportados através da barreira hematoencefálica pela combinação da difusão passiva e facilitada (Cremer *et al.*,1979; Oldendorf, 1972,1973; Pardridge,1983; Tildon e Roeder,1988).

#### **I.5.2.1.Transporte de corpos cetônicos**

Ao contrário da glicose, a capacidade de transporte através da barreira hematoencefálica do  $\beta$ OH-Butirato está consideravelmente

aumentada durante todo o período de amamentação (Cremer *et al.*,1976,1981; Daniel *et al.*,1977; Moore *et al.*,1976).

Conforme mostrado por Moore *et al.*(1976), existe um aumento de sete vezes na permeabilidade cerebral de  $\beta$ OH-Butirato durante o período de amamentação, seguido por um declínio aproximadamente igual aos trinta e cinco dias pós-natal. A quantidade calculada de transporte diminuiu cerca de 62% entre o fim do período de amamentação e o estado adulto (Daniel *et al.*,1977).

O efluxo de corpos cetônicos do cérebro é insignificante, o que sugere que o transporte seria um limitante no metabolismo do  $\beta$ OH-Butirato; para a glicose, o transporte não é limitante (Daniel *et al.*,1978; Moore *et al.*,1976).

Existem evidências de que a entrada de corpos cetônicos no cérebro de ratos adultos pode estar restrita a algumas áreas, especialmente aquelas onde não há barreira hematoencefálica (Hawkins,1971). Porém, não foram encontradas evidências de heterogenicidade na captação cerebral de  $\beta$ OH-Butirato cerebral em ratos de dez a trinta e cinco dias de idade (Cremer,1981; Miller,1986; Nehlig *et al.*,1991).

#### **1.5.2.2. Transporte de lactato e piruvato**

A mudança de padrão dependente da idade no transporte de lactato e piruvato é similar à dos corpos cetônicos, porém mais pronunciada (Cremer,1982; Cremer *et al.*,1981). O cérebro de ratos imaturos é mais permeável ao lactato. A um nível de lactato plasmático de 5 mM, a captação do lactato é no mínimo dez vezes

maior nos ratos de quinze a dezoito dias de idade comparados aos adultos (Cremer,1982). O carreador de lactato é estereoespecífico (Oldendorf, 1972) e mostra saturação cinética em animais adultos (Oldendorf,1973; Nemoto e Severinghaus,1974). O índice de captação cerebral para lactato, assim como o  $\beta$ OH-Butirato, é influenciado por condições nutricionais e aumenta cerca de 1,5 vezes em ratos adultos durante o jejum (Cremer *et al.*,1976).

Em ratos adultos, a velocidade de entrada de lactato e piruvato no cérebro não aumenta na proporção da elevação dos níveis sanguíneos. Medidas das diferenças arteriovenosas cerebrais de substratos têm demonstrado que o movimento de corpos cetônicos, lactato e piruvato através da barreira hematoencefálica ocorre em direções opostas (Hawkins *et al.*,1971; Schoroeder *et al.*,1991). O cérebro do animal adulto libera pequena quantidade de lactato no estado alimentado (Cremer *et al.*,1976).

O lactato contribui significativamente como substrato energético em situações de hipoglicemia após o nascimento, tanto em neonatos humanos (Fernandes *et al.*,1984), como em ratos recém-nascidos (Arizmendi e Medina,1983).

## **I.6.Utilização Ontogênica de Nutrientes Energéticos pelo cérebro de ratos**

Vários estudos têm demonstrado que o lactato é o principal substrato metabólico para o cérebro durante o período neonatal precoce em várias espécies, incluindo humanos (Dombrowski,1989).

Além disso, a velocidade de utilização de lactato por fatias de

cérebro de ratos recém-nascidos ou por células isoladas de cérebro de ratos recém-nascidos ou cérebros de neonatos *in vivo* é muito maior do que a velocidade de utilização de glicose e de  $\beta$ OH-Butirato (Vicario *et al.*,1991). Durante as duas primeiras horas de vida pós-natal, o lactato é consumido pelo cérebro através do ciclo do ácido tricarbóxico (Medina *et al.*,1990), (Fernandez *et al.*,1984). Nesse período, a gliconeogênese só pode ser realizada a partir do glicerol (Medina *et al.*,1990).

Durante as primeiras horas de vida pós-natal, o rato desenvolve profunda hipoglicemia como consequência da baixa velocidade da glicogenólise hepática (Cuezva *et al.*,1980) e da insignificante capacidade gliconeogênica do fígado (Cake *et al.*,1971). Por essas razões, durante as primeiras horas pós-nascimento, o suprimento de glicose não é suficiente para preencher os requerimentos energéticos do cérebro. Porém, o cérebro imaturo do rato está apto para utilizar corpos cetônicos (Hawkins *et al.*,1971). O rato ao nascimento praticamente é desprovido de tecido adiposo branco (Girard,1986). As baixas concentrações de corpos cetônicos observadas durante o período de pré-lactância (Cuezva *et al.*,1985) parecem ser uma consequência da inibição transitória da cetogênese causada pela lacuna dos precursores cetogênicos ou cofatores (Ferré *et al.*,1979) mais do que pelo aumento de utilização dos corpos cetônicos. Durante o período neonatal precoce antes do início da amamentação, o cérebro é suprido por substratos alternativos outros que não os corpos cetônicos.

A concentração do lactato é elevada durante o final da gestação e as concentrações alcançadas são maiores do que 10 mM durante os

primeiros minutos da vida extra-uterina (Cuezva *et al.*,1985). Porém, muito do lactato acumulado durante o final da gestação é utilizado nas primeiras duas horas de vida extra-uterina, isto é, antes do início da amamentação ( Juanes *et al.*,1986 ).

O lactato no cérebro pode ser rapidamente oxidado a piruvato pela lactato desidrogenase, sendo que a atividade desta enzima está elevada em cérebro de ratos recém-nascidos (Booth *et al.*,1981). O lactato representa o principal nutriente energético para o cérebro durante o período perinatal precoce. A versatilidade do cérebro do recém-nascido na utilização de substratos alternativos para o metabolismo oxidativo contribui para a tolerância do cérebro imaturo a efeitos deletérios tais como a hipoxia, hipoglicemia e outros fatores de estresse metabólico.

O cérebro imaturo permanece flexível no mínimo até o período de amamentação na utilização de nutrientes energéticos, estando apto para utilizar lactato para produção energética toda vez que os seus níveis circulantes aumentarem (Booth *et al.*,1981).

A sobrevivência pós-natal depende da correta adaptação à vida extra-uterina imediata. Estudos de Medina e colaboradores, em 1985, mostraram que a mortalidade pós-natal de ratos neonatos imaturos, que nasceram um dia antes do término da gestação ( 5% do período gestacional) , foi cerca de dez vezes maior do que a de ratos que completaram o período gestacional. Uma das causas da mortalidade dos neonatos prematuros são as reservas escassas de glicogênio ao nascimento, pois a síntese de glicogênio hepático é interrompida, não havendo acúmulo da quantidade necessária de consumo para o mesmo. Outra causa atribuída para a mortalidade do grupo prematuro

está relacionada à maturidade pulmonar, que não é plena nos animais prematuros, interferindo dessa forma no aproveitamento energético do lactato, que nas primeiras horas de vida pós-natal é o nutriente essencial para sobrevivência a este período crítico.

### **I.7.Regulação da glicogênese hepática no recém-nascido:**

O rato em amamentação necessita de uma aporte constante de glicose, parcialmente suprida pelo conteúdo do leite. Os requerimentos de glicose são complementados por uma gliconeogênese ativa durante um período de amamentação, no qual os principais substratos gliconeogênicos são o lactato, o glicerol e os aminoácidos gliconeogênicos (Girard,1986). O aumento potencial deste processo durante o período de amamentação está refletido nos níveis das enzimas-chave regulatórias da gliconeogênese: a piruvato carboxilase, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, a frutose 1,6 difosfatase e a glicose-6-fosfatase (Snell,1981). A atividade de todas estas enzimas são consideradas elevadas, comparando-se o valor adulto no fígado de ratos em amamentação ( Ballard ,1971 ).

Quando a atividade de todas as enzimas gliconeogênicas alcança os níveis de adulto no fígado de ratos recém-nascidos, isto é, seis a oito horas pós-nascimento, outros fatores passam a regular a gliconeogênese hepática, tais como o suprimento de precursores gliconeogênicos como o lactato, galactose, aminoácidos, glicerol e a disponibilidade de ácidos graxos livres do leite (Girard,1986). O suprimento de substratos gliconeogênicos e de ácidos graxos livres é de crucial importância para suprir altas velocidades de gliconeogênese

e para manter a normoglicemia em recém-nascidos.

No fígado, a oxidação de ácidos graxos fornece cofatores essenciais (acetil-CoA, NADH e ATP) para possibilitar uma gliconeogênese adequada. Em tecidos periféricos, a oxidação de ácidos graxos inibe a oxidação da glicose e estimula a produção de precursores gliconeogênicos ( lactato,piruvato e alanina) (Girard *et al.*,1985 ).

Ao nascer, a atividade da piruvato carboxilase, da PEPCK mitocondrial da frutose-1,6-bifosfato e da glicose 6 -P, no fígado de ratos,está em torno de 50-100% do valor encontrado em fígado de animais adultos (Warnes *et al.*,1977).

A atividade da PEPCK citosólica no nascimento está baixa, correspondendo a aproximadamente 0-25 % do valor encontrado em animais adultos aumentando de forma significativa após as primeiras horas de vida pós-natal (Robinson *et al.*,1976).

Girard e colaboradores, em 1986, mostraram que a PEPCK citosólica é uma enzima limitante da gliconeogênese em neonatos.

### **I.8. Corpos Cetônicos como substratos importantes no período de lactação**

Trabalhos efetuados por Williamson e colaboradores, em 1971, mostraram a existência, no cérebro, de enzimas necessárias para converter corpos cetônicos em acetil-CoA. Simultaneamente, Page e colaboradores (1971) compararam a atividade dessas enzimas nos diversos tecidos ao longo do período de lactação, o que permitiu compreender que nesta etapa o cérebro é o principal consumidor de

corpos cetônicos. Webber e Edmond, em 1979, comprovaram que o cérebro utiliza os corpos cetônicos não só para obter energia, mas também como precursores da síntese lipídica, acontecimento crítico para o cérebro em desenvolvimento, porque este experimenta uma elevada mielinização. Ambos os usos, energético e biossintético, não são alternativos ao consumo de glicose, mas preferenciais, como foi demonstrado por Edmond e colaboradores, em 1984, em diversos tipos de células cerebrais isoladas e por Yeh e Sheehan, em 1985, em preparações pulmonares.

### **I.8.1. Mecanismos Regulatórios da Cetogênese**

A concentração de corpos cetônicos no sangue se encontra regulada por dois níveis, conforme segue.

#### **1 ) Aporte de ácidos graxos ao fígado**

A quantidade de ácidos graxos não esterificados que fluem até o fígado deve ser considerada, pois esses são os principais precursores de corpos cetônicos. A procedência dos ácidos graxos é tripla: dietética, adipocitária e do próprio fígado. A liberação desses compostos a partir dos triglicerídeos armazenados no tecido adiposo está controlada por vários hormônios, principalmente a insulina, que é o único hormônio antilipolítico. Os níveis basais de insulinemia são suficientes para inibir a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo. O glucagon, cortisol e o hormônio de crescimento exercem um efeito lipolítico sobre o adipócito, mas só são eficazes, *in vivo*, se atuarem em ausência relativa ( jejum e exercício muscular ) ou absoluta de insulina (diabetes insulino dependente), porque os três hormônios

possuem também um efeito insulinossecrator que se opõe à sua ação lipolítica. As catecolaminas, ao contrário, estimulam a lipólise e inibem a insulinossecreção, daí os seus efeitos sobre o tecido adiposo serem mais eficientes (Alberti e colaboradores, 1978).

## 2 )Atividade cetogênica hepática

A cetonemia depende da própria atividade cetogênica do fígado. O glucagon estimula a cetogênese, a qual é diminuída pela insulina. Uma queda na relação insulina/glucagon no plasma determina um aumento na produção de corpos cetônicos, mesmo não havendo alterações nas disponibilidades hepáticas de ácidos graxos. Isso se deve à existência de uma regulação intra-hepática metabólica de ácidos graxos captados pelo fígado.

O principal controle da cetogênese hepática ocorre a nível da CPT I, enzima localizada na membrana mitocondrial externa. A CPT I é inibida por malonil-CoA. Quando houver uma relação insulina/glucagon elevada a CPT I estará inibida, devido ao fato da acetil-CoA carboxilase estar ativada. Essa enzima catalisa a reação de síntese da malonil-CoA. A atividade da CPT I também é dependente da sua sensibilidade à inibição por malonil-CoA.

A cetogênese a partir de ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia média não dependem da atividade da CPT I. Esses ácidos chegam à matriz mitocondrial como tal e então são transformados em acilas CoA.

Com a diminuição da concentração de malonil-CoA e conseqüente ativação da CPT I, há um aumento no transporte de ácidos graxos para a matriz mitocondrial. A via da beta-oxidação apresenta uma baixa saturabilidade, portanto o grande aumento de

acilCoA ocasiona uma quantidade extremamente elevada de acetil-CoA. O ciclo de Krebs é uma via metabólica que satura facilmente, este excesso de acetil-CoA ocasionado pela ativação da CPT I é utilizado pelo sistema enzimático de síntese de corpos cetônicos (Girard *et al.*, 1992).

### **1.8.2 Efeito Modulador da Malonil-CoA durante a transição fetal – neonatal**

Saggerson e Carpenter (1990) admitiram a existência de uma diminuição da síntese de ácidos graxos no fígado durante a transição fetal-neonatal, pois a queda da concentração intra-hepática de malonil-CoA acarreta uma maior intensidade da entrada de ácidos graxos longos na mitocôndria. A própria capacidade inibitória da malonil-CoA sobre a CPT I, durante o jejum das primeiras horas pós-nascimento, diminui as condições de síntese de ácidos graxos. Essa diminuição supõe uma modificação fisiologicamente coerente com a capacidade modulatória do malonil-CoA e tem o efeito de potencializar o uso dos ácidos graxos nestas condições (Ontko & Johns, 1980).

Nas primeiras horas de vida pós-natal dos ratos, a CPT I é mais sensível à inibição por malonil-CoA (Saggerson & Carpenter, 1982). Essa sensibilidade à inibição por malonil-CoA diminui acentuadamente após doze horas de vida pós-natal (Girard *et al.*, 1985).

A oxidação de ácidos graxos de cadeia longa é baixa antes das doze horas de vida pós-natal dos ratos, apesar dos níveis de malonil-CoA serem relativamente baixos em relação aos níveis do rato neonato. Tal ocorrência deve-se ao fato da sensibilidade à inibição

por malonil-CoA da CPT I diminuir acentuadamente a partir das doze horas de vida pós-natal dos ratos (Girard *et al.*, 1985) .

### **1.8.3. Cetogênese no primeiro dia pós-natal**

Logo após o nascimento, o nível dos corpos cetônicos está em torno de 0,2 mM. Após as primeiras três horas de vida pós-natal, os níveis dos corpos cetônicos diminuem acentuadamente. Após doze horas de vida pós-natal os níveis de corpos cetônicos chegam a 1,5-2,0 mM, aumento que coincide com a diminuição da sensibilidade à inibição por malonil-CoA da CPT I (Girard *et al.*, 1980).

Estudos de Ferré e colaboradores, em 1979, sugerem a existência de uma capacidade modulatória intra-hepática, pois quantidades importantes de ácidos graxos fluindo até o fígado desde a segunda hora de vida pós-natal não aumentam significativamente a cetogênese até doze horas após o nascimento, o que sugere que a disponibilidade de ácidos graxos não é um fator limitante à cetogênese. Dombrowski *et al.*, em 1989, mantiveram ratos em jejum, pós-nascimento, e forneceram emulsões de triglicerídeos de cadeia longa, observando aumento dos ácidos graxos livres no plasma. Porém, só observaram efeito hipercetonemiante quando a emulsão foi administrada a partir das doze horas de vida pós-natal.

O cérebro do rato neonato está preparado para a utilização de corpos cetônicos, pois as enzimas necessárias estão aumentadas durante todo o período de lactação. O cérebro do neonato utiliza os corpos cetônicos não somente como fonte energética, mas também como fonte de esqueletos carbonados necessários para o seu

crescimento e desenvolvimento. Deve-se levar em conta que a maquinaria lipogênica é citoplasmática. Desta forma, o acetil-CoA destinado a este fim deve sair da mitocôndria na forma de citrato. O transporte de acetil-CoA em forma de citrato é um processo que consome energia, pois a citrato liase requer a hidrólise de uma molécula de ATP para cada molécula de acetil-CoA liberada. A enzima exclusiva nesta etapa do desenvolvimento, a acetoacetil-CoA sintetase, catalisa a conversão direta de acetoacetato em acetoacetil-CoA no próprio citoplasma, sem necessitar de enzimas mitocondriais. A presença da acetoacetil-CoA sintetase no cérebro neonatal tem uma função exclusiva e transitória de servir de via para a síntese de lipídios para as estruturas cerebrais a partir de corpos cetônicos plasmáticos. No cérebro adulto, a utilização de corpos cetônicos não é uniformemente utilizada por todo o Sistema Nervoso Central; já no período de lactação, a utilização de corpos cetônicos pelo cérebro é uniformemente utilizada por todo o Sistema Nervoso Central (Fulsang *et al.*, 1986).

A homeostasia energética está assegurada pelos ácidos graxos e corpos cetônicos como substratos alternativos à glicose para assegurar o desenvolvimento e crescimento dos tecidos (Herrera, 1966). Observando a evolução da concentração plasmática dos corpos cetônicos, podemos distinguir que existe um longo período, imediatamente após o parto, em que a concentração de corpos cetônicos aumenta significativamente de 0,2 mM para 2mM (Hawkins *et al.*, 1971). Apesar disso, a liberação de ácidos graxos ao sangue não é tão imediata. A lipólise pós-natal está atrasada no neonato humano, possivelmente como consequência do atraso da queda da razão

insulina/glucagon. Porém, quando a lipólise ocorre, a aparição de ácidos graxos no sangue não é acompanhada do aumento da concentração de corpos cetônicos. A carnitina no fígado neonatal não está disponível, daí o comprometimento do transporte de ácidos graxos ao interior da mitocôndria, o que é imprescindível para sua oxidação e, por conseguinte, para sua transformação em corpos cetônicos. Ao iniciar o período de amamentação, a carnitina presente no leite materno possibilita a oxidação dos ácidos graxos.

Iniciado o período de lactação, os lipídios do leite materno mantêm a hipercetonemia pós-natal (Dueé *et al.*, 1983). O leite contém uma elevada proporção de ácidos graxos de cadeia média (35%) sendo hidrolisados por uma lipase lingual ingerida junto com o leite. Estes ácidos se liberam no estômago, sendo absorvidos pela mucosa gástrica e alcançando rapidamente o fígado; como não requerem carnitina para sua oxidação intramitocondrial, sua eficácia cetogênica é maior do que a dos ácidos graxos de cadeia longa, cuja absorção acontece no intestino delgado necessitando carnitina e CPT I para sua oxidação (Well, 1985). O leite da rata contém carnitina a uma concentração de aproximadamente 0,3 mM (Robles-Valdes *et al.*, 1976) e provê o fígado do recém-nascido, cuja capacidade de síntese é baixa. Iniciada a lactação, nas duas primeiras horas de vida, o fígado já contém carnitina e acil-carnitina em proporções elevadas (Ferré *et al.*, 1978), de modo que este fator não constitui, *in vivo*, uma limitação para a cetogênese.

Uma cetogênese eficiente é inteiramente dependente dos ácidos graxos livres provenientes da hidrólise dos triglicerídeos do leite (Ferré *et al.*, 1979). Assim que a lactação é iniciada, o recém-nascido recebe

uma dieta de alto conteúdo lipídico e baixo conteúdo de carboidrato (Luckey *et al.*,1954) e o recém-nascido rapidamente desenvolve, adicionando à produção de glicose a partir da gliconeogênese, uma rota metabólica para oxidar ácidos graxos livres. O rato recém-nascido recebe 69% de seu consumo energético como lipídio e somente 6% como carboidrato do leite (Ferré *et al.*,1979).

A capacidade para oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e produção de corpos cetônicos é muito baixa no fígado fetal e aumenta significativamente, alcançando valores de adulto durante as primeiras vinte e quatro horas seguidas do nascimento (Bailey & Lockwood,1973).

Estas mudanças estão acompanhadas por uma aumento na atividade de enzimas envolvidas da beta oxidação no fígado e particularmente na atividade do sistema carnitina palmitoiltransferase (Augenfeld & Fritz,1970). A carnitina também aumenta sua concentração no fígado após nascimento em ratos em amamentação. A atividade das enzimas da via da  $\beta$ hidroximetilglutaril-CoA, responsável pela síntese de acetoacetato a partir do acetyl-CoA, também aumenta durante as primeiras vinte e quatro horas de vida pós-natal (Hipolito-Reis *et al.*,1974).

O aumento na cetogênese não parece ser simplesmente regulado por uma aumento nos ácidos graxos livres do plasma e pela concentração de carnitina hepática (Ferré *et al.*,1979). Estudos com hepatócitos isolados e mitocôndrias hepáticas isoladas de ratos e coelhos recém-nascidos têm demonstrado que o aumento na capacidade de oxidação de ácidos graxos e cetogênese resultam de três fatores:

(1) uma diminuição na lipogênese e na concentração de malonyl-CoA (Ferré *et al.*,1979);

(2) uma diminuição na sensibilidade da carnitina palmitoiltransferase I pela inibição por malonyl-CoA junto com um potencial diminuído na concentração de malonyl-CoA (Girard ,1986). A relação inversa entre lipogênese e oxidação de ácidos graxos pós-nascimento somada à diminuição na sensibilidade da CPT I para malonyl-CoA, sugere que a chave para a cetogênese hepática pós-natal é mediada pela malonyl-CoA (Ferré *et al.*,1979).

(3) a ativação da  $\beta$ OH-metilglutaril-CoA sintase secundária à retirada da succinila da enzima em resposta à uma diminuição na concentração mitocondrial de succinyl-CoA (Quant *et al.*,1991). Essa enzima é a limitante do ciclo da  $\beta$ OH-metil-glutaril-CoA e mostra uma atividade aumentada em três vezes entre o nascimento e o primeiro dia de vida pós-natal (Hipolito-Reis *et al.*,1974).

### **1.9. Interação entre oxidação de ácidos graxos livres, cetogênese e gliconeogênese em ratos recém-nascidos**

Em ratos adultos em jejum, a gliconeogênese ocorre no fígado concomitantemente à uma elevada oxidação de ácidos graxos e alta velocidade de cetogênese.

O período neonatal é uma situação fisiológica na qual a gliconeogênese e a oxidação de ácidos graxos estão intimamente associadas, sendo que o rato recém-nascido mantém a glicose sangüínea normal durante uma gliconeogênese ativa (Ferré *et al.*,1979) sustentada por uma oxidação ativa de ácidos graxos

hepáticos (Dueé *et al.*,1983). Ao contrário, em ratos recém-nascidos em jejum, os quais têm baixíssimas concentrações de ácidos graxos livres circulantes (devido à ausência de tecido adiposo branco ao nascimento) e uma baixa velocidade de oxidação de ácidos graxos hepáticos (Ferré *et al.*,1979), a gliconeogênese hepática está significativamente diminuída e a hipoglicemia é desenvolvida (Girard *et al.*,1985). Um aumento no aporte de precursores gliconeogênicos para o fígado, associados com ácidos graxos de cadeia longa, elevam a gliconeogênese hepática e invertem a hipoglicemia induzida pelo jejum (Ferré *et al.*,1979).

Um aumento similar na produção de glicose é observada quando ácidos graxos de cadeia longa são adicionados a hepatócitos isolados de ratos de um dia de idade em jejum (Girard *et al.*,1985). Ferré e colaboradores, em 1979, mostraram que a inibição da gliconeogênese hepática em ratos recém-nascidos em jejum é revertida pelo fornecimento de triacilglicerol. Tais resultados mostraram que a diminuição da concentração de substratos gliconeogênicos não é o único fator limitante à atividade da gliconeogênese em ratos recém-nascidos em jejum. Os ácidos graxos são importantes ativadores da gliconeogênese, pois fornecem energia (ATP) para o processo de gliconeogênese, bem como acetilCoA, que ativa a enzima piruvato carboxilase. Tanto ácidos graxos livres disponíveis como a oxidação de ácidos graxos hepáticos parecem essenciais para sustentar a gliconeogênese hepática (Dueé *etal.*,1983).

### **I.10.Utilização Cerebral de Corpos Cetônicos**

Durante a cetose do período de amamentação no rato, os corpos cetônicos constituem uma proporção importante, 22-76% do balanço do metabolismo energético total do cérebro (Hawkins *et al.*,1971).

Ao contrário da utilização da glicose pelo cérebro de ratos imaturos, a utilização cerebral de corpos cetônicos está muito ativa durante o período de amamentação, quando esses substratos são fornecidos em altas quantidades pela circulação sanguínea. A utilização de corpos cetônicos é homogênea em cérebro de ratos imaturos. A seletividade regional na captação de corpos cetônicos é aparentemente um fenômeno idade-dependente, o qual somente aparece no trigésimo quinto dia pós-natal (Girard *et al.*,1992).

### **I.11.Síntese de lipídios a partir de glicose e corpos cetônicos**

Os lipídios perfazem aproximadamente 60% do peso seco do tecido nervoso (Middleton, 1975) e são importantes constituintes estruturais e funcionais do cérebro de mamíferos. O cérebro é único nesta composição lipídica, especialmente de lipídios sintetizados e armazenados durante a maturação (Yeh *et al.*,1977). A mielina perfaz 60-70% do total de lipídios cerebrais e do conteúdo de ácidos graxos (Zammit,1981).

No rato, o conteúdo de ácidos graxos do cérebro aumenta mais do que quatro vezes no período entre o quinto dia pós-nascimento e o

estado adulto.

### **I.12.Síntese de lipídios a partir da glicose em cérebro de ratos imaturos**

No primeiro dia de vida pós-natal, no cérebro de ratos, 57% do total de glicose utilizada é oxidada para produção de energia e 43% para a síntese de lipídios. Entre o sexto dia de vida e a idade adulta, 77-86% do total de glicose é utilizada pelo cérebro para produção de CO<sub>2</sub> e somente 14-23% para a síntese de lipídios (Yeh *et al.*,1977). A síntese de ácidos graxos e esteróis a partir da glicose em cérebro de ratos de dezoito dias de idade é um processo menos eficiente do que a síntese lipídica a partir de corpos cetônicos neste período (Owen *et al.*,1975). Os lipídios sintetizados a partir da glicose incluem fosfolipídios, glicerídeos, colesterol e ácidos graxos livres ( Yeh *et al.*,1977). Porém, a glicose parece ser um precursor mais eficaz para a síntese de ácidos graxos do que para a síntese de esteróis no cérebro de ratos de dezoito dias de idade (Escrivã *et al.*,1984). A síntese de lipídios a partir da glicose é baixa, e não varia acentuadamente com a idade dos ratos. A capacidade para sintetizar lipídios a partir de glicose é baixa e um tanto inalterada durante todo o desenvolvimento pós-natal (Yeh *et al.*,1977). A mais ativa biossíntese de lipídios a partir de glicose é encontrada no tronco cerebral (Yeh *et al.*,1977).

Da mesma forma, em culturas primárias de neurônios, astrócitos ou oligodendrócitos, a glicose é preferencialmente utilizada para produção de energia, sendo ativamente convertida em lactato e

participando pouco para a biossíntese de lipídios (Edmond *et al.*,1985).

### **I.13.Evolução pós-natal da velocidade de síntese de lipídios a partir de corpos cetônicos em cérebro de ratos**

A placenta da rata é permeável aos corpos cetônicos, os quais são rapidamente utilizados pelo feto para a síntese de ácidos graxos e colesterol a uma velocidade maior do que a que ocorre na rata mãe. Aos vinte e um dias de gestação a síntese de lipídios a partir de  $\beta$ OH-Butirato é muito baixa (Robinson & Williamson,1980).

Após o nascimento, a velocidade de síntese “de novo” de ácidos graxos a partir do acetoacetato é onze vezes maior no rato de um dia de idade do que no rato adulto. Esta quantidade aumenta até o quinto dia de idade, caindo acentuadamente durante todo o período de amamentação (Yeh *et al.*,1977). Outros autores têm encontrado um pico na síntese de lipídios cerebrais a partir de corpos cetônicos no oitavo dia de vida pós-natal (Patel & Balazs,1980), no décimo segundo dia de vida pós-natal (Snell,1981) ou no décimo quinto dia de vida pós-natal (Pollak,1977).

Os corpos cetônicos são utilizados mais prontamente para a síntese de lipídios cerebrais do que a glicose, especialmente em cérebro de ratos imaturos. Eles têm um papel importante na síntese dos principais lipídios cerebrais, dependente das necessidades do cérebro em crescimento e da mielinização. Os corpos cetônicos comportam-se diferentemente da glicose, possuindo precursores diretos para a biossíntese do colesterol cerebral. De forma oposta, a

glicose é preferencialmente utilizada como fonte energética para o cérebro de ratos durante o período de amamentação.

#### **I.14. Interações entre a utilização de corpos cetônicos e glicose em cérebro de ratos imaturos**

O cérebro utiliza uma variedade de substratos para produção de energia e como precursores para neurotransmissores e componentes estruturais. Durante o período de rápido desenvolvimento cerebral do cérebro, os mecanismos regulatórios de utilização dos corpos cetônicos são diferentes dos utilizados para a regulação da utilização da glicose (Tildon *et al.*, 1983). A compartimentalização das atividades metabólicas nas organelas subcelulares exerce um importante papel nas interações entre estas fontes energéticas.

Em situações onde ocorrem altos níveis de corpos cetônicos sanguíneos, a concentração cerebral de glicose, glicose-6-P, piruvato, citrato, alfacetogluturato, malato e glutamato está aumentada (Miller, 1986), sugerindo que uma aguda hipercetonemia diminui o fluxo das reações da hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato desidrogenase. Porém, a captação de substratos no ciclo do ácido tricarboxílico temporariamente excede a liberação de CO<sub>2</sub>, acarretando aumento dos níveis de intermediários do ciclo e dos níveis de glutamato (Miller, 1986). Outras observações com cérebro de ratos *in vivo* (Schroeder *et al.*, 1991) e *in vitro* (Sivitz *et al.*, 1989), sugerem que corpos cetônicos inibem a oxidação do piruvato por uma inibição do *feedback* por acetyl-CoA no complexo piruvato desidrogenase. A relação entre o complexo piruvato desidrogenase ativo/inativo está

reduzida em 18% da atividade na presença de  $\beta$ OH-Butirato (Winick *et al.*,1971). A inibição da velocidade da descarboxilação do piruvato pode estar relacionada ao aumento na razão da acetil-CoA/CoA induzido pela hipercetonemia. Porém, o  $\beta$ OH-Butirato pode também inibir o complexo piruvato desidrogenase por competição com o piruvato intramitocondrial, reduzindo a quantidade de piruvato disponível (Booth *et al.*,1981).

Os corpos cetônicos são melhores precursores do que a glicose para a síntese de lipídios cerebrais, no período de lactação. Porém, a formação lipídica a partir de corpos cetônicos pode ser totalmente efetiva na presença de glicose a qual fornece o NADPH necessário para esta rota metabólica (Sokoloff,1981).

### **I.15. Mudanças ontogênicas na atividade enzimática**

A atividade das enzimas da rota de utilização de corpos cetônicos em cérebro de cobaia é baixa durante o período gestacional, no período neonatal e apresenta um pequeno aumento durante o período de lactação (Booth *et al.*,1980). Em contraste, estas enzimas ( $\beta$ OH-Butirato desidrogenase, 3-cetoácidoCoAtransferase, acetoacetil-CoA-tiolase) no cérebro de ratos apresentam um aumento de três a quatro vezes, durante o período de lactação em relação aos níveis destas enzimas no rato adulto (Booth *et al.*,1980).

As atividades da hexoquinase (mitocondrial e citosólica), piruvato desidrogenase, lactato desidrogenase e citrato sintase apresentam um acentuado aumento no cérebro de cobaia nos últimos dez a quinze dias antes do nascimento, de modo que ao nascimento a cobaia

possui as atividades destas enzimas semelhantes às atividades encontrada na cobaia adulta (Booth *et al.*,1980). Isto contrasta com o desenvolvimento destas enzimas em cérebro de ratos, onde estas enzimas aumentam sua atividade a partir do décimo ao décimo quinto dia de vida pós-natal.

O aumento das atividades das enzimas da glicólise aeróbica se correlaciona com o início da competência neurológica nas duas espécies, a cobaia uma espécie precocial nasce neurologicamente competente, e o rato uma espécie não precocial que nasce neurologicamente imaturo (Booth *et al.*,1980).

### **I.16.Metabolismo da Glicina**

Uma atenção especial tem sido dada ao metabolismo da glicina no Sistema Nervoso Central, por sua importância como neurotransmissor inibitório e pela sua habilidade em potencializar a ação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Danysz & Parsons, 1998). Além disso, vem sendo realizados estudos em relação ao seu catabolismo, em função de distúrbios do sistema enzimático responsável por sua degradação em pacientes com hiperglicinemia não cetótica (Daly *et al.*,1976). A glicina também atua na regulação do *pool* de grupos monocarbônicos (Hiraga *et al.*,1981).

A glicina, um aminoácido não essencial, é, estruturalmente, o mais simples dos aminoácidos. No cérebro, está intimamente relacionado com o metabolismo intermediário, além de ser um precursor de proteínas.

No Sistema Nervoso Central, a glicina pode ser facilmente

sintetizada a partir da serina, através da remoção de um átomo de carbono pela serina hidroximetil transferase (Daly *et al.*, 1976).

A glicina pode ser convertida em serina, numa reação catalisada pela serina-hidroximetil transferase, seguida pela reação catalisada pela serina-desidratase, que tem como produto o piruvato, o qual, por descarboxilação oxidativa, forma acetil-CoA, que poderá ser oxidado através do Ciclo de Krebs. Entretanto, a principal via do catabolismo da glicina no cérebro, fígado, rins e placenta é a sua clivagem oxidativa a CO<sub>2</sub>, amônia e um grupo metileno, pela ação enzimática do sistema de clivagem da glicina (SCG) (Sato *et al.*, 1991; Daly *et al.*, 1976; Hiraga *et al.*, 1981; Ewart *et al.*, 1992)(Figura 1.2).

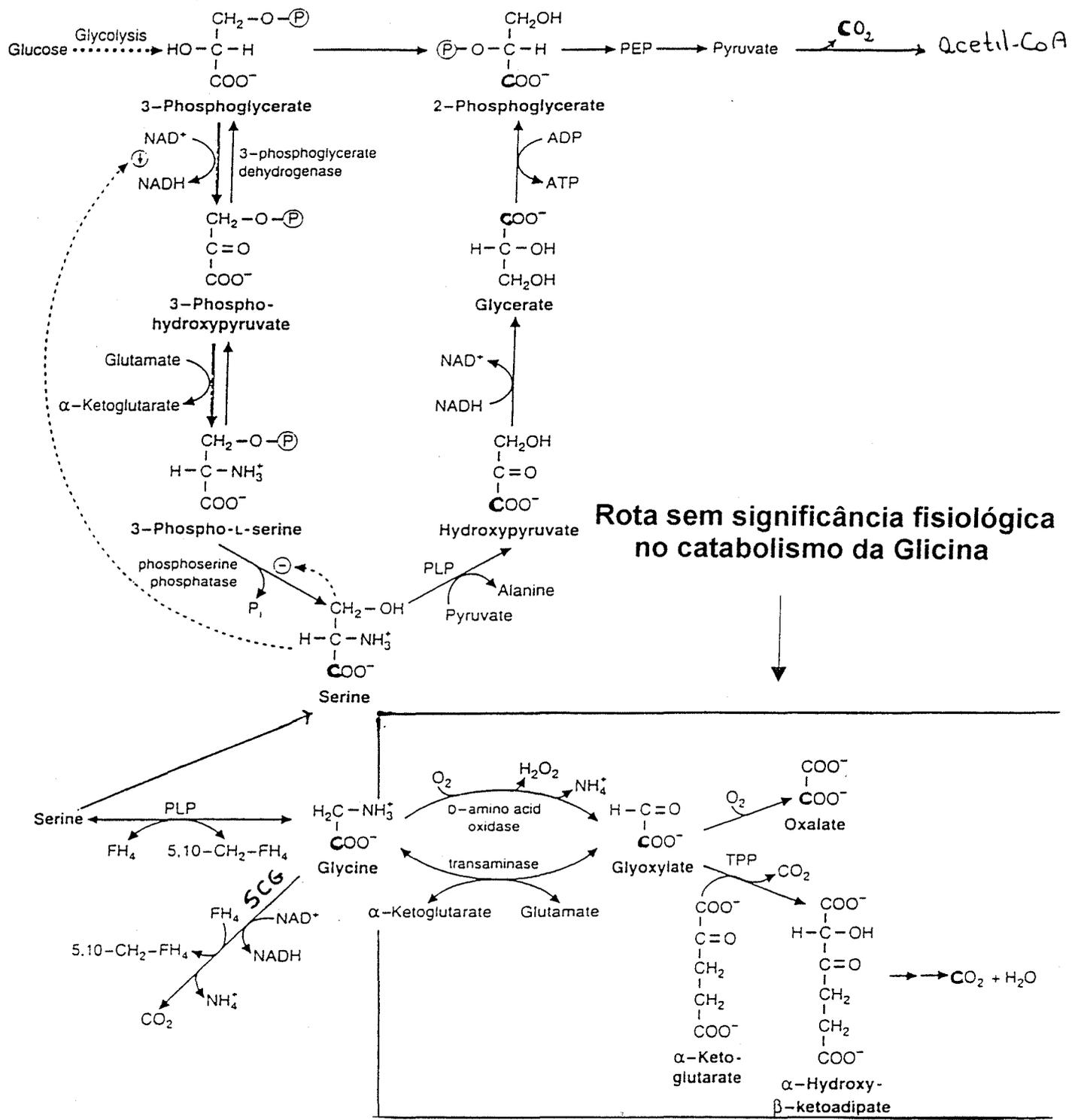
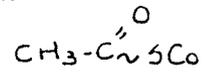
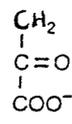
O Sistema de Clivagem da Glicina consiste de quatro componentes protéicos denominados: proteína P (uma proteína contendo piridoxal fosfato), proteína H (uma proteína contendo ácido lipóico, inicialmente denominada como proteína carreadora de hidrogênio); proteína T (proteína de catálise dependente do tetrahydrofolato), e a proteína L (uma lipoamido dehidrogenase). O sistema de clivagem da glicina está restrito à mitocôndria (Sato, 1991).

Em estudos realizados por Sato e colaboradores (1991), sobre a localização do sistema de clivagem da glicina, em cérebro de ratos de quatorze dias de vida pós-natal, foi mostrado que a proteína P (constituente do Sistema de Clivagem da Glicina) estava presente apenas nos astrócitos, localizada nas mitocôndrias, indicando serem estas células o principal sítio de degradação da glicina no Sistema Nervoso Central, sugerindo que um dos fatores na hiperglicinemia não cetótica é um distúrbio dos astrócitos. Observaram também que a proteína P variava em quantidades diferentes de acordo com a região

cerebral. Em algumas regiões, como no hipocampo, cerebelo e retina, mostraram alto conteúdo da proteína P, enquanto que outras, como por exemplo a medula oblonga, apresentaram pouco conteúdo da proteína.

Bixel e colaboradores, em 1993, mostraram que em uma cultura rica em astrócitos, a meia-vida da leucina foi de oito dias, a valina apresentou uma meia-vida de dezesseis dias e a glicina foi completamente consumida do meio de cultura em quatro dias.

Estudos realizados por Mase e colaboradores (1996) mostraram que a incorporação de glicina marcada em proteínas, por fatias de córtex cerebral de cobaias, foi aproximadamente duas vezes maior do que por fatias de fígado. A incorporação de glicina pela substância branca foi cerca de 80% maior do que pela substância cinzenta; não houve diferença entre fatias das partes anterior, intermédia e posterior do córtex cerebral.



Rota sem significância fisiológica no catabolismo da Glicina

**Figura I.2** As duas vias do catabolismo da Glicina: a conversão em serina pela ação da serina hidroximetil transferase e a clivagem oxidativa a CO<sub>2</sub>, amônia e um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>) através da ação enzimática do sistema de clivagem da glicina (SCG).

## I.17. Metabolismo da Glutamina

É bem estabelecido que a glutamina é o principal precursor para os neurotransmissores glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e aspartato (Bradford *et al.*, 1978; Hamberger *et al.*, 1979; Reubi, 1980). Estudos de Tildon e Roeder (1984) sugerem que a glutamina pode prover energia para o cérebro.

Tildon e colaboradores (1983) utilizaram glutamina não marcada que foi efetiva na competição com a glicose. Porém, a adição de glicose não marcada não mostrou efeito na oxidação da glutamina. Tais resultados sugerem que a glutamina ou um de seus metabólitos inibe uma etapa da via de metabolização da glicose no cérebro. No fígado, a glutamina inibe a atividade da piruvato desidrogenase (Häussinger *et al.*, 1982). O mesmo grupo de pesquisadores mostrou que o  $\beta$ OH-Butirato e o acetoacetato elevam a produção de  $\text{CO}_2$  a partir da glutamina em homogeneizados de cérebro de ratos com idade de até vinte dias. O mecanismo atribuído para este aumento foi relacionado à liberação da inibição da atividade da alfa-oxoglutarato desidrogenase, sendo que tal inibição ocorre no sinaptossoma e não na mitocôndria isolada (Roeder *et al.*, 1983). Estudos sobre a enzima 3-oxo-acido CoA transferase mostraram que os seus valores estavam aumentados em duas vezes nas terminações nervosas, quando comparados aos valores encontrados em mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos de quinze a dezoito dias de idade (De Vivo *et al.*, 1976). Foi mostrado (Garland, 1964; Smith *et al.*, 1974) que a succinil-CoA é um efetivo inibidor da enzima alfa-oxoglutarato desidrogenase; portanto, a adição de corpos cetônicos pode diminuir a

quantidade de succinil-CoA por utilizá-la para a síntese de acetoacetil-CoA (produzindo succinato livre). Como consequência, a oxidação da glutamina pode ser menos inibida. Os dados de elevação de oxidação da glutamina pelos corpos cetônicos foram encontrados em animais de até 20 dias de idade, mas não em animais adultos, sendo concordante com a bibliografia que estabelece alta atividade das enzimas de metabolização dos corpos cetônicos em animais jovens (Page *et al.*, 1971; Tildon *et al.*, 1971).

Roeder e colaboradores (1983) mostraram que a oxidação da glutamina a CO<sub>2</sub> por células isoladas de cérebro de ratos adultos foi duas vezes superior à oxidação da mesma por células isoladas de cérebro de ratos de dois dias de vida pós-natal. Os referidos autores não encontraram diferenças na oxidação da glutamina a CO<sub>2</sub> por homogeneizados de cérebro de ratos entre a idade de dois dias até a fase adulta. A diferença da oxidação da glutamina a CO<sub>2</sub> entre as duas preparações (células e homogeneizados) pode ser devida a uma variação ontogênica no transportador da glutamina (Roeder *et al.*, 1983).

### **I.18. Metabolismo do Glicerol**

A fosforilação e a utilização do glicerol dependem da glicerol quinase, uma enzima que catalisa a fosforilação de glicerol por ATP para glicerol-3-fosfato. Essa enzima foi descoberta em 1939 por Kalckar, no rim. Se pensou, na época, que a enzima estaria presente apenas no fígado e rim (Wieland & Suyter, 1957). Posteriormente, em 1967, foi detectada em uma variedade de tecidos por Robinson &

Newsholme. Trabalhos de O'Brien & Geison, em 1974, injetando glicerol radioativo intracranialmente em ratos, mostraram que ele foi incorporado em glicerolipídios cerebrais. Isso sugere que o glicerol é fosforilado no cérebro a glicerol-3-P e conseqüentemente acilado e convertido a diferentes lipídios (Jenkins, 1975).

A glicerol quinase também pode catalisar a fosforilação da dihidroxiacetona e L-gliceraldeído por ATP, para formar dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e L-gliceraldeído-3-P, respectivamente (Bublitz & Kennedy, 1954). Os resultados indicaram que a atividade da glicerol quinase está limitada principalmente à fração mitocondrial, sendo que a atividade específica desta enzima no citosol é de 15% do valor mitocondrial da mesma (Jenkins & Hajra, 1975).

A glicerol quinase exerce um papel importante na reutilização de glicerol livre formado pela lipólise nos tecidos. A concentração de glicerol livre no cérebro é relatada como sendo 0,4–0,7 mM (Wieland, 1957). Em virtude do Km da gliceroquinase mitocondrial cerebral ser baixo (70 $\mu$ M), o cérebro pode ser capaz de utilizar o glicerol endógeno de forma eficaz. A concentração sangüínea de glicerol varia de 0,1–0,2 mM. Porém, Crone, em 1965, mostrou que o glicerol não é facilmente transportado através da barreira hematoencefálica. Neste caso, a glicerol quinase exerce um papel importante na reutilização do glicerol livre, o qual é formado pela degradação de glicerolipídio no cérebro.

## **II.OBJETIVOS**

Nesta tese utilizamos os nutrientes energéticos, glicose, lactato,  $\beta$ OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina, visando os seguintes objetivos:

- Estudar o comportamento ontogênico destes nutrientes energéticos isoladamente, nas idades fetal, 10 dias, 21 dias e adulto em relação a oxidação dos mesmos a  $\text{CO}_2$  e a sua conversão a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos.
- Estudar comparativamente estes nutrientes energéticos nas idades fetal, 10 dias, 21 dias e adulto em relação a oxidação dos mesmos a  $\text{CO}_2$  e a sua conversão a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos.

### **III. MATERIAIS E MÉTODO**

#### **III.1.MATERIAIS**

##### **III.1.1.Reagentes**

D [U -<sup>14</sup> C]-GLICOSE. Atividade específica: 297 mCi / mmol  
(Amersham Life Science. Buckinghamshire, Inglaterra.)

L [U -<sup>14</sup> C]-LACTATO. Atividade específica: 152 mCi / mmol  
(Amersham Life Science. Buckinghamshire, Inglaterra.)

D[3 -<sup>14</sup> C]- βOH-Butirato. Atividade específica: 18,2 mCi / mmol  
(Amersham Life Science. Buckinghamshire, Inglaterra.)

[U -<sup>14</sup> C]-GLICEROL. Atividade Específica: 157 mCi/mmol  
(Amersham Life Science .Buckinghamshire, Inglaterra.)

D[U- <sup>14</sup> C]-GLUTAMINA. Atividade específica: 277 mCi/ mmol  
(Amersham Life Science. Buckinghamshire, Inglaterra.)

[2-<sup>14</sup> C]-GLICINA. Atividade específica: 98 mCi / mmol

[1-<sup>14</sup> C]-GLICINA. Atividade específica: 98 mCi / mmol  
(Amersham Life Science. Buckinghamshire, Inglaterra.)

GLICOSE (Quimibrás Indústrias Químicas S.A–Rio de Janeiro,RJ, Brasil)

LACTATO (Sigma Chemical Company- St.Louis, Mo, E.U.A )

βOH-BUTIRATO (Sigma Chemical Company-St.Louis, E.U.A)

GLUTAMINA (Merck S.A –Porto Alegre,RS, Brasil )

GLICINA (Sigma Chemical Company-St.Louis,Mo, E.U.A)

GLICEROL (Sigma Chemical Company-St.Louis, Mo, E.U.A)

POP/ POPOP ( Sigma Chemical Company-St.Louis, Mo, E.U.A )

Clorofórmio (Merck S.A-Porto Alegre, RS, Brasil)

Metanol (Merck S.A.-Porto Alegre, RS, Brasil)

Hidróxido de Hiamina(J.T.Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ, E.U.A)

Tolueno (Merck S.A.-Porto Alegre,RS, Brasil)

Ácido Tricloro Acético ( Merck S.A.-Porto Alegre,RS, Brasil)

Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram pró-análise .

### **III.1.2. Animais Experimentais**

Foram utilizados ratos albino Wistar provenientes do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, alimentados com dieta comercial (Guabilab, Porto Alegre,RS-Brasil) contendo 23 g % de proteínas. Os ratos receberam alimento e água *ad libitum* e foram mantidos em ambiente climatizado (21-23 °C), passando por ciclos consecutivos de 12 horas claro / 12 horas escuro.

## **III.2. MÉTODOS:**

### **III.2.1. Modelo Experimental de Ontogênia**

Ratas com aproximadamente 260 g foram acasaladas.

O início da gestação foi considerado pela presença de espermatozoides na vagina das ratas.

Aos vinte e um dias de gestação, a rata foi sacrificada por decapitação e após uma rápida histerectomia, os fetos foram retirados e o cordão umbilical cortado. Os procedimentos foram realizados com temperaturas de aproximadamente 37°C. Os fetos foram sacrificados

por decapitação e seus cerebelos retirados rapidamente, pesados e suas fatias preparadas em um tempo total de dois minutos.

Os ratos utilizados nas idades de dez, vinte e um e noventa dias (adulto) foram sacrificados por decapitação e seus cerebelos retirados, pesados e suas fatias preparadas em um tempo total de dois minutos.

### **III.2.2. Isolamento dos cerebelos:**

Os cérebros foram removidos rapidamente, colocados sobre placa de Petry invertidas sobre gelo, cobertas com discos de papel filtro umedecido com solução tampão Krebs Ringer bicarbonato. Os cerebelos foram, então, isolados e pesados.

### **III.2.3. Composição da solução de Krebs Ringer bicarbonato:**

Para a preparação da solução de KRb, foram utilizados 2,0 ml de cada solução estoque (Tabela III.1), acrescentando-se cada sal conforme a sequência da tabela, ficando por último o sulfato de magnésio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) e o cloreto de cálcio ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ). A solução de bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) foi preparada a partir da pesagem de  $NaHCO_3$  no momento da preparação da solução KRb. O volume final foi completado com 40 ml de água destilada, sendo que a solução foi aerada com uma mistura de gases contendo 95% de  $O_2$  e 5% de  $CO_2$  durante 15 minutos. O pH da solução foi levado a 7,4.

TABELA III.1: Soluções estoques para o preparo do KRb

SOLUÇÃO	MOLARIDADE
$K_2HPO_4$	1,50 mM
$NaHCO_3$	25,00 mM
$NaCl$	118,00 mM
$KCl$	4,61 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,76 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,50 mM

#### III.2.4. Condições de incubação

Para determinar a síntese lipídica e produção de  $CO_2$ , fatias de cerebelos de aproximadamente 25 mg foram cortados em fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Schopper) em fatias de espessura de 0,3 mm e incubados em :

- 1) 1,5 ml de solução tampão de Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4, contendo 5,0 mM de D-glicose + 0,2  $\mu$ Ci de D [U- $^{14}C$ ] glicose; ou
- 2) 1,5 ml de solução tampão de Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4, contendo 10,0 mM de D-lactato + 0,2  $\mu$ Ci de D-[U- $^{14}C$ ] lactato; ou
- 3) 1,5 ml de solução tampão de Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4, contendo 2 mM de  $\beta$ -OHButirato + 0,2  $\mu$ Ci de D[3- $^{14}C$ ]  $\beta$ OH-Butirato; ou
- 4) 1,5 ml de solução tampão de Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4, contendo 1 mM de glicerol + 0,2  $\mu$ Ci de D[U- $^{14}C$ ] glicerol; ou

5) 1,5 ml de solução tampão de Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4, contendo 0,5 mM de glicina + 0,2  $\mu$ Ci de D[1-<sup>14</sup>C] glicina; ou

6) 1,5 ml de solução tampão de Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4, contendo 2 mM de glutamina + 0,2  $\mu$ Ci de D [ U <sup>14</sup> C] glutamina.

Os nutrientes energéticos foram incubados isoladamente em concentrações saturantes, com exceção da glicina, na presença de 0,2  $\mu$ Ci do respectivo nutriente uniformemente marcado com <sup>14</sup>C, com exceção da Glicina, a qual foi marcada no carbono 1 ou no carbono 2 e do  $\beta$ OH-Butirato o qual foi marcado no carbono 3. A glicina foi utilizada na concentração de 0,5 mM, devido ao fato de que sua concentração plasmática está em torno de 0,2 mM.

O conteúdo dos frascos foi gaseificado, um a um, com carbogênio (95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono) por um minuto. Após, os frascos foram fechados com tampas de borracha contendo poços de vidro com papel filtro (dobrado em forma de " W "), e então selados com papel vedante (*parafilm*). A temperatura de incubação foi de 35° C, em agitador metabólico Dubnoff (60 ciclos/min), por 30 minutos, de acordo com o método de Dunlop e col. (1974), modificado.

Após os 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição ao meio de incubação, por meio de seringa graduada, de 0,2 ml de ácido tricloroacético ( TCA ) a 50%. Após, foi injetado dentro dos poços de vidro, contendo papel filtro, 0,2 ml de hidróxido de hiamina, utilizando-se outra seringa graduada. Os frascos foram novamente vedados e retornaram ao banho de Dubnoff com agitação por mais 30

minutos a 35° C para captação do CO<sub>2</sub>. Isoladamente, frasco por frasco foi retirado do banho de Dubnoff.

### **III.2.5. Determinação da captação de CO<sub>2</sub> a partir dos substratos utilizados**

O conteúdo dos poços de vidro (hidróxido de hiamina e papel filtro) foi transferido para *vials* com auxílio de pipeta automática e de pinça e adicionado 8 ml de uma solução de POP/POPOP/TOLUENO (4,0 g de POP; 50,0 mg de POPOP e 1000 ml de tolueno) para a contagem de radioatividade, medida em contador de cintilação líquida WALLAC 1409.

### **III.2.6. Determinação de lipídios a partir dos substratos utilizados:**

O conteúdo de cada frasco contendo o meio de incubação e a estrutura foi homogeneizado em Potter-Elvehjem. O homogeinizador de Potter-Elvehjem foi lavado com 1,0 ml de TCA 10 % e transferido para tubos de ensaio. Os tubos foram centrifugados (1000 g) por dez minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 1 ml de TCA 10%. Esta operação foi repetida por mais duas vezes. Os tubos de ensaio com o precipitado foram deixados emborcados em papel absorvente, até secarem por completo. Para a extração dos lipídios, os precipitados foram ressuspensos com 1,0 ml de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), agitados por 10 minutos à temperatura ambiente em tubos de ensaio fechados com papel vedante (*parafilm*). Após, os tubos foram centrifugados a 1000 g por 10 minutos e o sobrenadante de cada tubo transferido para *vials* através de pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido por mais

duas vezes. Após evaporação total do solvente, foi adicionado aos *vials* 8,0 ml do líquido de cintilação POP/POPOP/TOLUENO, e a radioatividade foi medida em contador de cintilação líquida WALLAC 1409.

### **III.2.7. *Curvas de concentração dos Nutrientes Energéticos***

Foram realizadas curvas de concentração dos nutrientes energéticos estudados: glicose, lactato,  $\beta$ OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina; tanto para a produção de CO<sub>2</sub> como para a produção de lipídios.

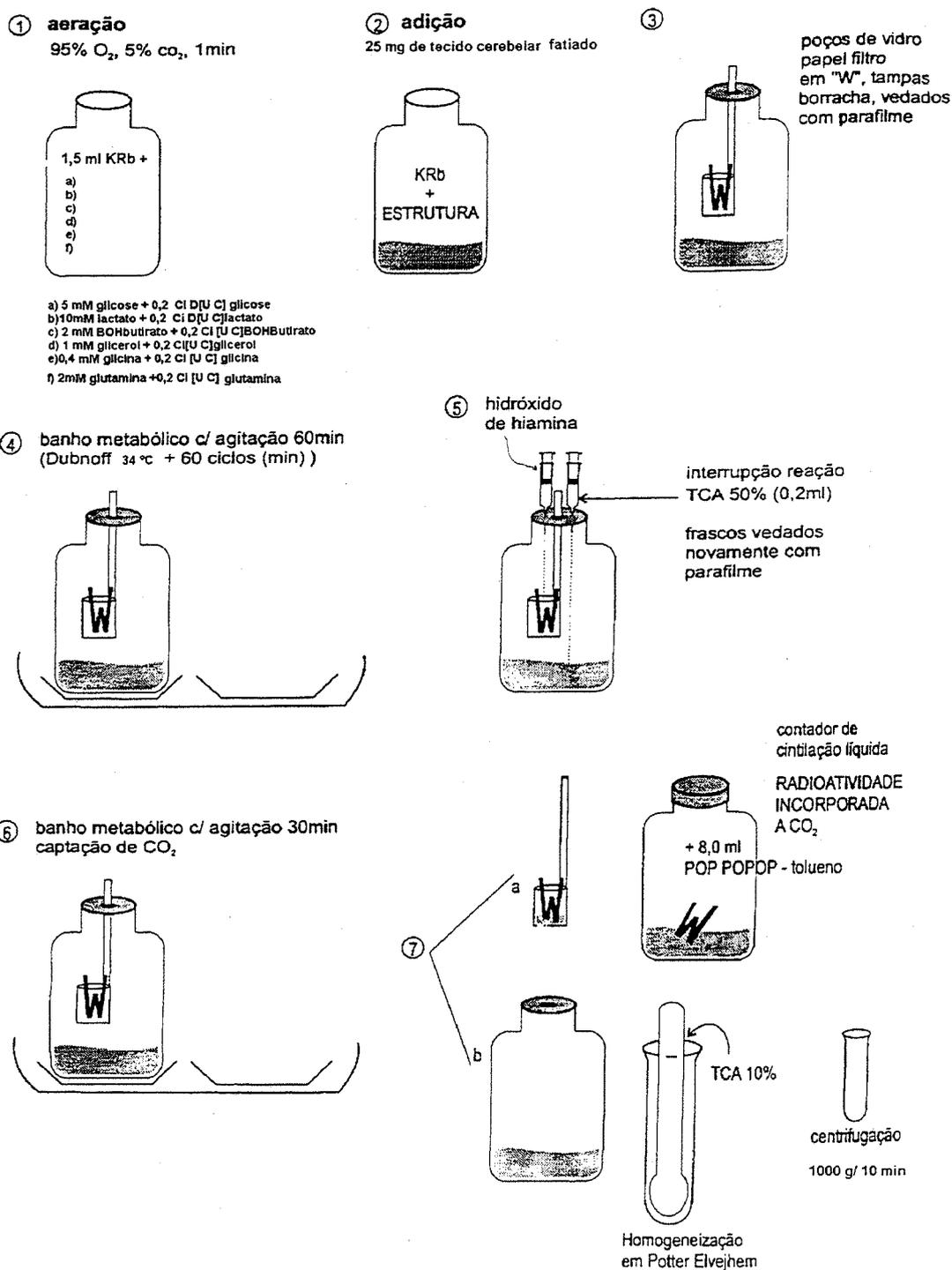
### **III.2.8. *Análise Estatística***

Os resultados foram analisados, estatisticamente, através da análise de variância de uma via, seguido pelo teste de múltipla abrangência de Duncan, utilizando-se o programa SPSS/PC-plus.

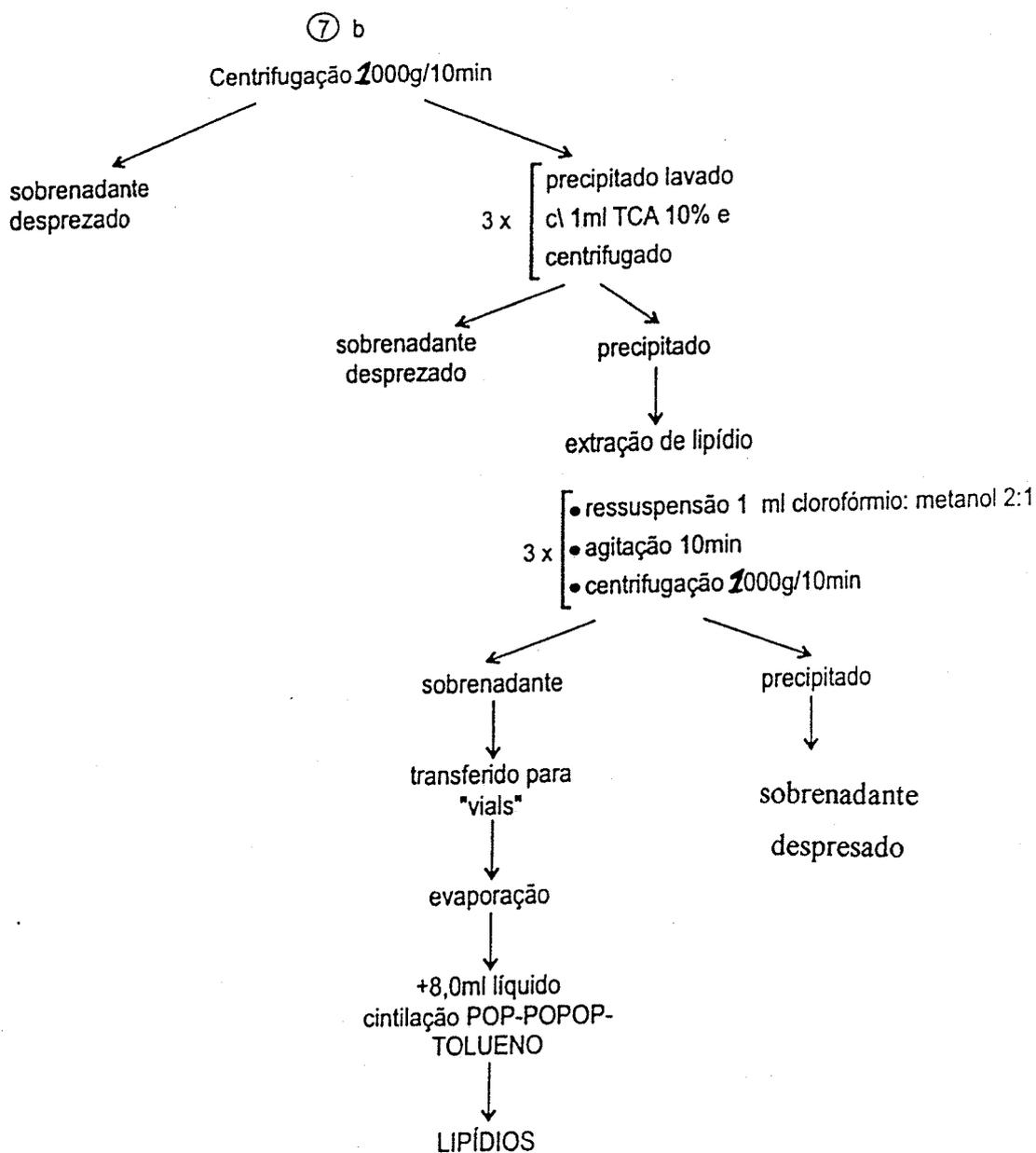
Considerou-se diferenças entre medidas estatisticamente significativas, quando o nível de probabilidade (p) foi menor do que 0,05.

Quando pertinente, foi utilizado o teste t de Student, com nível de significância  $p < 0,05$ .

Os resultados foram mostrados como média  $\pm$  erro-padrão da média.



**Figura III.1.** Metodologia empregada na incubação e avaliação da oxidação a CO<sub>2</sub> e determinação de lipídios dos nutrientes energéticos estudados: glicose, lactato, βOH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.



**Figura III.2.** Condições de incubação, avaliação da oxidação a  $\text{CO}_2$  e determinação de lipídios dos nutrientes energéticos estudados: glicose, lactato,  $\beta\text{OH}$ -Butirato, glicerol, glicina e glutamina.

## **IV.RESULTADOS**

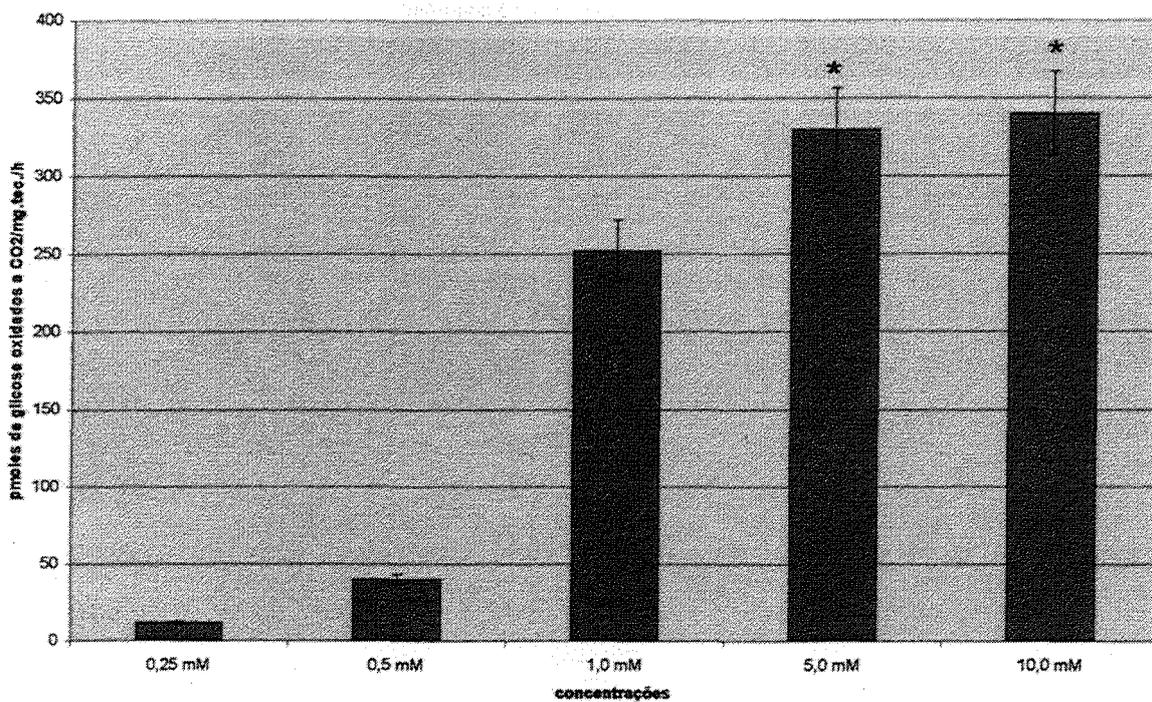
### ***IV.1.Curvas de Concentração da Utilização de Nutrientes Energéticos por fatias de cerebelo de ratos***

Com a finalidade de estudarmos a utilização de nutrientes energéticos por fatias de cerebelo de ratos realizamos curvas de concentração dos seguintes nutrientes: Glicose, Lactato,  $\beta$ OH-butirato, Glicerol, Glicina e Glutamina.

As concentrações utilizadas para cada nutriente estão indicadas nos gráficos de Curva de Concentração dos respectivos nutrientes. No estudo das curvas de concentração dos nutrientes, todos os nutrientes radioativos utilizados foram marcados  $^{14}$  C e foram utilizados 0,2  $\mu$  Ci dos mesmos.

#### **IV.1.1.Curvas de Concentração para Glicose**

Foram realizadas curvas de concentração para a Glicose nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 5,0 mM e 10,0 mM; a concentração de 5 mM mostrou-se saturante para a oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> e para a conversão da glicose a lipídios (Figuras IV.1 e IV.2.).

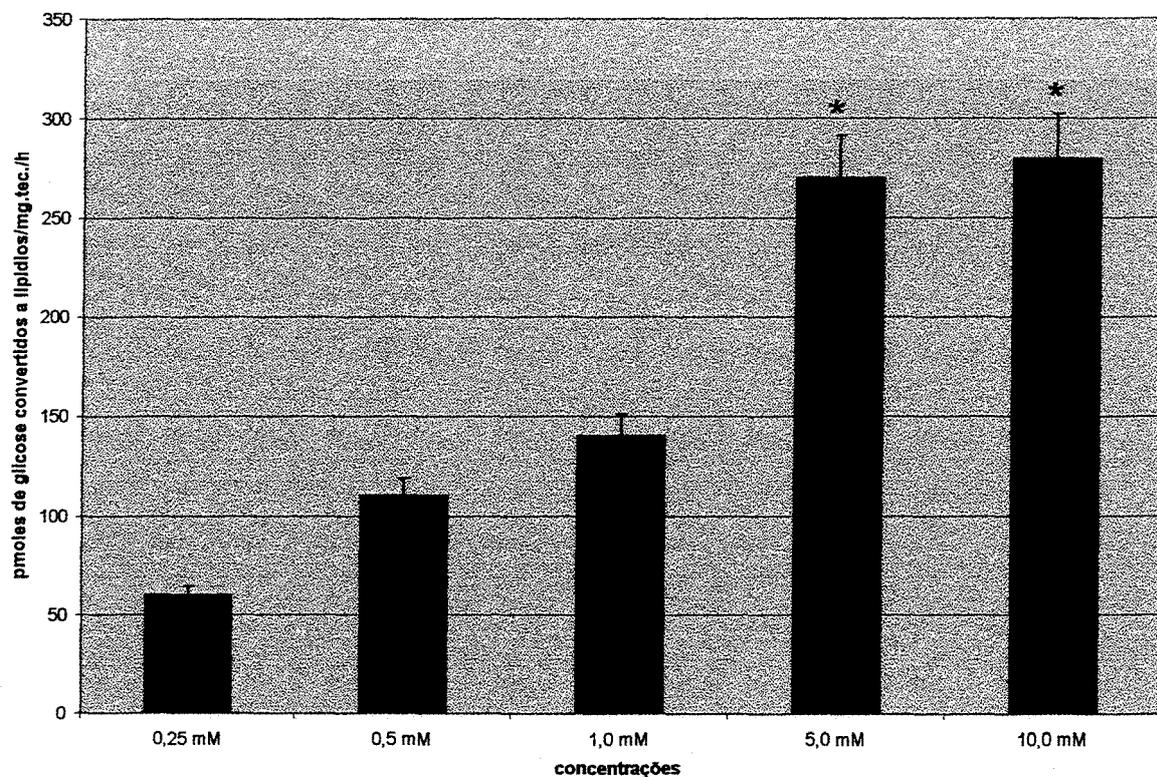


**Fig.IV.1. Curva de Concentração da Glicose oxidada a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.**

**Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.**

**n = 5 animais.**

**\*p < 0,01 (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação as demais concentrações.**



**Fig.IV.2. Curva de Concentração da Glicose convertida a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.**

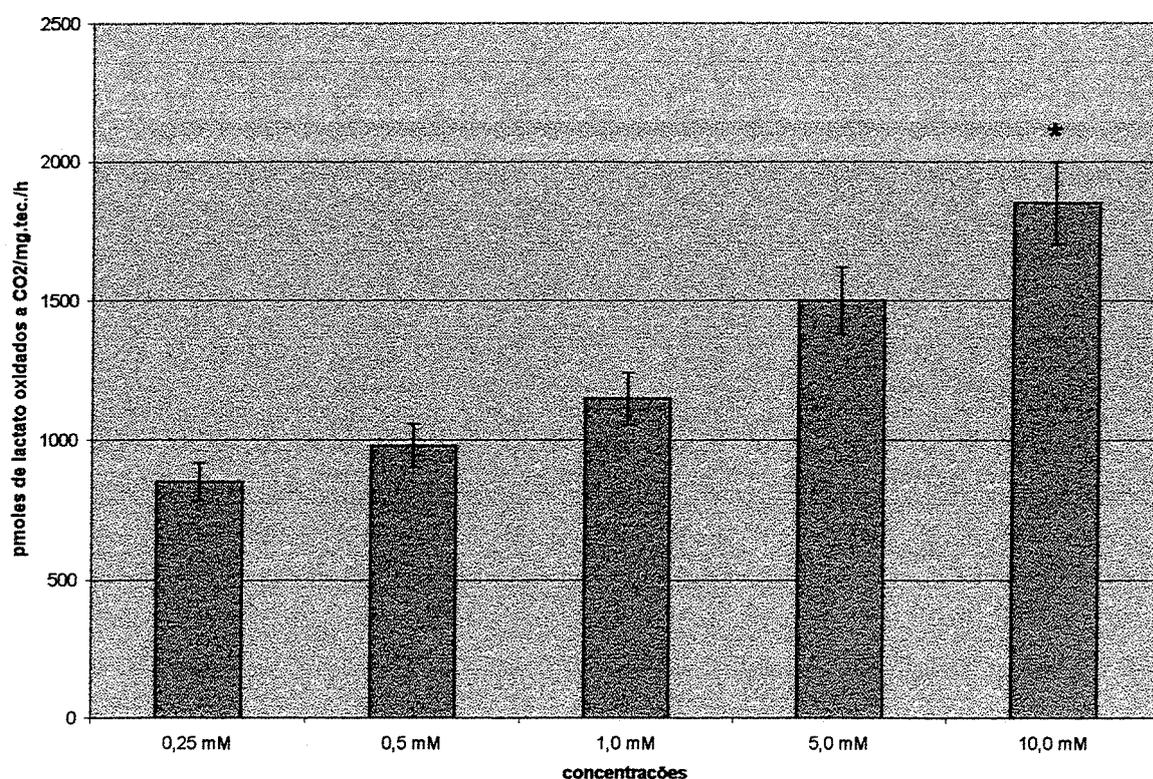
**Cada barra representa a média  $\pm$  EPM .**

**n = 5 animais.**

**\*  $p < 0,01$  (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.**

#### IV.1.2. Curvas de concentração para o lactato

Foram realizadas Curvas de Concentração para o lactato nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 5,0 mM, 10,0 mM. A concentração saturante de lactato para a conversão do lactato a lipídios e oxidação do lactato a CO<sub>2</sub> foi superior a 10 mM (Figuras IV.3 e IV.4).

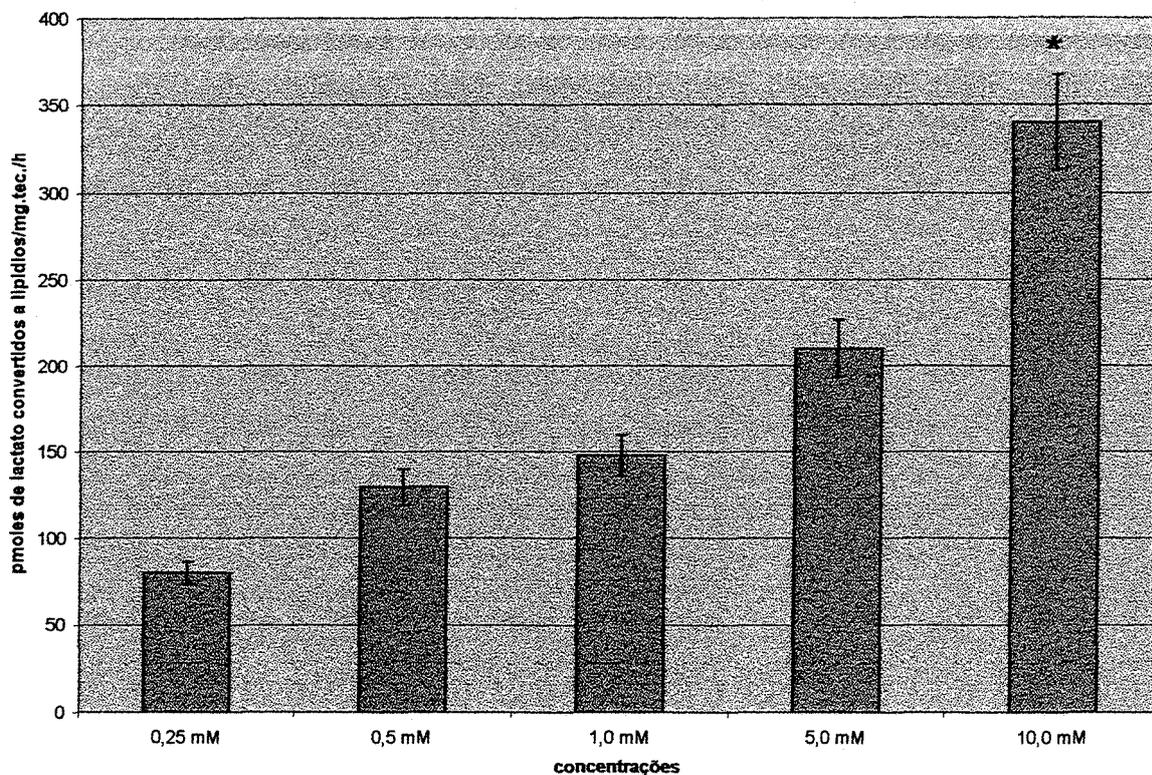


**Fig.IV.3. Curva de Concentração do Lactato oxidado a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.**

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM .

n = 5 animais.

\* p < 0,01 (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.



**Fig.IV.4.Curva de concentração do Lactato convertido a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.**

**Cada barra representa a média  $\pm$  EPM .**

**n = 5 animais.**

**\* p < 0,01 (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.**

### IV.1.3. Curvas de concentração para o $\beta$ OH-Butirato

Foram realizadas Curvas de Concentração para o  $\beta$ OH-Butirato nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 5 mM para oxidação à  $\text{CO}_2$  e conversão a lipídios. A concentração de 2 mM de  $\beta$ OH-Butirato foi saturante para a oxidação a  $\text{CO}_2$  e conversão a lipídios (Figuras IV.5e IV.6).

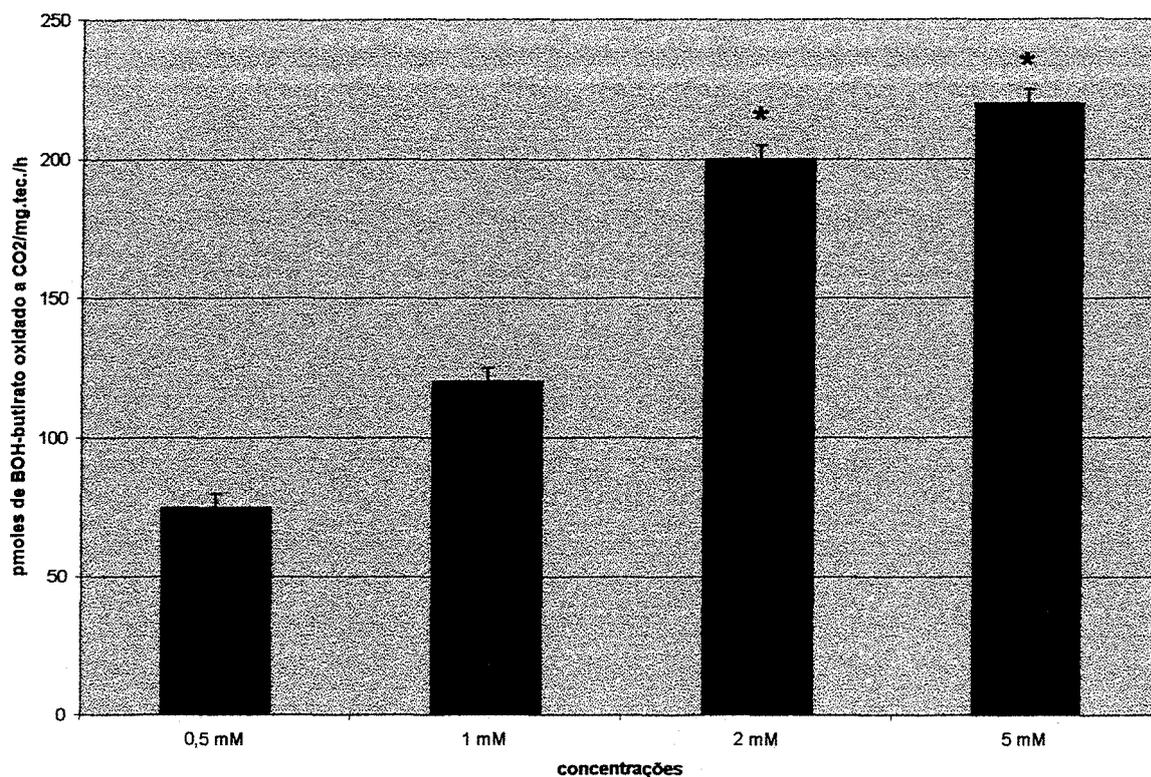
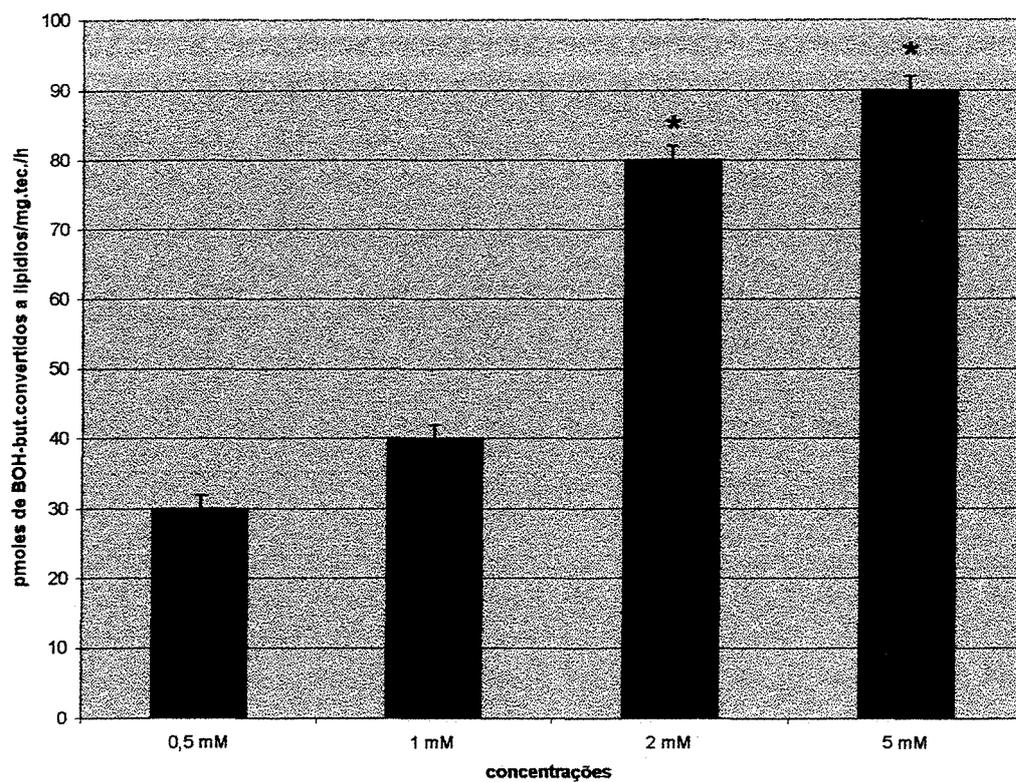


Fig.III.5. Curva de Concentração do  $\beta$ OH-Butirato oxidado a  $\text{CO}_2$ , em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM .

n = 5 animais.

\*  $p < 0,01$  (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.



**Fig.IV.6.Curva de Concentração do  $\beta$ OH-Butirato convertido a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.**

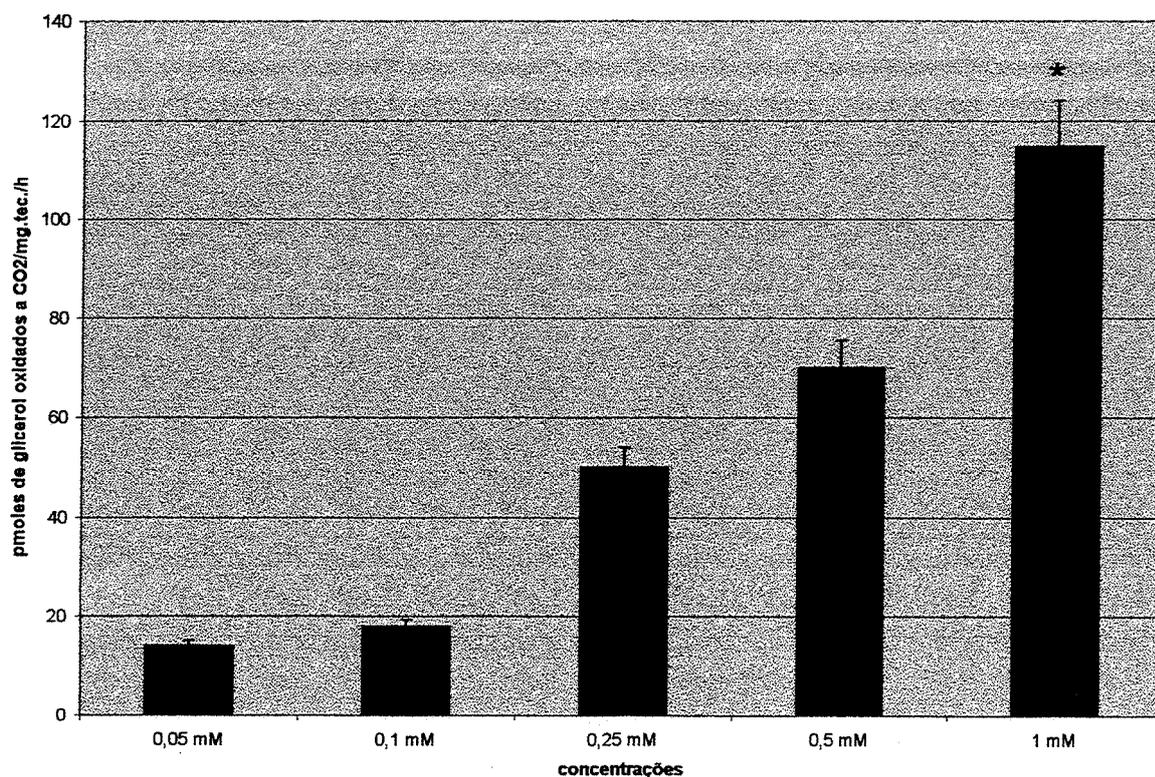
**Cada barra representa a média  $\pm$ EPM.**

**n = 5 animais.**

**\* p < 0,01 (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.**

#### IV.1.4. Curvas de Concentração para o Glicerol

Foram realizadas Curvas de Concentração para a conversão de lipídios a partir do Glicerol e oxidação do Glicerol a  $\text{CO}_2$  nas concentrações de 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM e 1 mM. A concentração de 1 mM não foi saturante para a oxidação do glicerol a  $\text{CO}_2$ , assim como a conversão do glicerol a lipídios (Figuras IV.7 e IV.8).

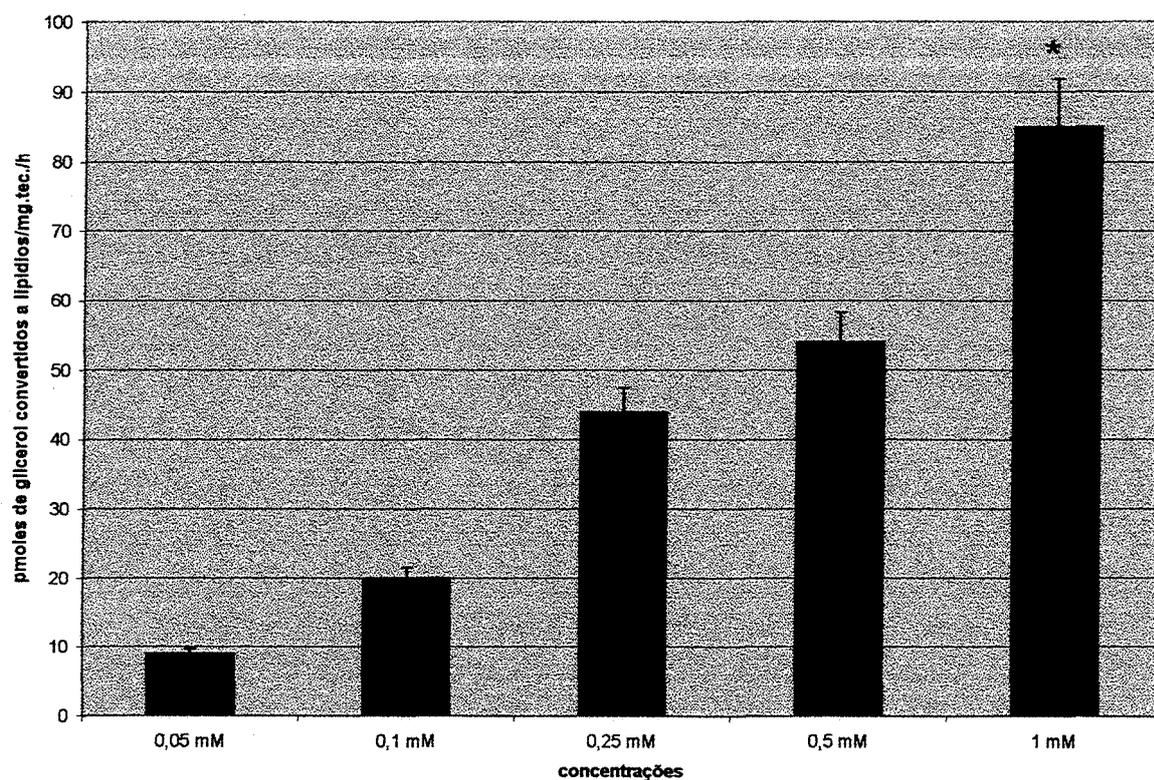


**Fig.IV.7.** Curva de concentração do Glicerol oxidado a  $\text{CO}_2$ , em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM.

n = 5 animais.

\*  $p < 0,01$  (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.



**Fig.IV.8. Curva de concentração do Glicerol convertido a lipídios, em fatias de cerebello de ratos de 10 dias de idade.**

**Cada barra representa a média  $\pm$  EPM .**

**n = 5 animais.**

**\*  $p < 0,01$  (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.**

#### IV.1. 5. Curvas de Concentração para a Glicina

Foram realizadas Curvas de Concentração da Glicina convertida a lipídios e da glicina oxidada a  $\text{CO}_2$ , nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM. A concentração saturante para a conversão da Glicina a lipídios e para a oxidação da Glicina a  $\text{CO}_2$  foi superior a 2 mM (Figuras IV.9 e IV.10).

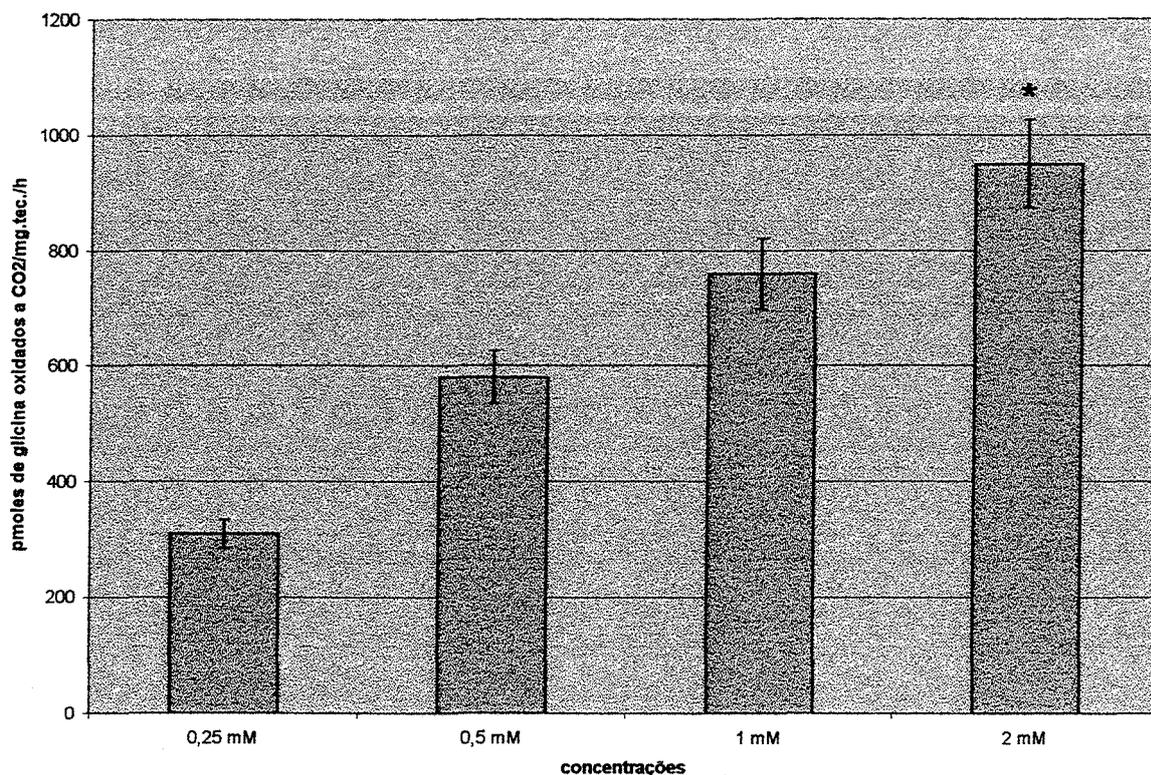
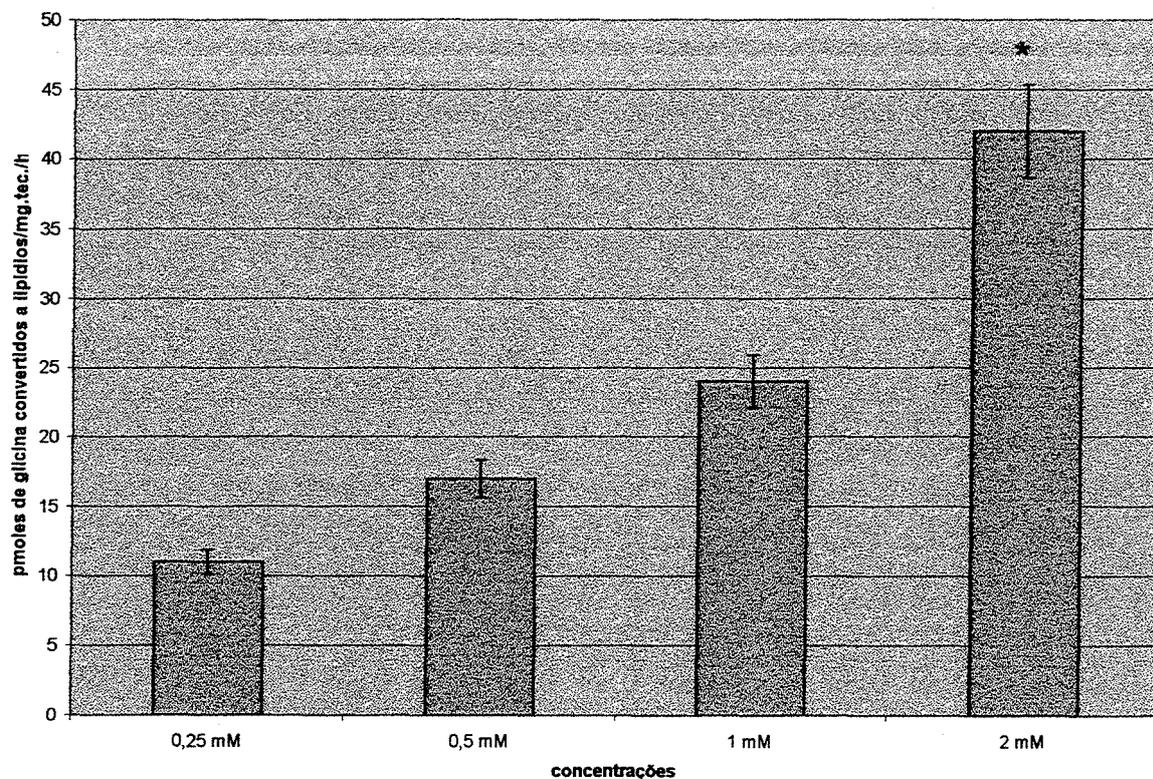


Fig.IV.9. Curva de concentração da Glicina oxidada a  $\text{CO}_2$ , em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n = 5 animais.

\*  $p < 0,01$  (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.



**Fig.IV.10.Curva de concentração da Glicina na conversão a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.**

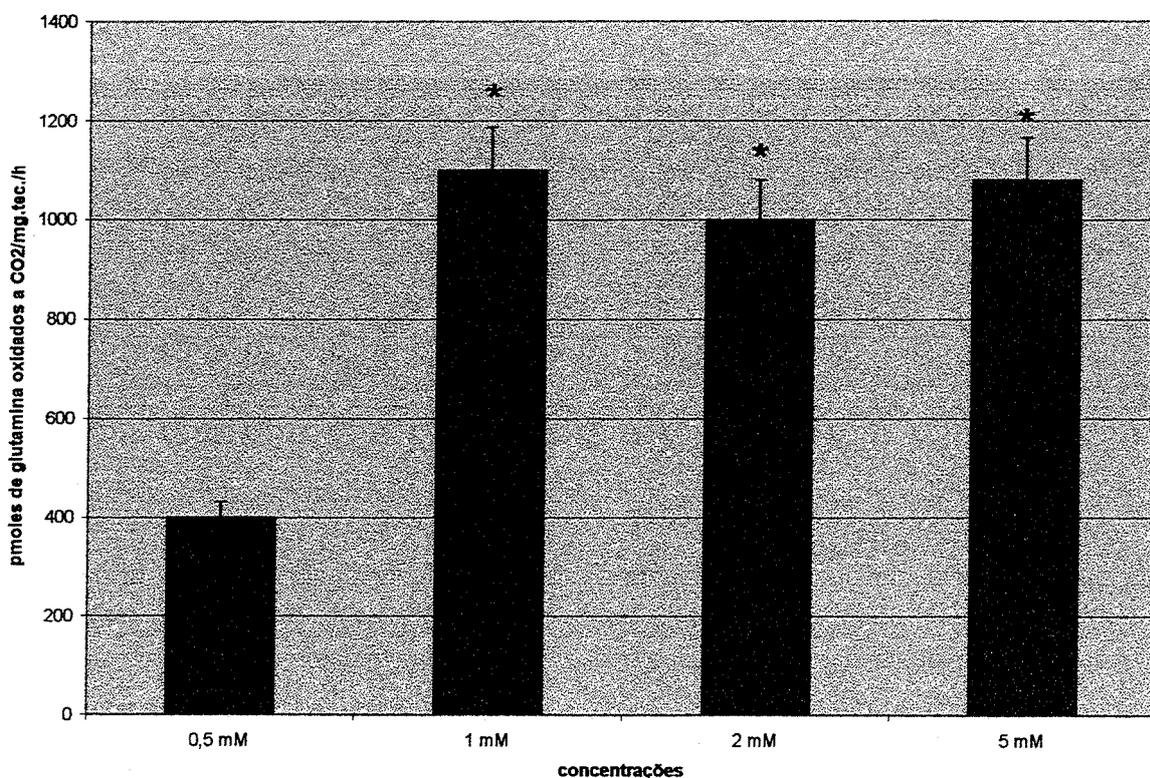
**Cada barra representa a média  $\pm$ EPM .**

**n = 5 animais.**

**\* p < 0,01 (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as demais concentrações.**

#### IV.1.6. Curvas de Concentração para a Glutamina

Foram realizadas Curvas de Concentração de Glutamina oxidada a CO<sub>2</sub> e Glutamina convertida a lipídios nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 5 mM. A concentração de 1 mM foi saturante para a oxidação da glutamina a CO<sub>2</sub>. A concentração de 2mM foi saturante para a conversão da glutamina a lipídios (Figuras IV.11 e IV.12).

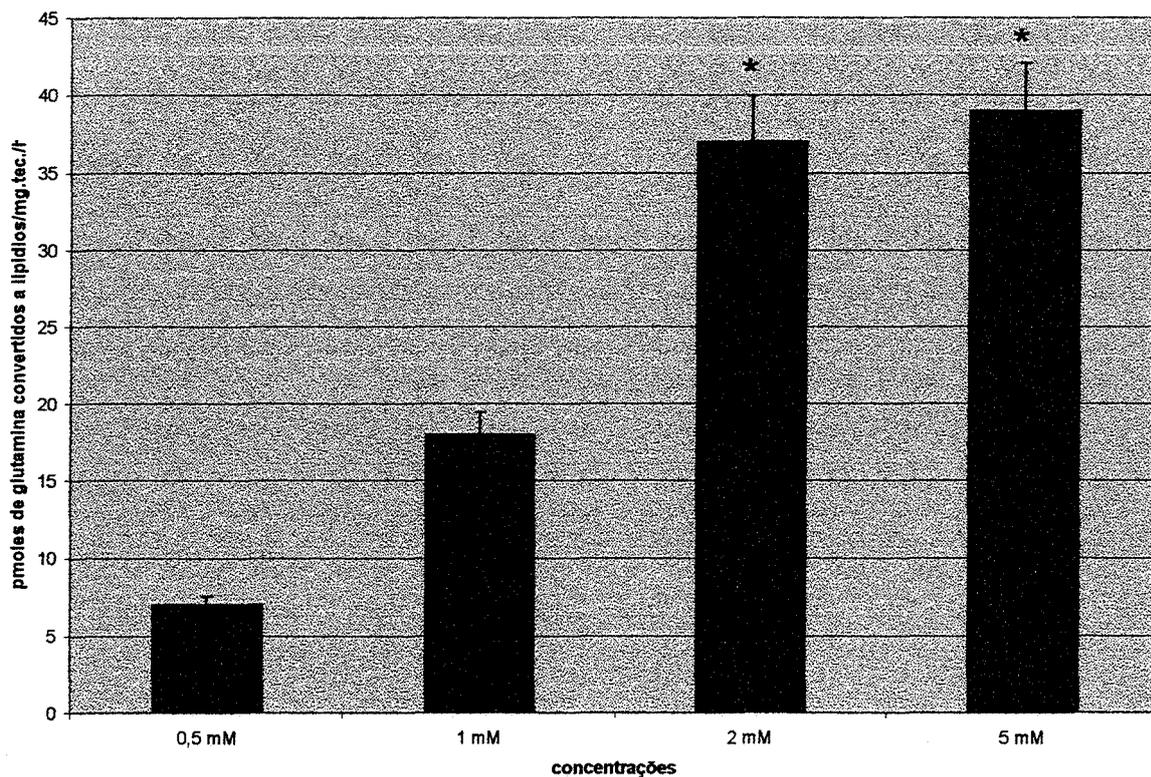


**Fig.IV.11. Curva de concentração de Glutamina oxidação a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.**

Cada barra representa a média ± EPM .

n = 5 animais.

\* p < 0,01 (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com a concentração de 0,5 mM.



**Fig.IV.12. Curva de concentração de Glutamina para conversão a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.**

**Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.**

**n = 5 animais.**

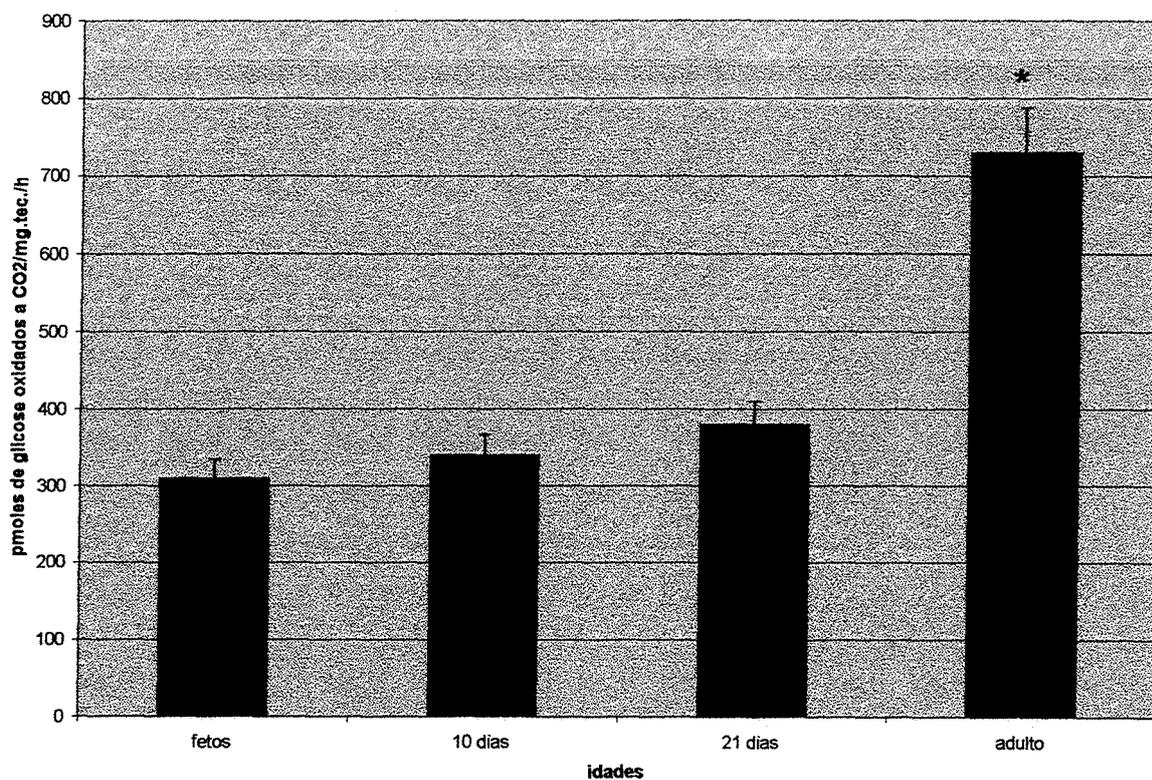
**\* p < 0,01 (teste de múltipla amplitude de Duncan), em comparação com as concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM.**

## **IV.2. Metabolismo Ontogênico da Glicose, Lactato, $\beta$ -OH-Butirato, Glicerol, Glicina e Glutamina**

Foram realizadas curvas de oxidação a  $\text{CO}_2$  e de conversão a lipídios, nas idades fetal (21 dias de gestação), 10 dias, 21 dias e adulto para todos os substratos utilizados: glicose, lactato,  $\beta$ -OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.

### **III.2.1. Metabolismo da glicose em relação a idade dos animais**

Os resultados da oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  nas diferentes idades mostraram que não ocorrem alterações na oxidação da glicose até os 21 dias de vida pós-natal e que na idade adulta houve um aumento significativo da velocidade de oxidação a  $\text{CO}_2$  comparada as demais idades (  $p < 0,01$  em relação aos fetos – teste de múltipla amplitude de Duncan ); a síntese de lipídios a partir da glicose apresentou aumento significativo na idade adulta em relação as demais idades ( $p < 0,01$  – teste de múltipla amplitude de Duncan), (Figuras IV.13 e IV.14).



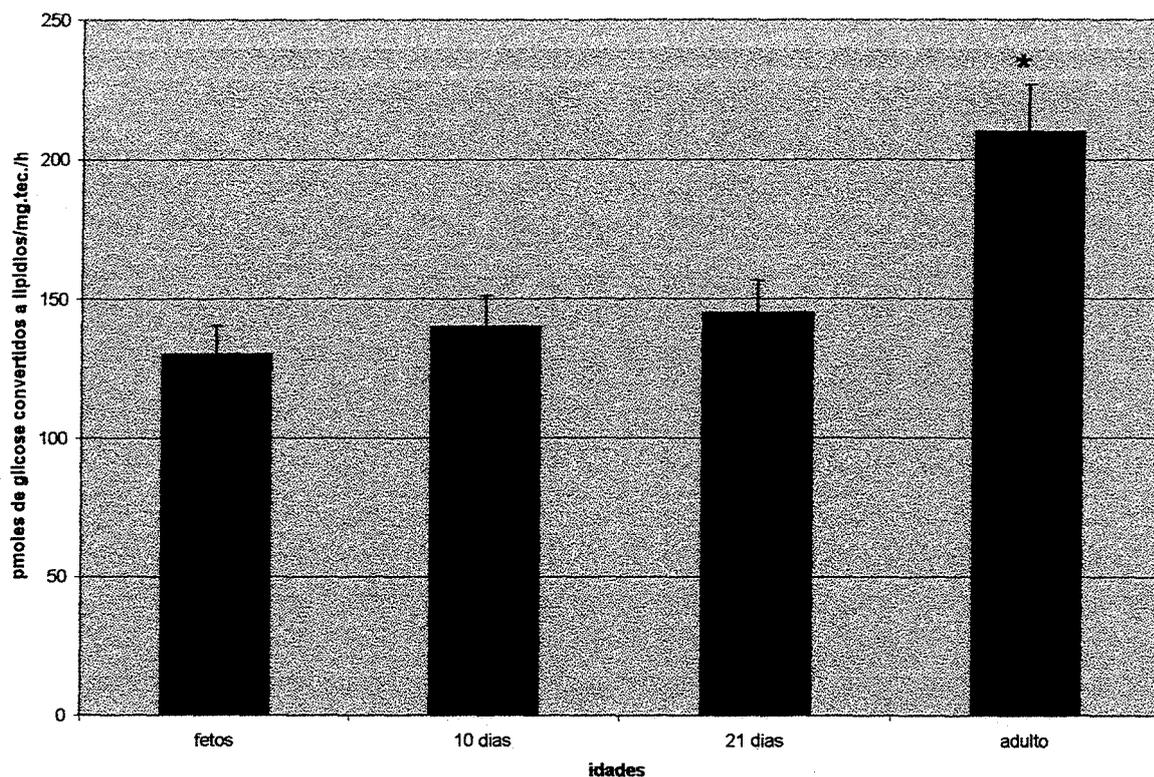
**Fig.IV.13.** Oxidação da Glicose 5 mM a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos em diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\*p < 0,01 a idade adulta difere das demais idades.



**Fig.IV.14.** Glicose 5 mM convertida a lipídios, em fatias de cerebello de ratos em diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

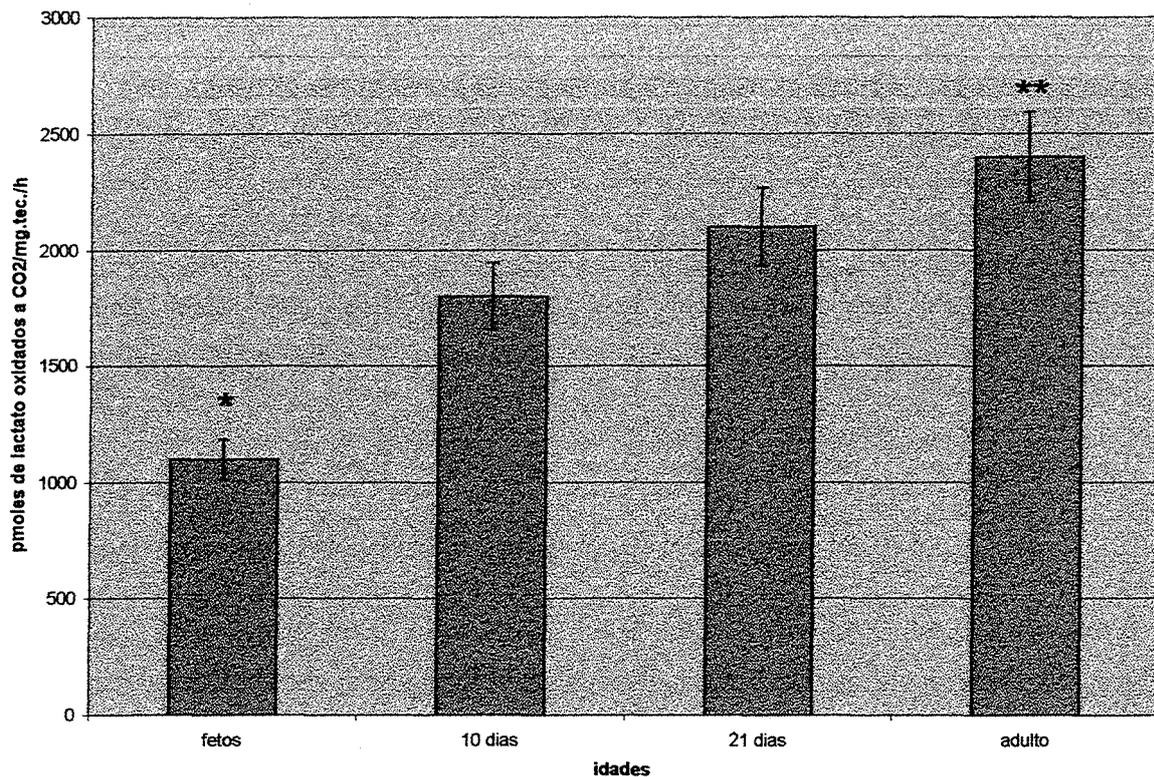
n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de Duncan.

\*p < 0,01 a idade adulta difere das demais idades .

#### **IV.2.2. Metabolismo do Lactato em relação à idade dos animais**

A oxidação do lactato a  $\text{CO}_2$  aumentou com a idade dos animais. Aos 10 dias, a oxidação do lactato a  $\text{CO}_2$  aumentou significativamente comparada à idade fetal ( $p < 0,01$ , Teste Duncan), aumento que prosseguiu até a idade adulta; o lactato convertido a lipídios mostrou um decréscimo de valores a partir dos 10 dias de idade em relação ao período fetal ( $p < 0,01$ , teste de Duncan) (Figuras IV.15 e IV.16).



**Fig.IV.15.** Oxidação do Lactato 10 mM a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos em diferentes idades.

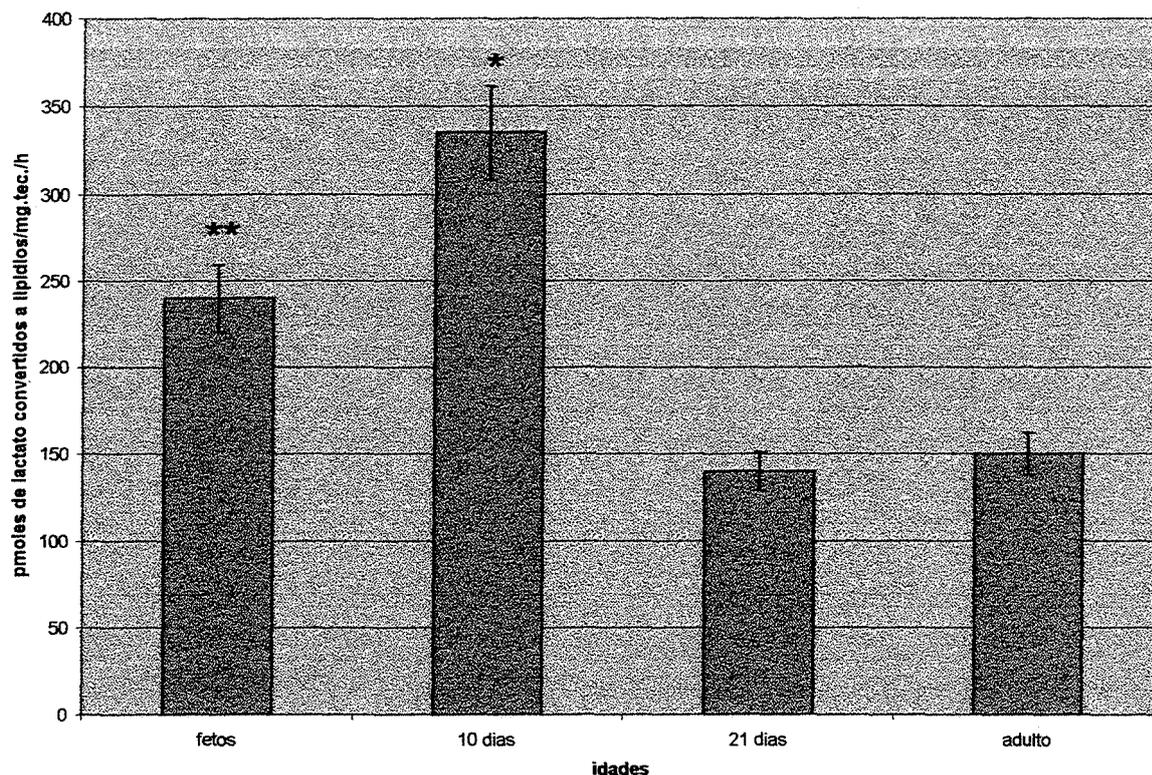
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\*p < 0,01 a idade fetal difere das demais idades.

\*\*p < 0,01 a idade adulta difere da idade de 10 dias.



**Fig.IV.16.** Lactato 10 mM convertido a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n = 5 animais.

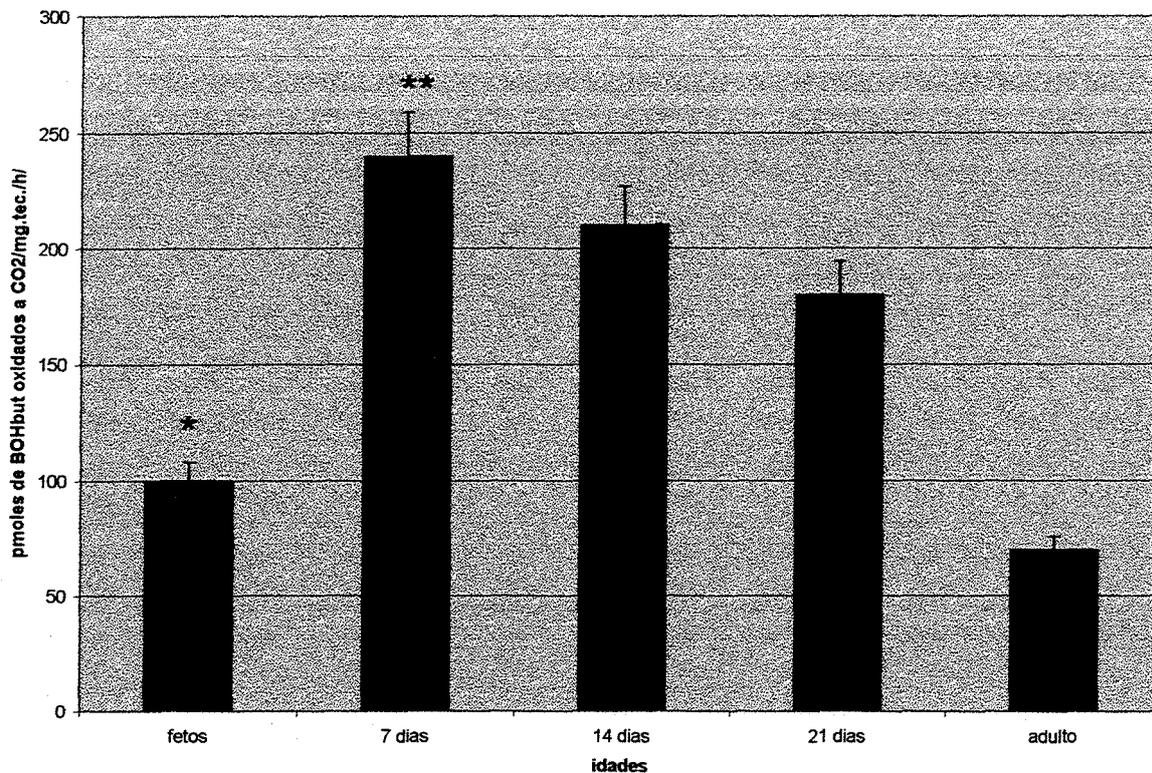
As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a idade de 10 dias difere das idades de 21 dias e adulto.

\*\* $p < 0,01$  a idade fetal difere das demais idades.

### **IV.2.3. Metabolismo do $\beta$ OH-Butirato em relação à idade dos animais**

Os resultados da oxidação do  $\beta$ OH-Butirato a  $\text{CO}_2$  mostraram um aumento significativo nas idades de 7, 14 e 21 dias comparadas à idade fetal ( $p < 0,01$ , teste de Duncan); na idade adulta houve um decréscimo significativo na oxidação do  $\beta$ OH-Butirato a  $\text{CO}_2$  em relação às idades de 7 dias, 14 dias e 21 dias ( $p < 0,01$ , teste de Duncan). A conversão do  $\beta$ OH-Butirato a lipídios apresentou na idade adulta um aumento na conversão do  $\beta$ OH-Butirato a lipídios em relação às demais idades ( $p < 0,01$ ) ( Figuras IV.17 e IV.18 ).



**Fig.IV.17.**  $\beta$ OH-Butirato 2 mM oxidado a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos em diferentes idades.

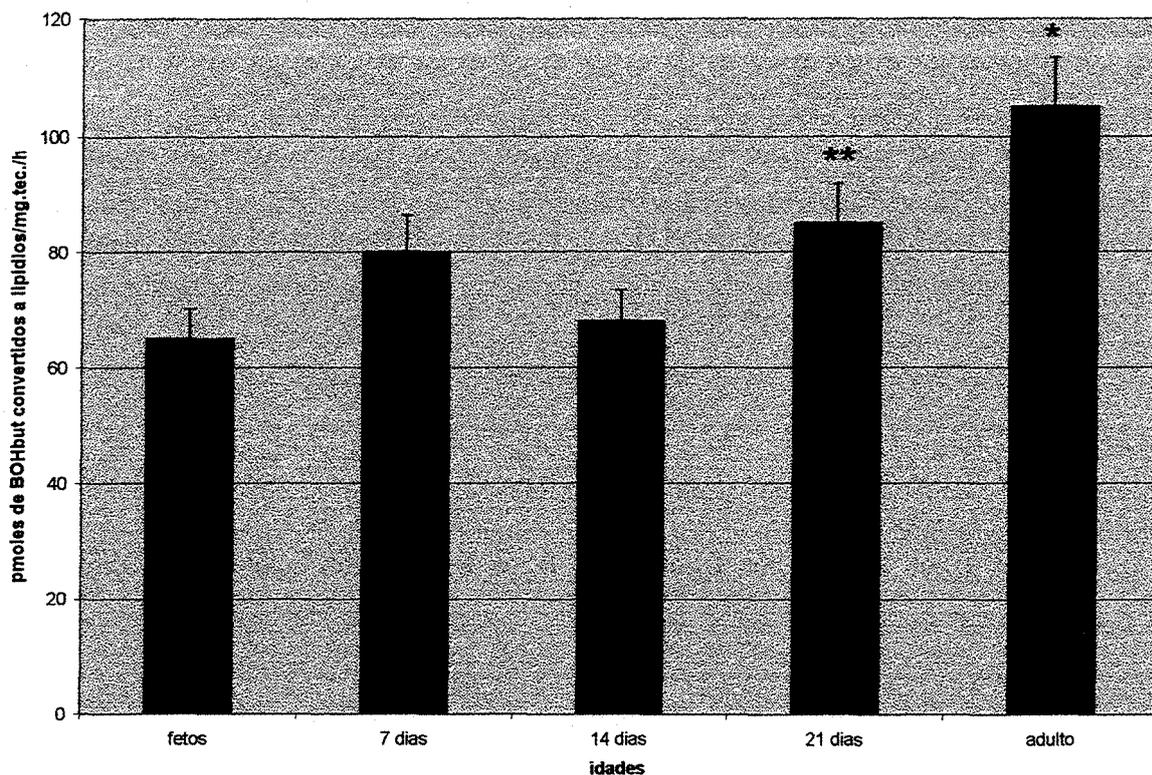
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\*p<0,01 a idade fetal difere das demais idades.

\*\*p<0,01 a idade de 7 dias difere da idade fetal, de 21 dias e da idade adulta.



**Fig.IV.18.** Síntese de lípidios a partir do  $\beta$ OH-Butirato 2 mM em fatias de cerebelo de ratos em diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n = 5 animais.

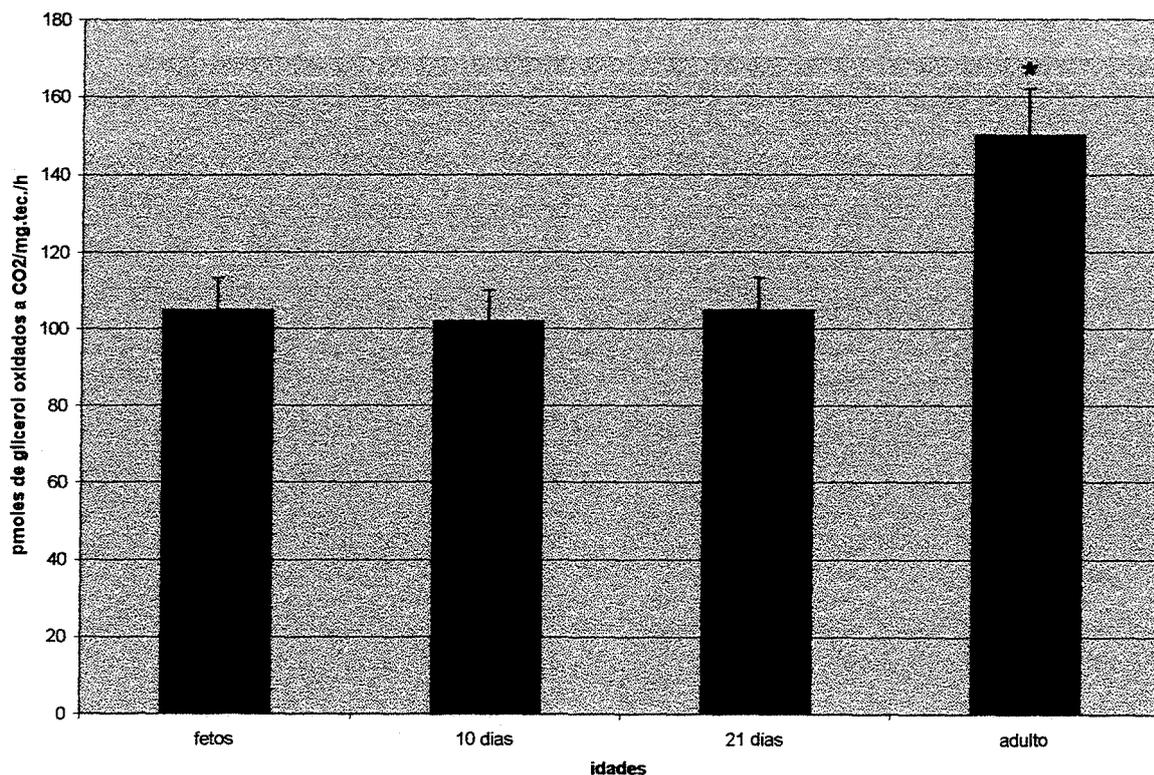
As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a idade adulta difere das demais idades.

\*\* $p < 0,01$  a idade de 21 dias difere da idade fetal e da idade de 14 dias.

#### IV.2.4. Metabolismo do glicerol em relação à idade dos animais

Os resultados do glicerol oxidado a  $\text{CO}_2$  mostraram um aumento na idade adulta em relação às idades fetal, 10 dias e 21 dias ( $p < 0,01$ , teste de Duncan). A conversão do glicerol a lipídios aumentou na idade adulta em relação às idades fetal, 10 dias e 21 dias (Figuras IV.19 e IV.20).



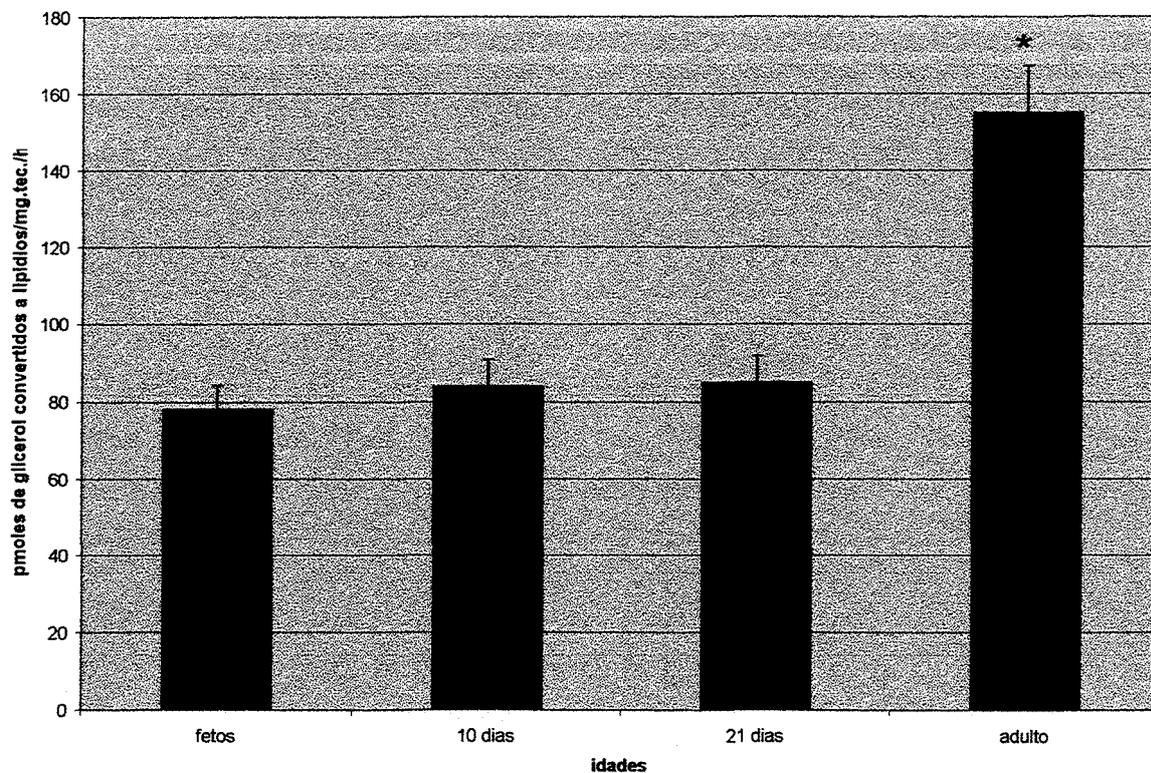
**Fig.IV.19.** Glicerol 1 mM oxidado a  $\text{CO}_2$ , em fatias de cerebelo de ratos em diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a idade adulta difere em relação às demais idades.



**Fig.IV.20.** Glicerol 1mM convertido a lipídios em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM .

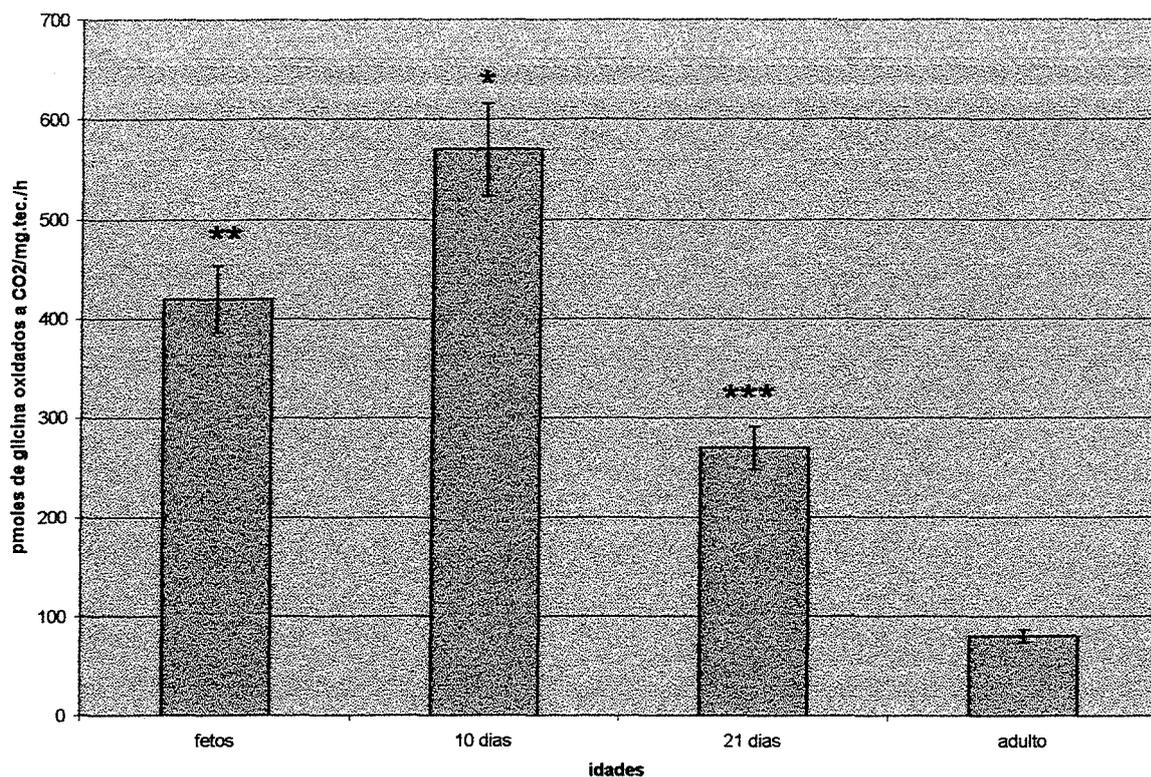
n = 5 animais.

As médias foram calculadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a idade adulta difere das demais idades.

#### **IV.2.5. Metabolismo da Glicina em relação a idade dos animais**

Os resultados da oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$  mostraram valores superiores na idade de 10 dias comparados aos valores da idade fetal. Após a idade de 10 dias a oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$  diminuiu significativamente com o aumento da idade dos animais ( $p < 0,01$ ). A conversão da glicina a lipídios apresentou um decréscimo da idade fetal até a idade adulta ( $p < 0,01$ , teste de Duncan) ( Figuras IV.21 e IV.22).



**Fig.IV.21** Glicina 0,5 mM oxidada a CO<sub>2</sub> em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM .

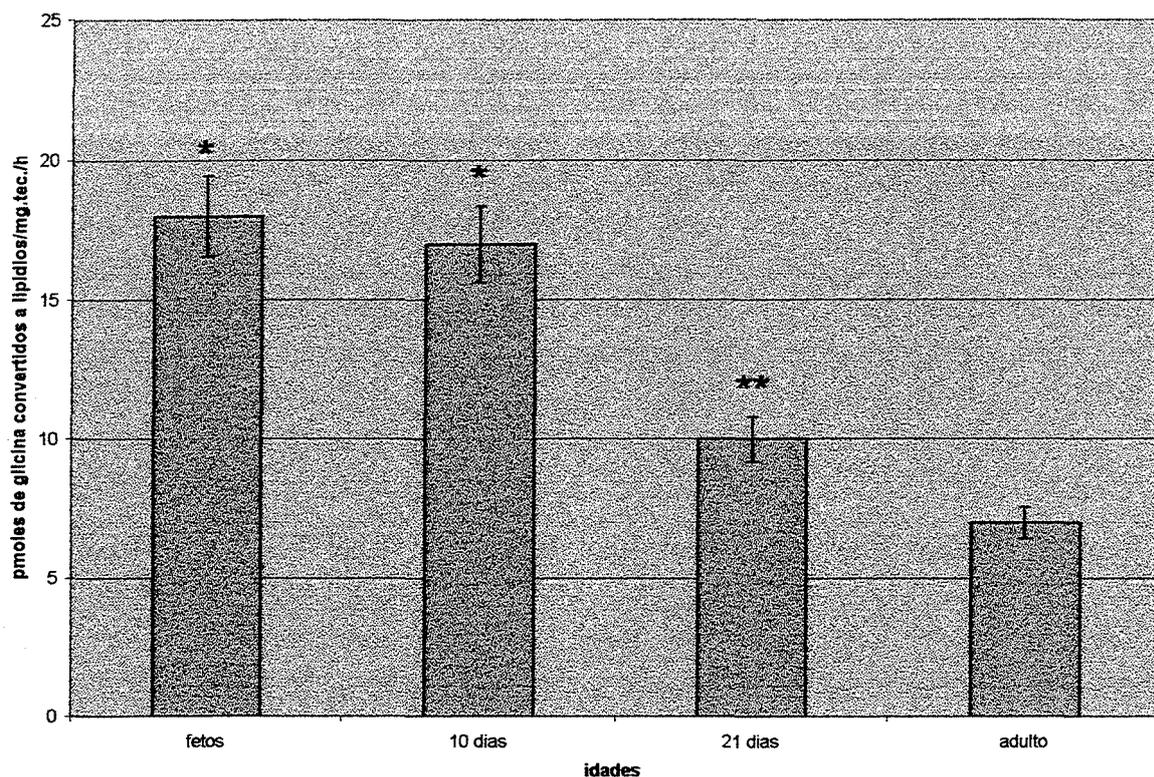
n = 5 animais.

As médias foram calculadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a idade de 10 dias difere das demais idades.

\*\* $p < 0,01$  a idade fetal difere da idades de 21 dias e adulta.

\*\*\* $p < 0,01$  a idade de 21 dias difere da idade adulta.



**Fig.IV.22.** Glicina 0,5 mM convertida a lipídios em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM .

n = 5 animais.

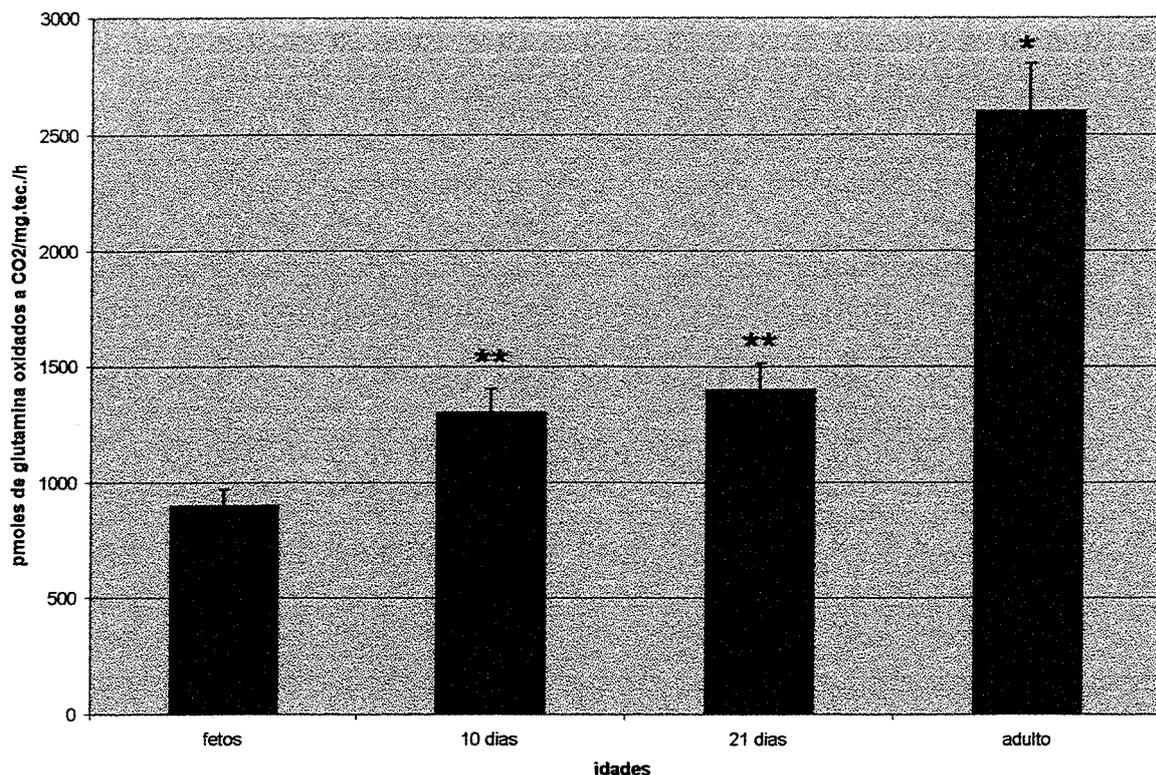
As médias foram calculadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  idade fetal e a idade de 10 dias difere das idades de 21 dias e da idade adulta.

\*\* $p < 0,01$  a idade de 21 dias difere da idade adulta.

#### **IV.2.6. Metabolismo da Glutamina em relação à idade dos animais**

Os resultados da oxidação da glutamina a  $\text{CO}_2$  mostraram um aumento significativo na idade adulta em comparação as demais idades ( $p < 0,01$ , teste de Duncan). A conversão da glutamina a lipídios mostrou um decréscimo significativo na idade fetal para a idade de 10 dias, e desta para as demais idades ( $p < 0,01$ -teste de Duncan)(Figuras IV.23 e IV.24).



**Fig.IV.23.** Glutamina 2mM oxidada a CO<sub>2</sub> em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.

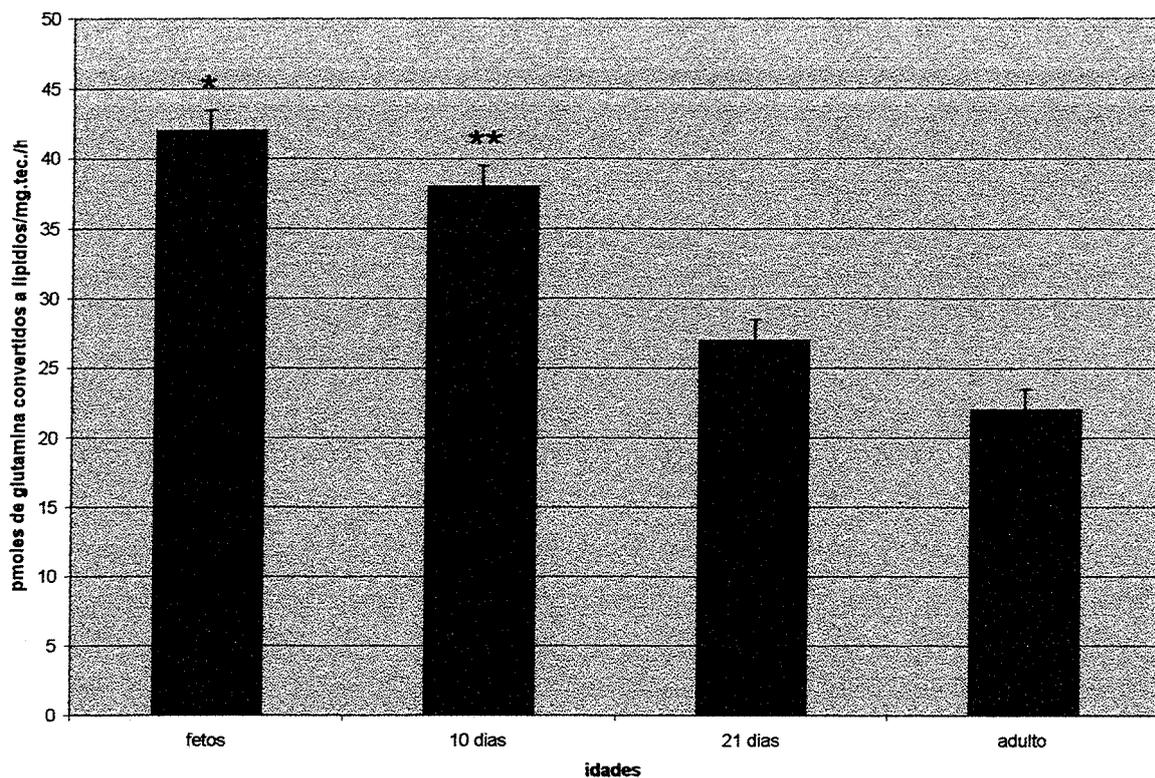
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\*p < 0,01 a idade adulta difere das demais idades.

\*\*p < 0,01 as idades de 10 dias e de 21 dias diferem da idade fetal.



**Fig.IV.24.** Glutamina 2 mM convertida a lipídios em fatias de cerebelo de ratos de diferentes idades.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM .

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a idade fetal difere das demais idades.

\*\* $p < 0,01$  a idade de 10 dias difere das idades de 21 dias e adulta.

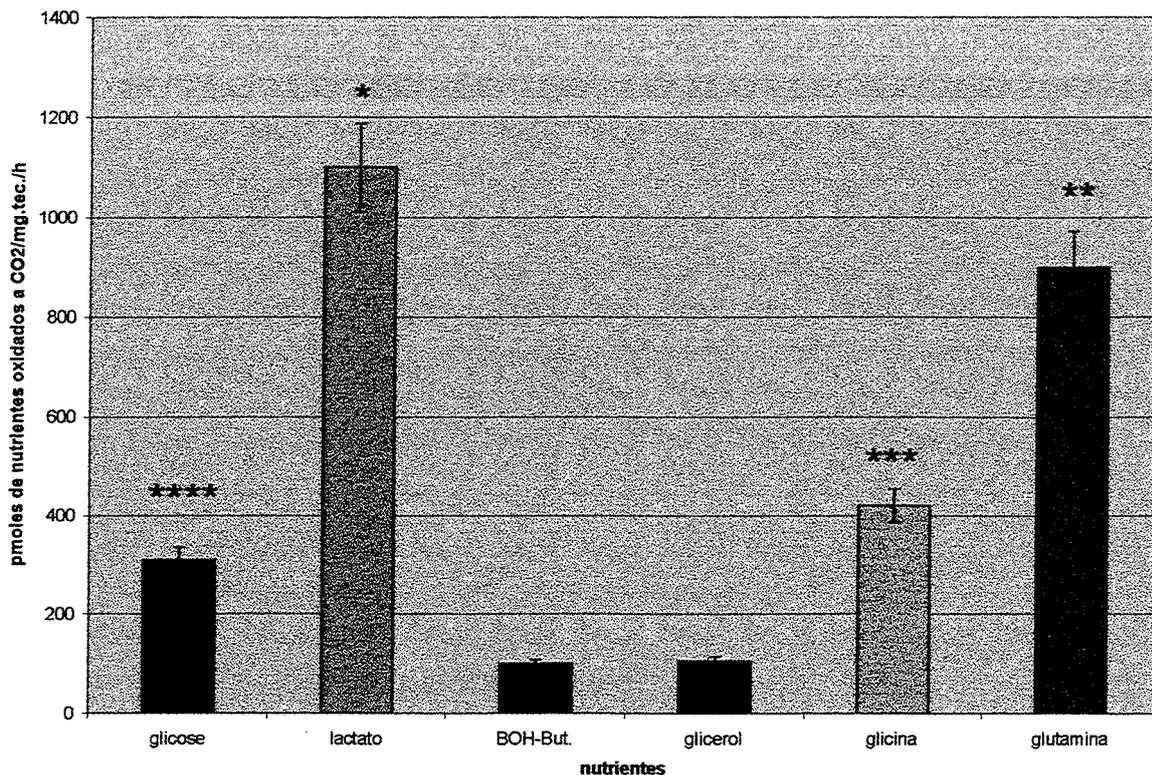
### **IV.3. Perfil Ontogênico Comparativo da Utilização de Nutrientes Energéticos por Fatias de Cerebelo**

Determinamos a oxidação a  $\text{CO}_2$  e conversão a lipídios, comparativas, para cada idade (fetal, 10 dias, 21 dias e adulta) com os substratos energéticos: glicose (5mM), lactato (10 mM), glicerol (1mM), glicina (5 mM) e glutamina (2mM).

#### **III.3.1. Idade Fetal**

Como idade fetal consideramos ratos com aproximadamente 21 dias de gestação.

Os resultados na idade fetal dos nutrientes energéticos oxidados a  $\text{CO}_2$  mostraram um aproveitamento oxidativo significativamente maior do lactato em relação aos demais nutrientes ( $p < 0,01$ ). A oxidação a  $\text{CO}_2$  da Glicose foi significativamente maior em relação ao  $\beta\text{OH}$ -Butirato e ao glicerol ( $p < 0,01$ ). A oxidação a  $\text{CO}_2$  da glicina mostrou níveis significativamente maiores em comparação com  $\beta\text{OH}$ -Butirato e ao glicose. A glutamina apresentou uma oxidação significativamente maior em relação à glicina ( Fig.IV.25).



**Fig.IV.25.** Utilização de nutrientes energéticos na idade fetal: oxidação a CO<sub>2</sub> de glicose 5 mM, lactato 10 mM, βOH-Butirato 2mM, glicerol 1 mM, glicina 0,5 mM e glutamina 2 mM.

Cada barra representa a média ± EPM .

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

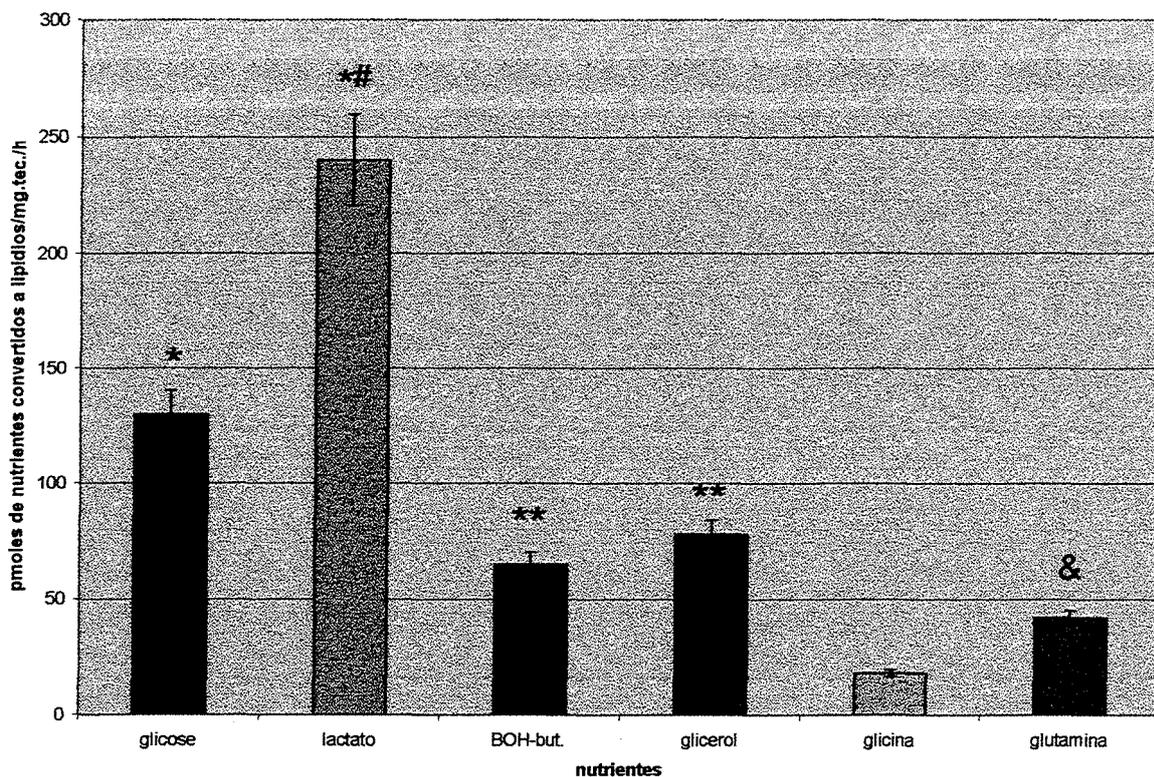
\*p< 0,01 o lactato difere em relação demais nutrientes.

\*\*p<0,01 a glutamina difere em relação a glicina, ao βOH-Butirato, glicerol e glicose.

\*\*\*p<0,01 a glicina difere em relação ao βOH-Butirato, ao glicerol e glicose.

\*\*\*\*p<0,01 a glicose difere em relação ao βOH-butirato e glicerol.

A conversão a lipídios a partir da glicose e lactato na idade fetal apresentaram valores significativamente superiores em relação aos demais nutrientes ( $p < 0,01$ ); a síntese de lipídios a partir do lactato foi significativamente superior a síntese de lipídios a partir da glicose; a síntese de lipídios a partir do glicerol e  $\beta$ OH-Butirato apresentou diferença significativa maior em relação à glicina e glutamina ( $p < 0,01$ ); (Fig.IV.26).



**Fig.IV.26.** Utilização de nutrientes energéticos na idade fetal: conversão a lipídios a partir de glicose 5 mM, lactato 10 mM,  $\beta$ OH-Butirato 2 mM, glicerol 1 mM, glicina 0,5 mM e glutamina 2 mM.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a glicose e lactato diferem em relação aos demais nutrientes.

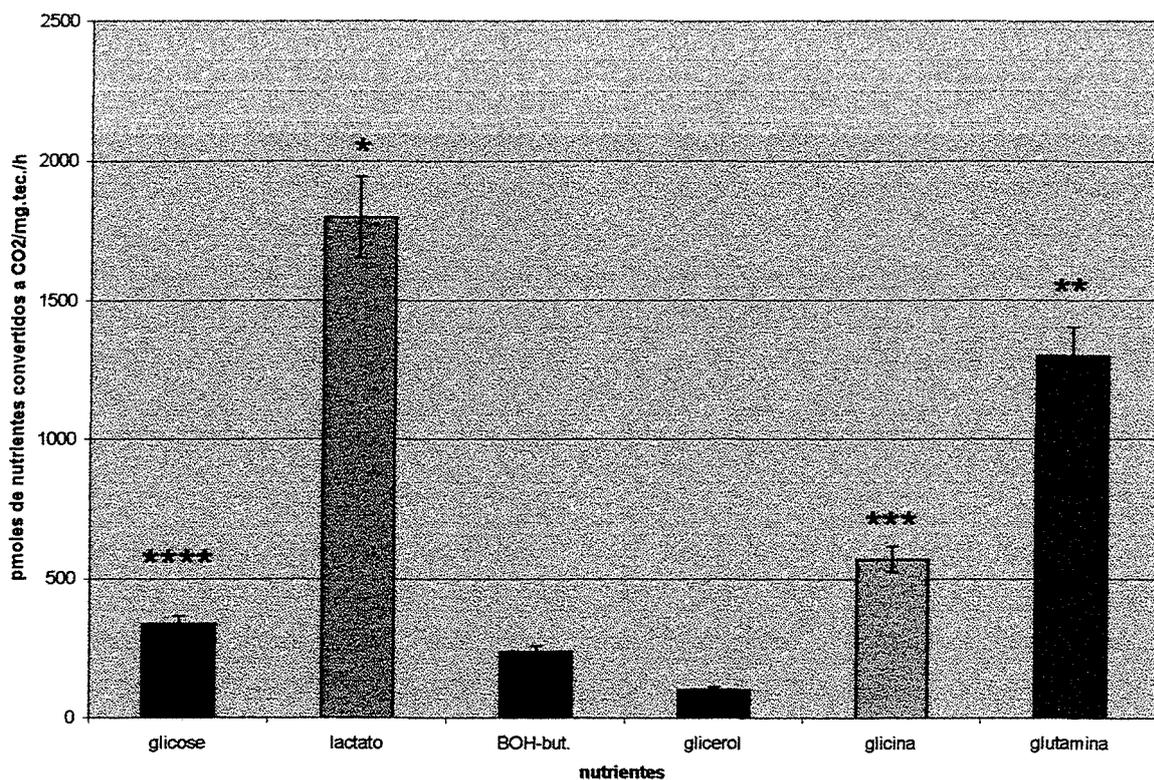
\*\* $p < 0,01$  o glicerol e o  $\beta$ OH-Butirato diferem em relação a glicina e glutamina .

#  $p < 0,01$  o lactato difere em relação a glicose.

&  $p < 0,01$  a glutamina difere em relação a glicina.

### IV.3.2. Idade de 10 Dias

Os resultados na idade de 10 dias dos nutrientes energéticos oxidados a  $\text{CO}_2$  mostraram um aproveitamento oxidativo significativamente maior do lactato em relação aos outros nutrientes ( $p < 0,01$ ). A oxidação a  $\text{CO}_2$  da glicose foi significativamente maior em relação ao glicerol ( $p < 0,01$ ). A oxidação a  $\text{CO}_2$  da glicina mostrou níveis significativamente maiores em comparação com o  $\beta\text{OH}$ -Butirato e glicose. A glutamina apresentou uma oxidação significativamente maior em relação à glicina, ao  $\beta\text{OH}$ -Butirato, glicerol e glicose ( $p < 0,01$ );(Fig.IV.27).



**Fig.IV.27.** Utilização de nutrientes energéticos na Idade de 10 dias: oxidação a CO<sub>2</sub> de glicose 5 mM, lactato 10 mM, βOH-Butirato 2 mM, glicerol 1 mM, glicina 0,5 mM e glutamina 2 mM.

Cada barra representa a média ±EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

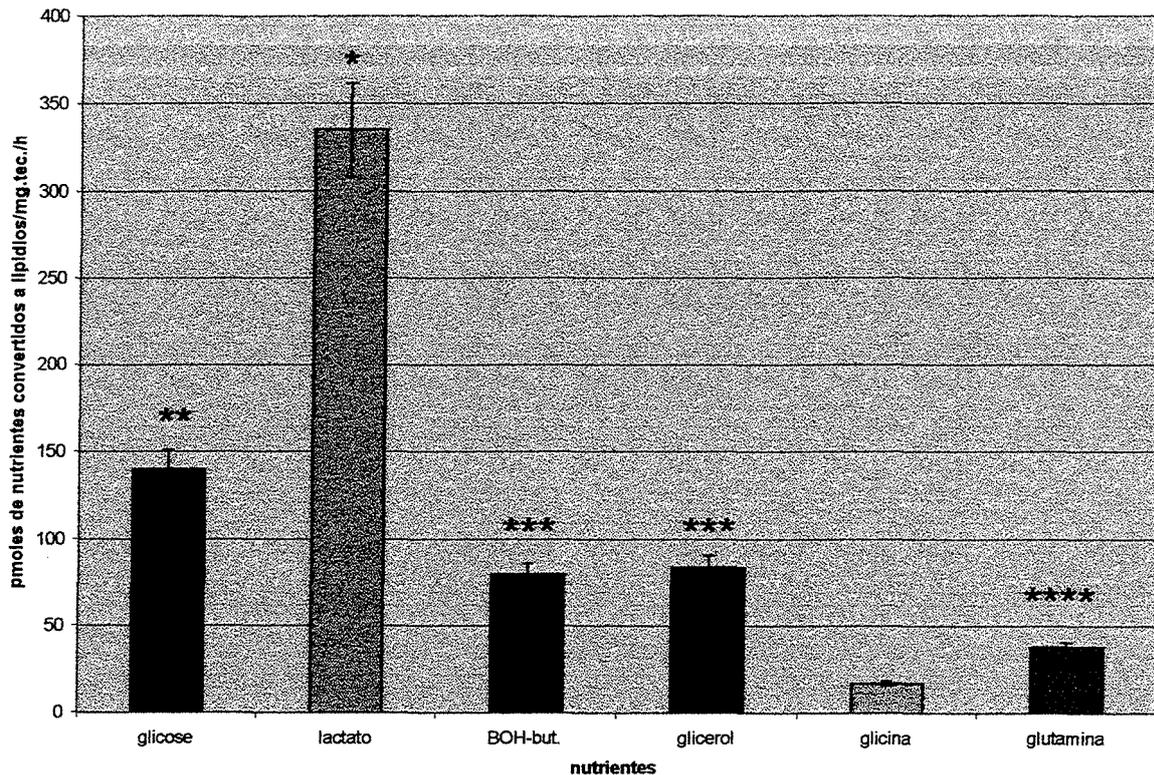
\*p < 0,01 o lactato difere em relação aos demais nutrientes.

\*\*p < 0,01 a glutamina difere em relação ao βOH-Butirato, glicerol, glicina e glicose.

\*\*\*p < 0,01 a glicina difere em relação ao βOHButirato, ao glicerol e glicose.

\*\*\*\*p < 0,01 a glicose difere do βOH-Butirato e do glicerol.

A conversão a lipídios a partir do lactato na idade de 10 dias foi significativamente maior em relação aos demais nutrientes ( $p < 0,01$ ); a conversão a lipídios a partir da glicose foi significativamente maior em relação ao  $\beta$ OH-Butirato, à glicina, ao glicerol e à glutamina ( $p < 0,01$ ); a conversão a lipídios a partir do  $\beta$ OH-Butirato e glicerol foi significativamente maior em relação a glicina e glutamina ( $p < 0,01$ ); a síntese de lipídios a partir da glicina foi inferior a síntese de lipídios a partir da glutamina ( $p < 0,01$ )(Fig IV.28).



**Fig.IV.28.** Utilização de nutrientes energéticos na idade de 10 dias: conversão a lipídios a partir de glicose 5 mM, lactato 10 mM,  $\beta$ OH-Butirato 2 mM, glicerol 1mM, glicina 0,5 mM e glutamina 2 mM.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  o lactato difere em relação aos demais nutrientes.

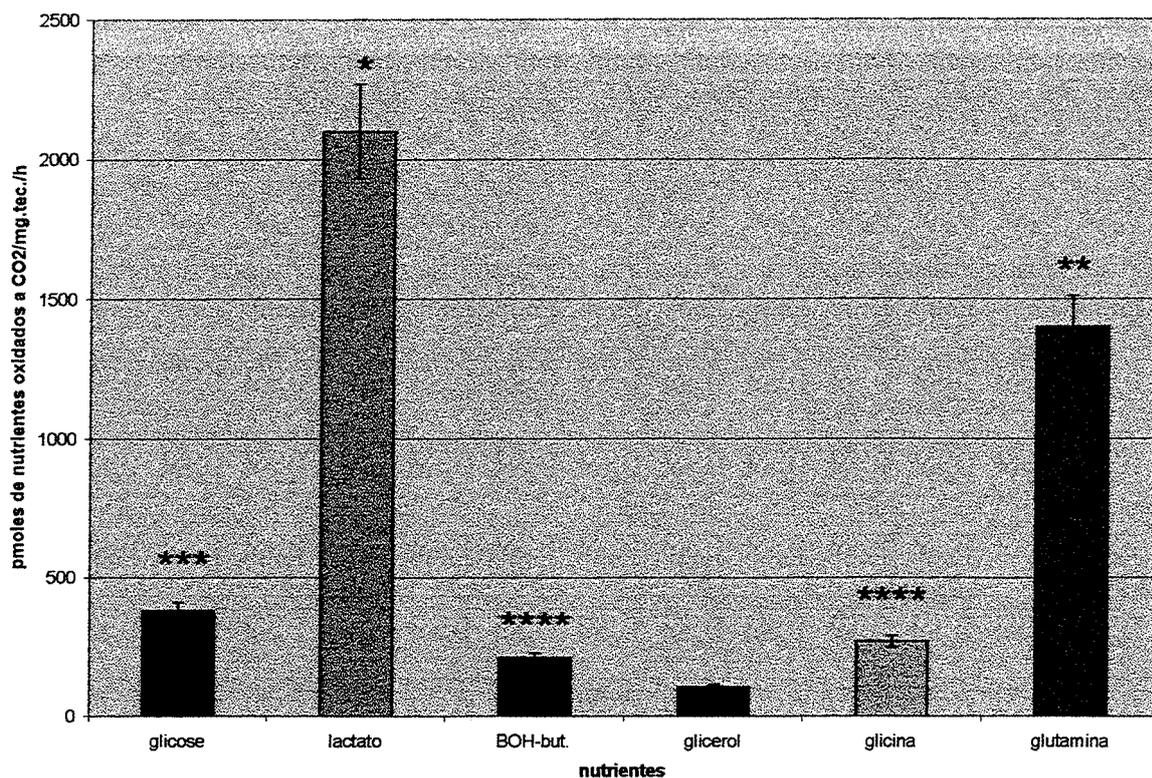
\*\* $p < 0,01$  a glicose difere em relação aos demais nutrientes  $\beta$ OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina.

\*\*\* $p < 0,01$  o  $\beta$ OH-Butirato e glicerol diferem em relação aos nutrientes glicina e glutamina.

\*\*\*\* $p < 0,01$  a glutamina difere da glicina.

### IV.3.3. Idade de 21 dias:

O resultado na idade de 21 dias dos nutrientes oxidados a  $\text{CO}_2$  mostraram uma oxidação maior do lactato em relação aos demais nutrientes ( $p < 0,01$ ); a oxidação a  $\text{CO}_2$  da glutamina foi maior em relação às velocidades de oxidação da glicose,  $\beta\text{OH-Butirato}$ , glicerol e glicina ( $p < 0,01$ ); a oxidação a  $\text{CO}_2$  da glicose foi maior em relação às velocidades de oxidação do  $\beta\text{OH-Butirato}$ , glicerol e glicina ( $p < 0,01$ ) (Fig.IV.29)



**Fig.IV.29.** Utilização de nutrientes energéticos na Idade de 21 dias: oxidação a CO<sub>2</sub> de glicose 5 mM, lactato 10 mM, βOH-Butirato 2 mM, glicerol 1 mM, glicina 0,5 mM e glutamina 2 mM.

Cada barra representa a média ±EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

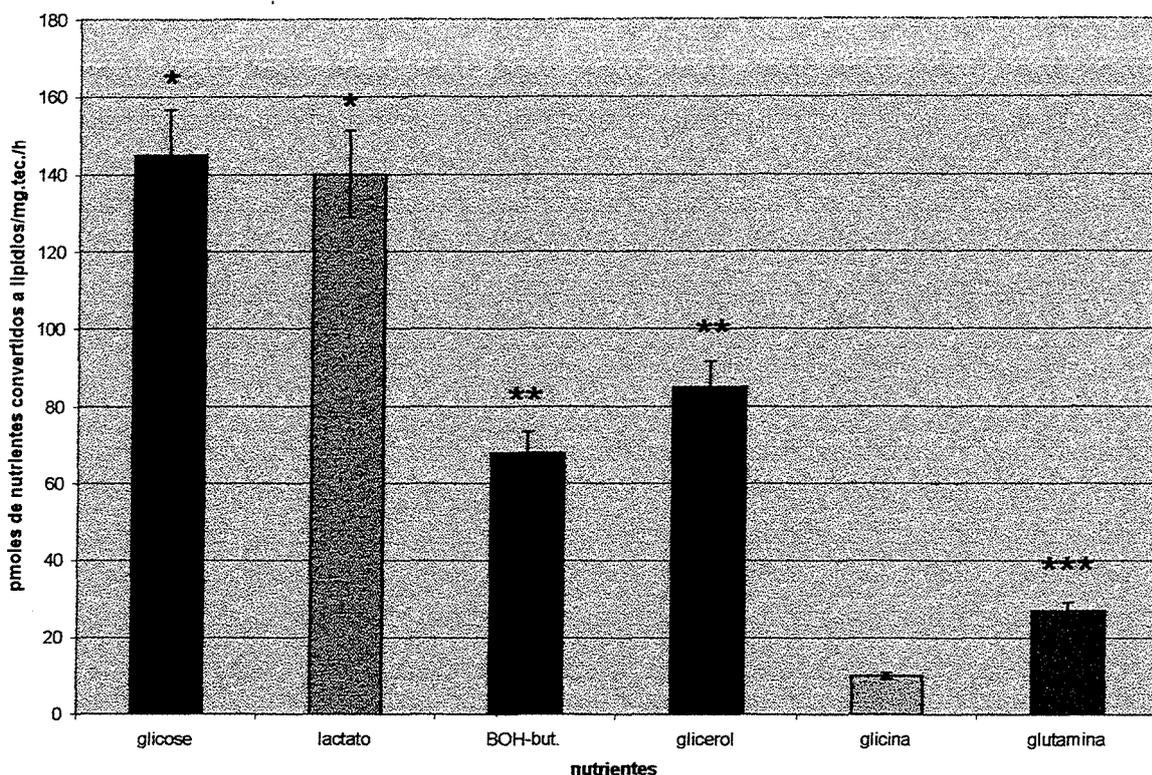
\*p < 0,01 o lactato difere em relação aos demais nutrientes.

\*\*p < 0,01 a glutamina difere em relação à glicose, ao βOH-Butirato, ao glicerol e à glicina (p < 0,01).

\*\*\*p < 0,01 a glicose difere em relação ao βOH-Butirato, ao glicerol e à glicina.

\*\*\*\*p < 0,01 a glicina e o βOH-Butirato diferem do glicerol.

A conversão a lipídios a partir da glicose e lactato foram maiores em relação aos demais nutrientes ( $p < 0,01$ ); a conversão a lipídios a partir do glicerol e  $\beta$ OH-Butirato foi maior em relação à conversão a lipídios a partir da glicina e da glutamina ( $p < 0,01$ ); a síntese de lipídios a partir da glutamina foi significativamente superior em relação a conversão de lipídios a partir da glicina ( $p < 0,01$ ) (Fig.IV.30).



**Fig.IV.30.** Utilização de nutrientes energéticos na idade de 21 dias: conversão a lipídios a partir da glicose 5 mM, lactato 10 mM,  $\beta$ OH-Butirato 2 mM, glicerol 1 mM, glicina 0,5 mM e glutamina 2 mM.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM .

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a glicose e o lactato diferem dos demais nutrientes .

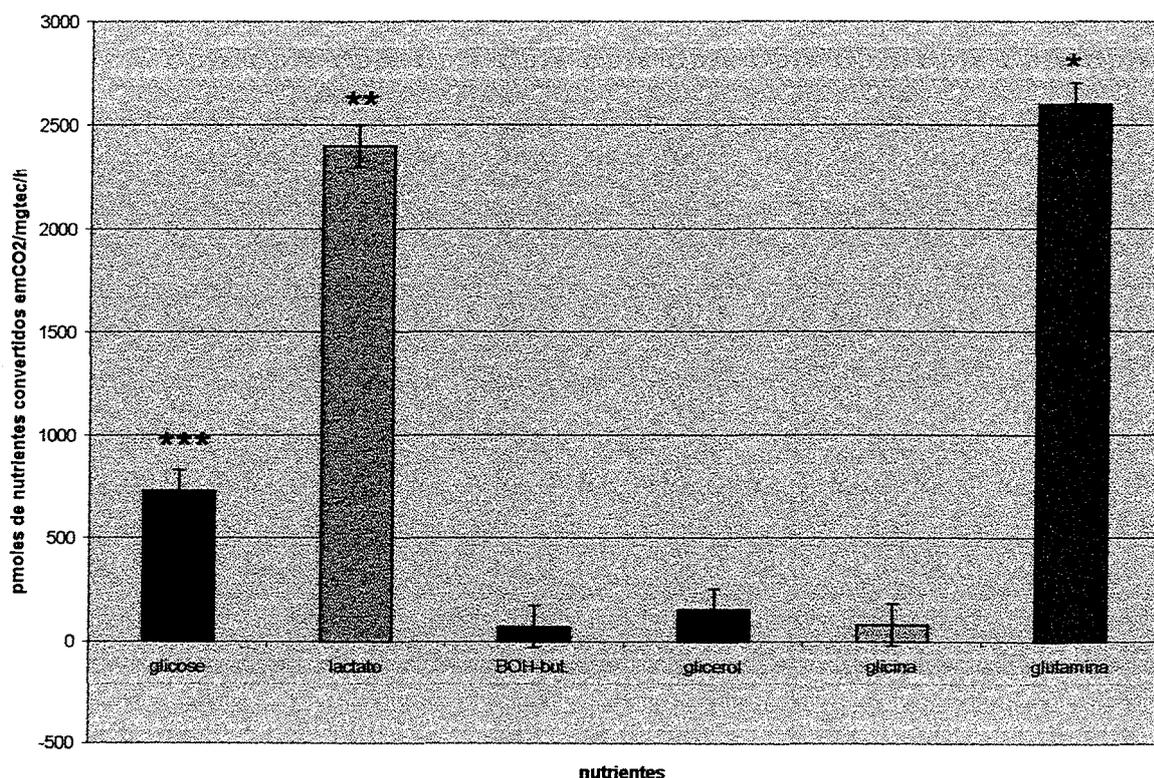
\*\* $p < 0,01$  o glicerol e o  $\beta$ OH-Butirato diferem em relação à glutamina e a glicina.

\*\*\* $p < 0,01$  a glutamina difere em relação a glicina.

#### **IV.3.4. Idade adulta**

Consideramos ratos com idade adulta, ratos em torno de 90 dias de vida pós-natal.

O resultado na idade adulta dos nutrientes oxidados a  $\text{CO}_2$  mostraram uma oxidação maior da glutamina em relação aos demais nutrientes ( $p < 0,01$ ); a oxidação do lactato a  $\text{CO}_2$  foi maior em relação à oxidação da glicose, do glicerol, do  $\beta\text{OH}$ -Butirato e da glicina ( $p < 0,01$ ); a oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  foi maior em relação à oxidação do  $\beta\text{OH}$ -Butirato, glicerol e da glicina ( $p < 0,01$ ); (Fig. IV.31).



**Fig.IV.31.** Utilização de nutrientes energéticos na Idade adulta: oxidação a CO<sub>2</sub> de glicose 5 mM, lactato 10 mM, βOH-Butirato 2 mM, glicerol 1 mM, glicina 0,5 mM e glutamina 2 mM.

Cada barra representa a média ±EPM.

n = 5 animais.

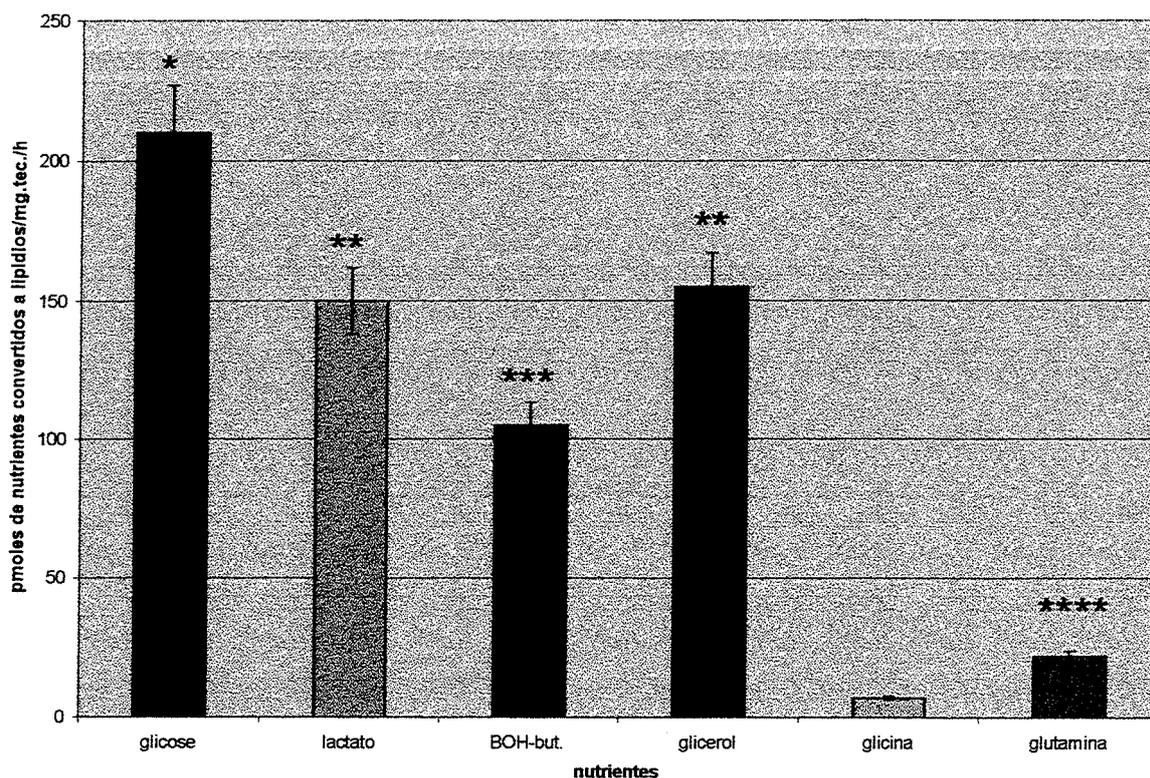
As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\*p < 0,01 a glutamina difere em relação aos demais nutrientes.

\*\*p < 0,01 o lactato difere em relação à glicose, ao glicerol, ao βOH-Butirato e à glicina.

\*\*\*p < 0,01 a glicose difere em relação ao βOH-Butirato, glicerol e à glicina.

A conversão a lipídios a partir da glicose foi maior em relação aos demais nutrientes ( $p < 0,01$ ); a conversão de lipídios a partir do lactato e do glicerol foi significativamente superior ao  $\beta$ OH-Butirato, a glicina e a glutamina ( $p < 0,01$ ); a conversão a lipídios a partir da I e do  $\beta$ OH-Butirato diferiu em relação à conversão a lipídios a partir da glicina e da glutamina ( $p < 0,01$ ) (Fig.IV.32).



**Fig.IV.32.** Utilização de nutrientes energéticos na idade adulta: conversão a lipídios a partir de glicose 5 mM, lactato 10 mM,  $\beta$ OH-Butirato 2 mM, glicerol 1 mM, glicina 0,5 mM e glutamina 2 mM.

Cada barra representa a média  $\pm$ EPM .

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan.

\* $p < 0,01$  a glicose difere em relação aos demais nutrientes.

\*\* $p < 0,01$  o glicerol e o lactato diferem em relação à glicina e glutamina.

\*\*\* $p < 0,01$   $\beta$ OH-Butirato difere em relação a glicina e a glutamina.

\*\*\*\* $p < 0,01$  a glutamina difere em relação a glicina.

#### **IV.4. Competição de Nutrientes Energéticos:**

Com a finalidade de verificar a utilização da glicose (5,0 mM) na presença de lactato (10,0 mM) e a utilização de lactato na presença de glicose, realizamos um experimento que foi dividido em 4 grupos:

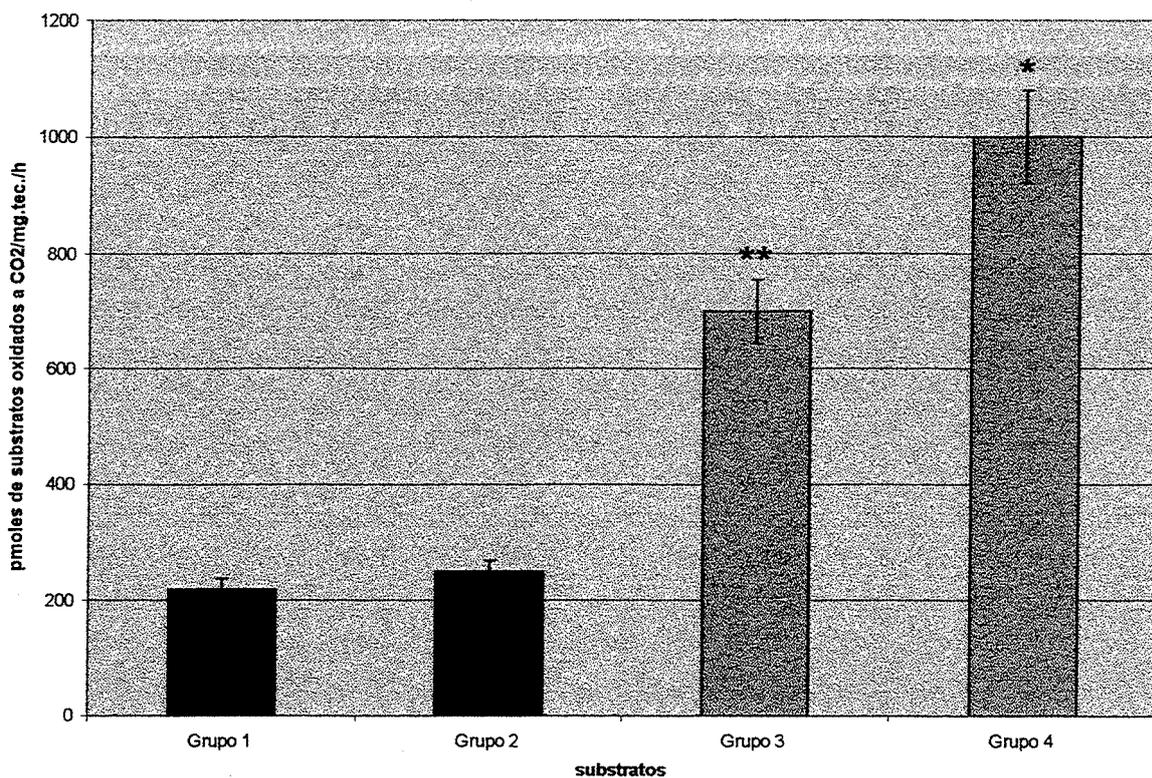
Grupo 1: Fatias de cerebelo foram incubadas em KRb com 5,0 mM de glicose e 0,2  $\mu$  Ci de [U-<sup>14</sup>C]Glicose; a oxidação a CO<sub>2</sub> e a conversão a lipídios a partir da glicose foram medidos.

Grupo 2: Fatias de cerebelo foram incubadas em Krebs Ringer bicarbonato com 5,0 mM de Glicose e 10,0 mM de Lactato e 0,2  $\mu$ Ci de [U-<sup>14</sup>C] Glicose; a oxidação a CO<sub>2</sub> e a conversão a lipídios a partir da glicose foram medidas .

Grupo 3: Fatias de cerebelo foram incubadas em KRb com 10,0 mM de lactato e 0,2  $\mu$ Ci de [U-<sup>14</sup>C] lactato; a oxidação a CO<sub>2</sub> e a conversão de lipídios a partir do lactato foram medidos.

Grupo 4: Fatias de cerebelo foram incubadas em KRb com 5,0 mM de Glicose e 10,0 mM de lactato e 0,2  $\mu$  Ci de [U-<sup>14</sup>C] lactato; a oxidação a CO<sub>2</sub> e a conversão de lipídios a partir do lactato foram medidas.

A adição do lactato no meio contendo glicose não interferiu na oxidação da glicose a CO<sub>2</sub>; porém a adição de glicose no meio que continha lactato estimulou a oxidação do lactato a CO<sub>2</sub> (Fig. IV.33).



**Fig.IV.33.** Competição entre Glicose 5 mM e Lactato 10 mM na oxidação a CO<sub>2</sub>, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

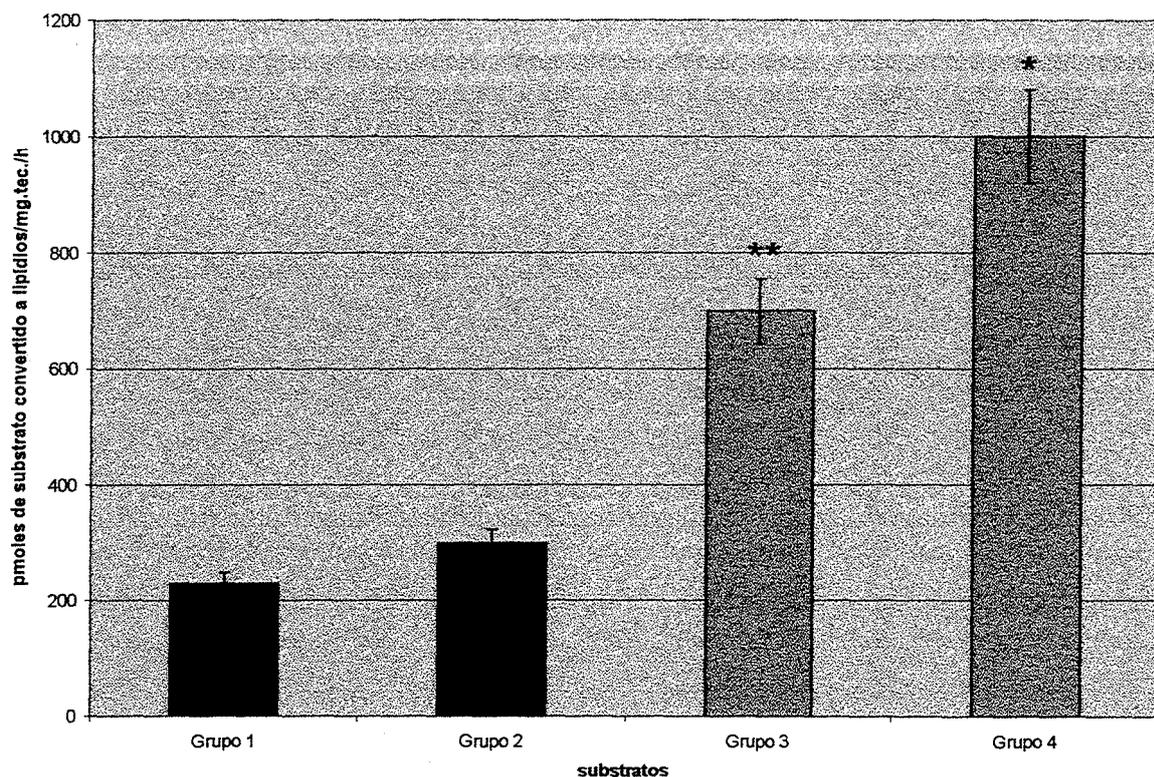
n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste t de Student.

\*p < 0,01 a adição de glicose ao meio que continha lactato aumentou significativamente a oxidação do lactato a CO<sub>2</sub>.

\*,\*\*p < 0,01 a oxidação a CO<sub>2</sub> a partir de lactato foi superior a oxidação da glicose, independentemente do meio utilizado .

A adição do lactato no meio contendo glicose não interferiu na conversão da glicose a lipídios; porém a adição de glicose no meio que continha lactato estimulou a conversão do lactato a lipídios, mas em uma magnitude inferior comparativamente à oxidação (Fig. IV.34)



**Fig.IV.34.** Competição entre Glicose 5 mM e Lactato 10 mM na conversão a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n = 5 animais.

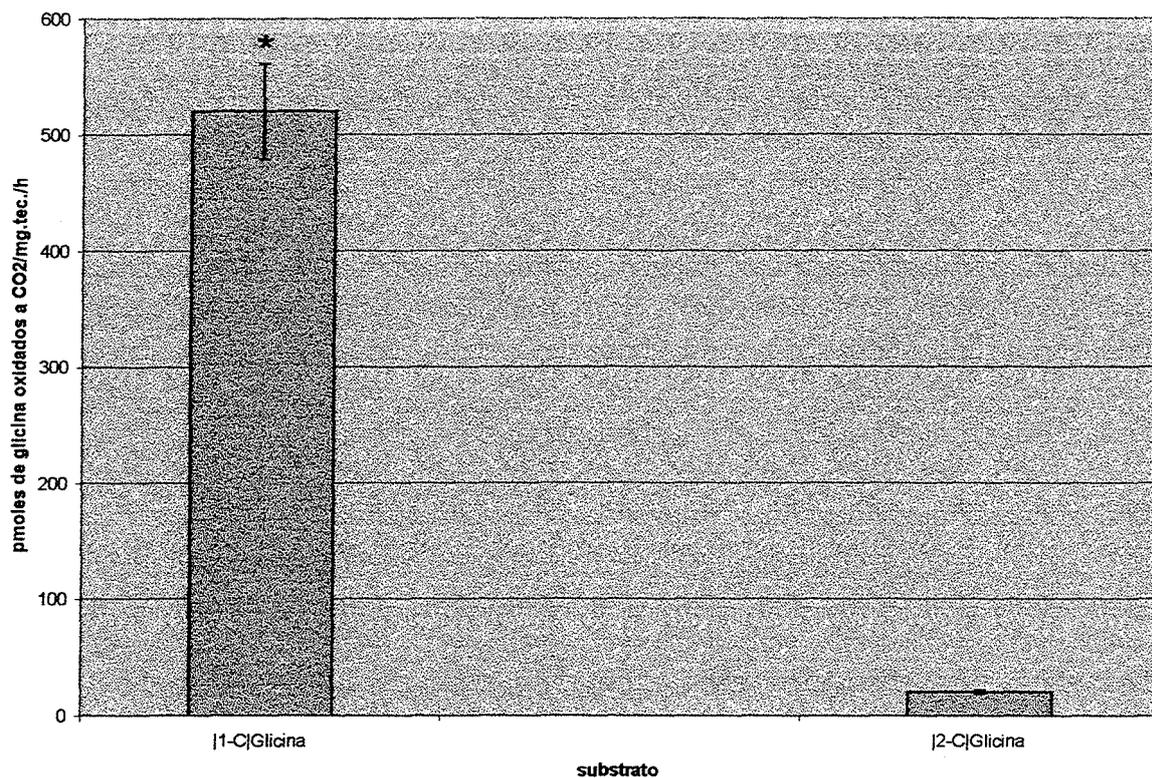
As médias foram comparadas pelo teste t de Student.

\* $p < 0,01$  a adição de glicose ao meio que continha lactato aumentou significativamente a síntese de lipídios a partir do lactato.

\*, \*\* $p <$  a síntese de lipídios a partir de lactato foi superior a síntese de lipídios a partir da glicose, independentemente do meio utilizado.

#### **IV.5. Vias Metabólicas da Glicina marcada no Carbono1 ou no Carbono 2 :**

Com a finalidade de verificar qual a principal via de oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$ , medimos a oxidação da mesma a  $\text{CO}_2$ , utilizando  $[1-^{14}\text{C}]$  Glicina e  $[2-^{14}\text{C}]$  Glicina com a mesma atividade específica no meio de incubação. A oxidação da  $[1-^{14}\text{C}]$  Glicina foi cerca de trinta e cinco vezes superior à oxidação da  $[2-^{14}\text{C}]$  Glicina (Fig.IV.35).



**Fig.IV.35.**Oxidação da Glicina [1-<sup>14</sup>C] a CO<sub>2</sub> e da [2-<sup>14</sup>C] em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.

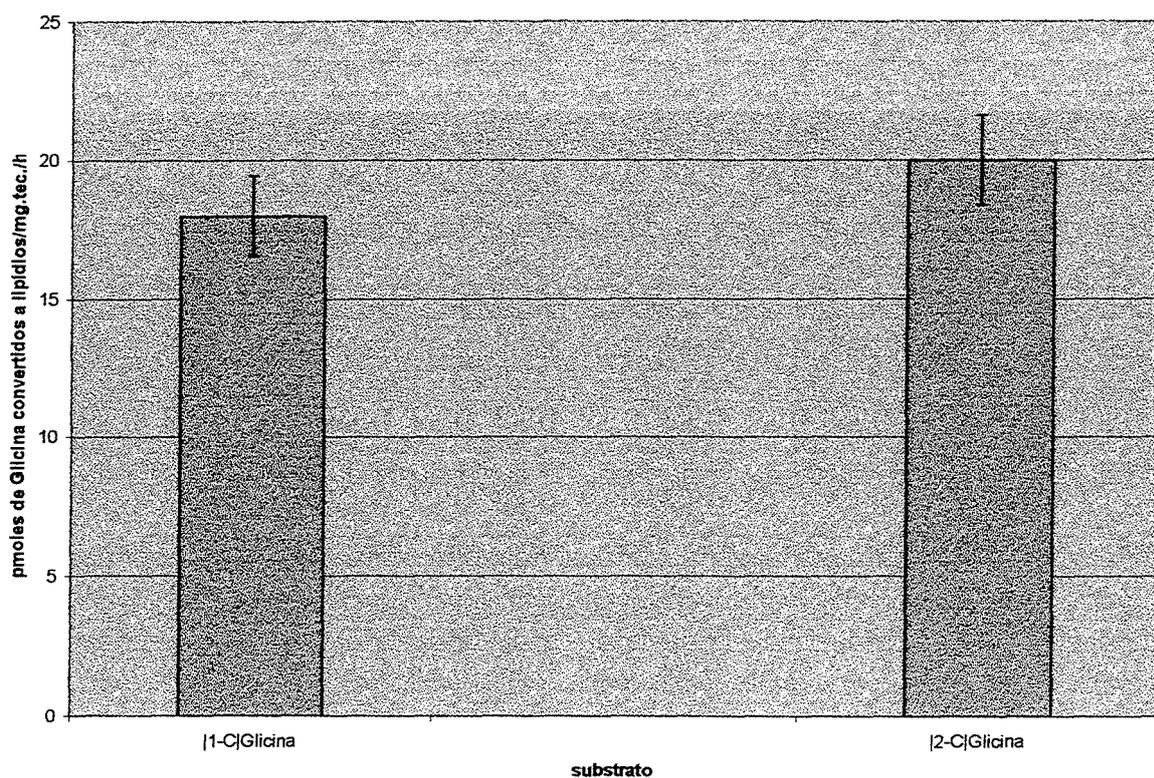
Cada barra representa a média ± EPM.

n = 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste t de Student.

\*p < 0,01 a oxidação da glicina marcada no carbono 1 foi significativamente superior em relação a marcada no carbono 2.

Não observamos diferença estatística significativa entre a síntese de lipídios a partir da glicina marcada no carbono 1 ou no carbono 2 (Fig.IV.36).



**FIG.IV.36.** Conversão da Glicina [1-<sup>14</sup>C] e da [2-<sup>14</sup>C] a lipídios, em fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade.

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM.

n= 5 animais.

As médias foram comparadas pelo teste t de Student.

## V.DISCUSSÃO

O desenvolvimento do Sistema Nervoso Central dos mamíferos envolve uma série de eventos altamente regulados, os quais incluem divisão celular (neurogênese e gliogênese), migração de células para áreas alvos no cérebro, diferenciação celular (incluindo arborização dendrítica, extensão axonal, deposição da bainha de mielina nos axônios, formação de sinapses, síntese e liberação de neurotransmissores e morte seletiva de células durante todo o processo de desenvolvimento (Morgane *et al.*, 1992).

Em ratos a proliferação dos macroneurônios inicia-se no décimo quarto de dia de gestação e apresenta o pico máximo no décimo sexto dia; neste período ocorre também uma intensa proliferação dos astrócitos; a máxima proliferação de microneurônios e oligodentrócitos ocorre no décimo quarto dia de vida pós-natal (Morgane *et al.*, 1992 ).

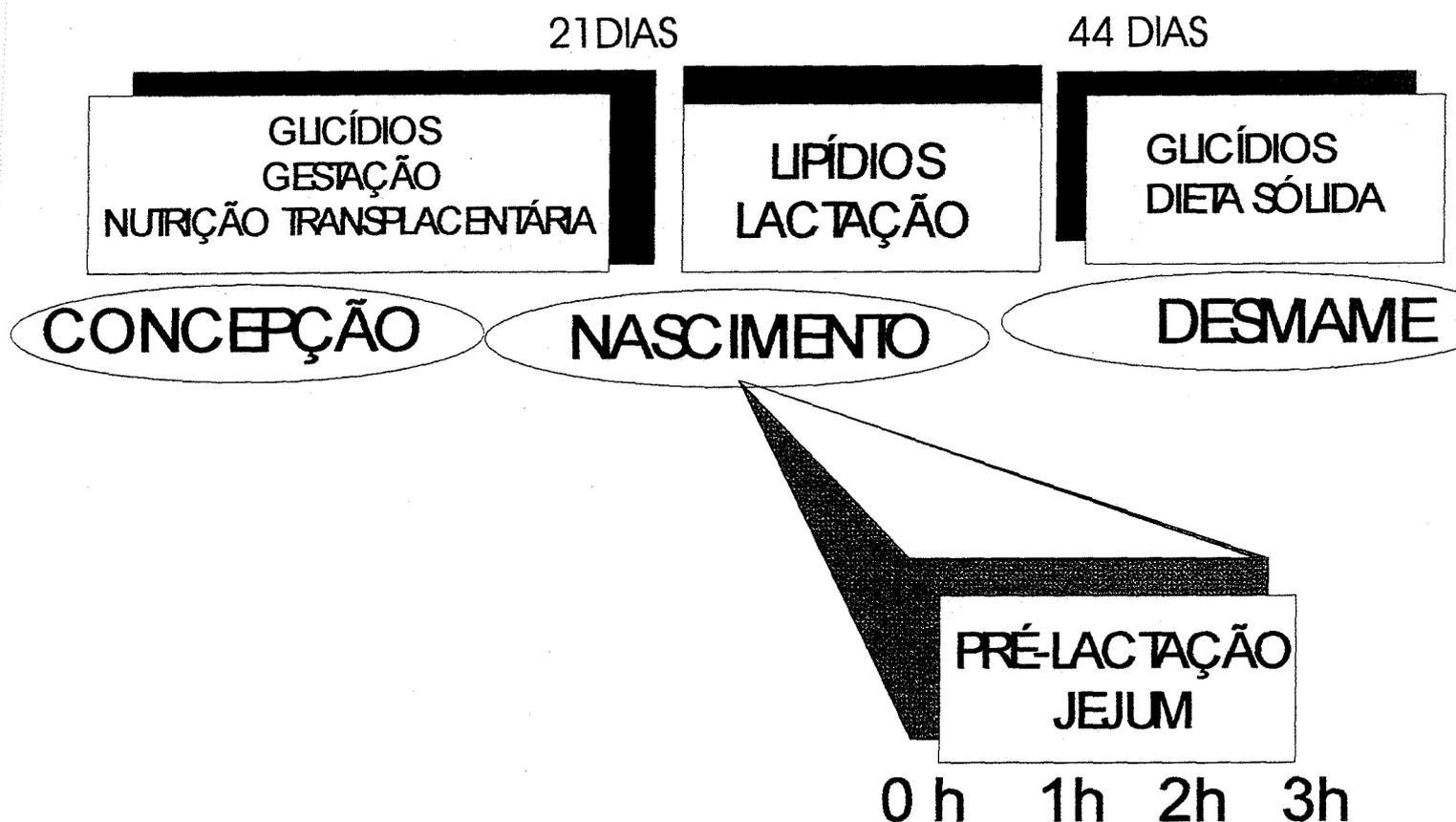
Em humanos a macroneurogênese e a proliferação de astrócitos ocorrem no terceiro mês de gestação, a proliferação dos microneurônios e de oligodentrócitos é máxima no segundo e terceiro mês de vida pós-natal. O rato e o homem são classificados do ponto de vista do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central como animais não precoces; já a cobaia, bovinos e eqüinos são animais

precoces. Nestes o Sistema Nervoso Central está praticamente maduro no dia do nascimento.

O cerebelo do rato no dia do nascimento apresenta apenas 3 % do DNA em relação ao animal adulto (Rassin *et al.*,1987). As enzimas da rota glicolítica bem como as enzimas do ciclo de Krebs apresentam uma atividade enzimática superior a 50 % da atividade do animal adulto na cobaia no dia do nascimento; nos ratos as atividades destas enzimas no dia do nascimento é inferior a 20% das atividades das enzimas no animal adulto (Booth *et al.*,1980).

O sistema enzimático de utilização dos corpos cetônicos no Sistema Nervoso Central dos ratos é baixa no dia do nascimento, apresentando um valor inferior a dos ratos adultos, cresce acentuadamente durante o período de lactação, apresentando o pico de máxima atividade aos vinte dias de vida pós-natal (Booth *et al.*,1980). A concentração do transportador de glicose dos capilares do Sistema Nervoso Central é baixa durante a lactação, e aumenta após o desmame (Cremer *et al.*,1976), enquanto a concentração do transportador dos ácidos monocarboxílicos é elevada durante a lactação, e diminui após o desmame (Cremer *et al.*,1976).

O principal nutriente energético utilizado pelo Sistema Nervoso Central durante a gestação é a glicose proveniente do sangue materno. Após o nascimento há uma mudança brusca na dieta dos ratos, passando de uma dieta hiperglicídica durante a gestação, para uma dieta na qual a porcentagem de calorias provenientes dos lipídios é superior a 75% (Girard *et al.*,1992 ).



**Figura IV.1** Períodos Perinatais

A síntese do glicogênio hepático aumenta significativamente a partir do décimo oitavo dia de gestação no rato e da trigésima sexta semana em humanos (Girard *et al.*, 1992). A concentração do glicogênio hepático no rato, logo após o nascimento, está em torno de 12 g% (Girard *et al.*, 1992).

O rato ao nascer apresenta uma quantidade insignificante de tecido adiposo branco, menos de 1% ; a quantidade de tecido adiposo branco nos humanos está em torno de 15% no dia do nascimento (Girard *et al.*, 1992). A glicemia dos ratos logo após o nascimento está em torno de 2,5 mM (Girard *et al.*, 1992). Entre o nascimento e o início

da amamentação transcorre um período médio de 3 horas de jejum, este é um período crítico para a sobrevivência dos ratos (Medina *et al.*,1990). A velocidade de gliconeogênese e de glicogenólise é insignificante durante este período (Girard *et al.*,1992). Nas primeiras 2-3 horas de vida pós-natal o principal nutriente energético utilizado pelo Sistema Nervoso Central é o lactato sangüíneo (Medina *et al.*,1990 ),mas após este período a concentração do lactato sangüíneo cai para valores inferiores a 2 mM (Medina *et al.*,1990). Aproximadamente depois de 3 horas do nascimento a velocidade da glicogenólise aumenta acentuadamente e há um aumento significativo na velocidade de gliconeogênese (Medina *et al.*,1990 ). Neste período a glicose é o principal nutriente energético para o Sistema Nervoso Central (Medina *et al.*,1990). Os corpos cetônicos sangüíneos só apresentam um acentuado aumento de concentração após doze horas de jejum, este aumento é decorrente de uma menor sensibilidade de inibição da carnitina palmitoil transferase I (CPT I) à malonil CoA , que só ocorre em média 12 horas após o nascimento (Girard *et al.*,1992).

A glicose e os corpos cetônicos são os principais nutrientes energéticos utilizados pelo Sistema Nervoso Central durante a fase de lactação (Girard *et al.*,1992). Aos quinze dias de vida pós-natal os ratos iniciam a alimentar-se, também, da ração sólida que é ofertada a rata mãe, esta ração apresenta uma concentração de glicídios de aproximadamente 70% (Girard *et al.*,1992).

O desmame espontâneo dos ratos ocorre em média aos vinte oito dias de vida pós natal (Girard *et al.*,1992), no meio científico o desmame dos ratos é em regra efetuado aos vinte e um dias de vida pós-natal, sendo importante salientar que durante o período de

lactação os ratos não apresentam ritmo circadiano quanto ao hábito alimentar ( Girard *et al.*,1992 ).

Como pode ser observado nas figuras IV.1 e IV.2 a velocidade máxima de oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  e velocidade máxima da síntese de lipídios a partir da mesma por fatias de cerebelo de ratos de 10 dias de idade foi alcançada com a concentração de 5,0 mM de glicose. Provavelmente, isto é decorrente do baixo Km dos transportadores de glicose no Sistema Nervoso Central e do baixo Km da hexoquinase para a glicose. O GLUT 1, o principal transportador de glicose nos astrócitos apresenta um Km inferior a 1 Mm; o GLUT 3 (o principal transportador de glicose encontrado nos neurônios) apresenta um Km em torno de 1,6 mM ( Hara *et al.*,1989 ).

Como pode ser observado nas figuras IV.13 e IV.14 tanto a oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$ , quanto a síntese de lipídios a partir da mesma por fatias de cerebelo de ratos foi significativamente maior a partir da fatias de cerebelo de ratos adultos em relação aos resultados obtidos nas demais idades estudadas. Provavelmente, este resultado é decorrente do aumento da atividade das enzimas da rota glicolítica com o aumento da idade dos animais ( Booth *et al.*,1980 ).

Como pode ser observado nas figuras IV.25, IV.27, IV.29 e IV.31 a velocidade de oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  é superior à oxidação do  $\beta$ OH-Butirato e glicerol a  $\text{CO}_2$  em todas as idades estudadas. Nas idades de 21 dias de vida pós-natal e na idade adulta a oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  é também superior à oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$ , como pode ser observado nas figuras IV.29 e IV.31. Em termos de produção de ATP, a oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  produz mais ATP do que a oxidação da glicina em todas as idades estudadas, pois a mesma é

quase exclusivamente oxidada através do sistema de clivagem da glicina, o qual produz um mol de  $\text{CO}_2$ , um mol de  $\text{NH}_3$ , um mol NADH e um mol de tetraidrofolato-metileno por mol de glicina oxidada.

Como pode ser observado na figura IV.35 a oxidação da [1- $^{14}\text{C}$ ]glicina a  $\text{CO}_2$  é cerca de 35 vezes superior à oxidação da [2- $^{14}\text{C}$ ]glicina a  $\text{CO}_2$ . Este resultado evidencia que a oxidação da glicina ocorre quase exclusivamente através do sistema de clivagem da glicina.

Os resultados mostrados na figura IV.36 fortalecem a conclusão de que a oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$  é realizada através do sistema de clivagem da mesma, pois se a glicina fosse significativamente oxidada através de sua conversão a piruvato, a síntese de lipídios a partir da [2- $^{14}\text{C}$ ]glicina obrigatoriamente seria superior à observada em relação a [1- $^{14}\text{C}$ ]glicina.

Em trabalho submetido à publicação, mostramos que não se formam lipídios neutros a partir de [1- $^{14}\text{C}$ ]glicina e da [2- $^{14}\text{C}$ ]glicina e que os lipídios formados correm com padrões eletroforéticos equivalentes a glicerolipídios e esfingolipídios. Neste mesmo trabalho mostramos que a oxidação da [1- $^{14}\text{C}$ ]glicina é quatro vezes superior no cerebelo e no córtex cerebral em relação à medula oblonga; a atividade do sistema de clivagem da glicina é cerca de quatro vezes maior nestas estruturas em relação à atividade encontrada na medula oblonga (Daly *et al.*, 1976). O conjunto destes resultados mostram claramente que a oxidação da glicina no Sistema Nervoso Central ocorre quase exclusivamente através do sistema de clivagem da mesma.

Em 1993, Bixel e colaboradores verificaram a utilização de aminoácidos de cadeias ramificadas e glicina por culturas de astrócitos e encontraram que a meia vida da utilização da leucina foi de oito dias e a da valina de dezesseis dias, enquanto que a glicina foi totalmente utilizada em quatro dias.

Em 1997, Govinatski e colaboradores, verificaram que a oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$  por fatias de hipocampo de ratos durante o período de lactação foi dez vezes superior à oxidação da leucina e duas vezes superior à oxidação da valina.

Em 1991, Sato e colaboradores, mostraram, através de técnica de imunocitoquímica que no Sistema Nervoso Central o sistema de clivagem da glicina encontra-se apenas nos astrócitos. Os astrócitos perfazem em torno de 20% do volume cerebral (Sato *et al.*, 1991), portanto a capacidade oxidativa da glicina nestas células é realmente muito elevada.

Evidências recentes sugerem que a glicina tem um papel importante na neurotransmissão, sendo um neurotransmissor inibidor na medula espinhal e mediando neurotransmissão excitatória na córtex cerebral e na porção anterior do cérebro (Dringer *et al.*, 1998). Portanto, os astrócitos parecem desempenhar também um papel importante na regulação dos níveis da glicina no Sistema Nervoso Central. A glicina também tem um papel importante nos processos de síntese no Sistema Nervoso Central. Seus carbonos são utilizados para a síntese de purinas, glutatião, creatina e delta-aminolevulinato (Dringer *et al.*, 1998).

Como pode ser observado nas figuras IV.9 e IV.10 a velocidade de oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$  e a síntese de lipídios a partir da mesma

tendem a saturar com a concentração de 2,0 mM de glicina. Como pode ser observado na figura IV.21 a oxidação da glicina a CO<sub>2</sub> aumenta da idade fetal até os 10 dias de vida pós-natal e após diminui significativamente com o aumento da idade dos animais. Como pode ser observado na figura IV.22 a síntese de lipídios a partir da glicina aumenta com a idade dos mesmos. Resultados semelhantes foram obtidos por Govinatski e colaboradores, em 1997, utilizando fatias de hipocampo. Dos nutrientes energéticos estudados, apenas o lactato e a glutamina apresentaram uma maior oxidação a CO<sub>2</sub> do que a glicose. A síntese de lipídios a partir da glicose foi superior a síntese de lipídios a partir de  $\beta$ OH-Butirato, glicerol, glicina e glutamina em todas as idades estudadas.

Crone, em 1965, mostrou que a passagem do glicerol através da barreira sangue-cérebro é insignificante. Em 1984, Tildon e colaboradores mostraram que em homogeneizado de cérebro de ratos de diferentes idades a velocidade de oxidação do glicerol a CO<sub>2</sub> é superior à velocidade de oxidação da glicose a CO<sub>2</sub>. No presente trabalho mostramos nas figuras IV.7 e IV.8 que o cerebelo é capaz de utilizar o glicerol tanto para a síntese de lipídios, quanto para a obtenção de energia. Certamente o glicerol utilizado pelo Sistema Nervoso Central seja o resultante do catabolismo dos glicerolipídios do próprio Sistema Nervoso Central. O Km da gliceroquinase cerebral é de aproximadamente 70  $\mu$ M. No presente trabalho não obtivemos saturação tanto para a oxidação do glicerol a CO<sub>2</sub>, quanto para a síntese de lipídios a partir do mesmo com a concentração de 1,0 mM. Como pode ser observado nas figuras IV.19 e IV.20 tanto a oxidação do glicerol a CO<sub>2</sub>, quanto a síntese de lipídios a partir do mesmo foi

maior na idade adulta em relação às demais idades; resultados semelhantes foram também obtidos por Tildon e colaboradores, em 1983, utilizando homogeneizado cerebral, e tais resultados mostram que possivelmente o aumento da utilização do glicerol na idade adulta não seja devido a um maior transporte do glicerol através da membrana plasmática.

Como pode ser observado na figura IV.28, dos nutrientes energéticos estudados, apenas o lactato apresentou uma maior conversão a lipídios em relação à glicose na idade de 10 dias de vida pós-natal.

A glutamina e a glicina foram os nutrientes que tiveram uma menor conversão a lipídios em relação aos demais nutrientes energéticos em todas as idades estudadas. Para a glicina temos uma explicação pertinente, pois a mesma é oxidada a  $\text{CO}_2$  quase exclusivamente pelo sistema de clivagem da mesma, portanto não forma lipídios neutros. Quanto à glutamina não possuímos uma explicação pertinente para sua baixa conversão a lipídios, pois a mesma é transformada a glutamato pela glutaminase e este é transformado em  $\alpha$ -ceto-glutarato tanto por transaminação, quanto pela glutamato desidrogenase. O  $\alpha$ -ceto-glutarato é um dos intermediários do ciclo de Krebs, portanto teria as condições necessárias para ser um bom precursor para a síntese de lipídios.

Em relação a metabolização da glicose a  $\text{CO}_2$  e a sua conversão a lipídios na idade de aproximadamente 21 dias de gestação, como pode ser observado nas figuras IV.25 e IV.26, nossos resultados diferem dos de Medina e Fernández(1986). Os referidos autores mostraram que a oxidação do  $\beta$ OH-Butirato a  $\text{CO}_2$  por fatias

de cérebro de ratos foi superior à oxidação da glicose ao mesmo composto, assim como a síntese de lipídios a partir do  $\beta$ OH-Butirato foi superior à síntese de lipídios em relação a glicose. A principal diferença entre os experimentos diz respeito as estruturas cerebrais utilizadas, cerebelo em nosso trabalho e cérebro no trabalho de Medina e Fernández(1986). Outra diferença é referente ao meio de incubação utilizado; Medina e Fernández utilizaram uma solução fisiológica fosfato/salina, enquanto no presente trabalho utilizamos o meio Krebs-Ringer bicarbonato. Os corpos cetônicos são importantes nutrientes energéticos para o Sistema Nervoso Central no mínimo em quatro situações, a saber: 1- durante a lactação; 2- durante o jejum ; 3- no diabético descompensado; 4- dieta cetogênica. Uma das utilizações terapêuticas da dieta cetogênica é no tratamento da epilepsia. Erecinska e colaboradores, em 1996, verificaram que a adição de corpos cetônicos ao meio de incubação aumentam a concentração de GABA e diminuem a concentração de aspartato nos sinaptosomas. Sato e colaboradores, em 1995, verificaram que a perfusão do coração com um meio contendo corpos cetônicos aumentou a concentração de acetil-CoA de quinze a dezoito vezes no músculo cardíaco, com conseqüente redução nos níveis de CoASH. A redução da CoASH na matriz mitocondrial ocasionaria uma diminuição na síntese de succnil-CoA  $\rightarrow$  succinato  $\rightarrow$  fumarato  $\rightarrow$  malato  $\rightarrow$  oxalacetato  $\rightarrow$  aspartato; por outro lado a diminuição nos níveis de CoASH determinaria um aumento nos níveis de  $\alpha$ -cetogluturato  $\rightarrow$  glutamato. Wu & Roberts em 1974, e Porter & Martin em 1987, verificaram que o efeito dos corpos cetônicos no metabolismo do GABA é exercido ao nível da glutamato

descarboxilase, a qual é estimulada pelo aumento na concentração do glutamato, o substrato da enzima, e pela diminuição do aspartato um possível inibidor da enzima. Os resultados de Erecinska e colaboradores, em 1996, explicam, no mínimo em parte, os efeitos benéficos da dieta cetogênica no tratamento da epilepsia. Primeiramente, os níveis de GABA, um neurotransmissor inibidor aumentam; em segundo lugar, a concentração de aspartato diminui significativamente (Gale,1992). Embora o papel do aspartato como neurotransmissor excitatório não esteja bem estabelecido, este aminoácido é um poderoso agonista dos receptores NMDA.

Como pode ser observado nas figura IV.11 a velocidade máxima de oxidação da glutamina a  $\text{CO}_2$  foi atingida com uma concentração de 1,0 mM, já a velocidade para a síntese de lipídios a partir da glutamina foi atingida com a concentração de 2,0 mM, como pode ser observado na figura IV.12. No presente trabalho utilizamos a concentração de 2,0 mM de glutamina tanto para o estudo da oxidação da mesma a  $\text{CO}_2$ , como para verificar a sua conversão a lipídios.

Como pode ser observado na figura IV.23 a oxidação da glutamina a  $\text{CO}_2$  foi duas vezes superior na idade adulta em relação as demais idades. Resultados semelhantes foram obtidos por Tildon e colaboradores, em 1984, utilizando células isoladas do Sistema Nervoso Central, sendo que os mesmos pesquisadores não encontraram variação com a idade quando utilizaram homogeneizado cerebral. Estes resultados levaram Tildon e colaboradores a proporem que possivelmente o aumento da oxidação da glutamina na idade adulta seja devido a um aumento no transporte da mesma através da

membrana plasmática. A síntese de lipídios a partir da glutamina foi insignificante quando comparada com a sua velocidade de oxidação a  $\text{CO}_2$  e diminuiu acentuadamente com a idade dos animais.

O glutamato é o principal neurotransmissor do Sistema Nervoso Central (Ozawa *et al.*,1997). Tem sido proposto que um ciclo de neurotransmissor existe entre neurônio e astrócitos (Berl,1962; Benjamin & Quastel,1990), o glutamato é liberado pelos neurônios nas fendas sinápticas e captado pelos astrócitos e convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase (enzima astroglial). A glutamina é sinapticamente inativa, difunde dos astrócitos para os neurônios onde é convertida a glutamato pela enzima glutaminase, predominantemente neuronal, fechando assim o ciclo.

Yudkof e colaboradores, em 1996, usando [ $^{15}\text{N}$ ]leucina como marcador mostraram que aproximadamente um terço do grupo amino da glutamina origina-se da leucina por transaminação. A passagem da glutamina através da barreira sangue-cérebro é insignificante (Grill *et al.*,1992). Os aminoácidos ramificados, os quais prontamente atravessam a barreira sangue-cérebro (Smith *et al.*,1987), são uma fonte potencial de nitrogênio para a formação de glutamato e glutamina.

Como pode ser visto na figura IV.35 a velocidade de oxidação da [1- $^{14}\text{C}$ ]glicina é cerca de 35 vezes superior à velocidade de oxidação da [2- $^{14}\text{C}$ ]glicina, e a síntese de lipídios a partir da [1- $^{14}\text{C}$ ]glicina não diferiu da velocidade de síntese de lipídios a partir da [2- $^{14}\text{C}$ ]glicina como pode ser visto na figura IV.36. Em trabalho submetido à publicação mostramos que [1- $^{14}\text{C}$ ]glicina e a [2- $^{14}\text{C}$ ]glicina não são

convertidas a lipídios neutros. Estes resultados, tomados em conjunto, mostram que a via de degradação da glicina no Sistema Nervoso Central se realiza através do sistema de clivagem da mesma. Como já foi salientado, Sato e colaboradores, em 1991, mostraram que o sistema de clivagem da glicina se localiza apenas nos astrócitos. Em função do exposto, propomos que há um acoplamento entre o sistema de clivagem da glicina (degradação da glicina a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  e metileno tetraidrofolato) e a glutamina sintetase (glutamato +  $\text{NH}_3$  + ATP), pois ambas enzimas estão localizadas nos astrócitos, e o mesmo tem um papel importante na captação do glutamato liberado na fenda sináptica e na sua transformação em glutamina. Pelo exposto o astrócito certamente também desempenha uma função importante na regulação dos níveis de glicina no Sistema Nervoso Central. Como foi mostrado neste trabalho a glutamina foi um dos principais nutrientes energéticos utilizados por fatias de córtex cerebelar. McKenna e colaboradores em 1986, mostraram que a utilização da glutamina foi superior à utilização do glicerol e da glicose em homogeneizado cerebral de ratos de 4-6 dias, 18-20 dias e em ratos com mais de 90 dias de idade. A utilização da glutamina foi equivalente a utilização do  $\beta$ OH-Butirato nas idades de 4-6 dias e 18-20 dias e foi mais de quatro vezes superior em relação à utilização do mesmo na idade adulta. Possivelmente, outra função importante exercida pelos astrócitos seja a reposição de intermediários do ciclo de Krebs, pois é a única célula do Sistema Nervoso Central que possui a enzima piruvato carboxilase (Wiesinger *et al.*, 1997).

Sibson e colaboradores em 1998 realizaram um estudo utilizando a técnica da  $^{13}\text{C}$ -RMN (Ressonância Nuclear Magnética) para determinar a relação entre o consumo de glicose e a síntese de glutamina (o ciclo do neurotransmissor glutamato) em córtex cerebral. Para isto utilizaram ratos submetidos a três níveis de anestesia diferentes, os quais resultaram em atividades dos eletroencefalográficas diferentes, com amplitudes desde o nível isoeletrico até acima do nível de repouso. A velocidade do ciclo Krebs e a velocidade de síntese de glutamina aumentaram com o aumento da atividade elétrica. Em condições isoeletricas, a velocidade de síntese de glutamina foi quase completamente nula, o que é consistente com a supressão da atividade elétrica. A velocidade de oxidação da glicose ( $\text{CRM}_{\text{gli(oxi)}}$ ) foi calculada através da medida da velocidade do ciclo de Krebs (Vilringer *et al.*, 1995), enquanto a velocidade do ciclo do neurotransmissor (glutamato  $\rightarrow$  glutamina  $\rightarrow$  glutamato) foi calculada através da velocidade da síntese de glutamina ( $V_{\text{gln}}$ ) (Schurr *et al.*, 1988). O consumo de glicose que foi determinado em condições isoeletricas foi apenas de 16% do total da glicose consumida em condições de anestesia suave.

Uma implicação posterior do trabalho de Sibson e colaboradores, em 1998, relaciona-se a considerável quantidade de energia que está sendo utilizada no estado de "repouso" não estimulado. Neste estado, mais de 80% da energia utilizada pelo Sistema Nervoso Central é decorrente da atividade sináptica glutamatérgica. Em humanos despertos, um aumento localizado do consumo de glicose através de estimulação sensória está em ordem

de 12 -20% em relação ao período anterior à estimulação (Fellows *et al.*,1993;Schasfoort *et al.*,1988), embora tenham sido relatados níveis tão altos quanto 50% (Ledeen *et al.*,1992). De outro modo,o aumento focal do consumo de glicose durante tarefas cognitivas tende a ser da ordem de 5-15% em relação ao período não estimulado (Halliwell,1992). Assim, o aumento da utilização de energia durante a estimulação do Sistema Nervoso Central é pequeno em consideração ao elevado nível de utilização energética utilizada no período de “repouso”. Parece razoável, contudo, que a atividade estimulada não seja considerada um novo processo da atividade neuronal, mas uma elevação do processo que já está ocorrendo num nível elevado no estado “não estimulado”.

Em 1996, Magistretti e Pellerin propuseram um modelo de interação astrócito-neurônio no cérebro. Neste modelo, a utilização da glicose ocorre predominantemente pela glicólise nos astrócitos, o qual transporta o lactato como substrato energético para os neurônios. Ademais, estes autores mostraram que, em cultura de astrócitos, o consumo de glicose é acoplado à captação do glutamato dependente de sódio (Magistretti & Pellerin,1996). *In vivo*, estes transportadores removem glutamato da fenda sináptica através de um cotransporte com 2 ou 3 Na<sup>+</sup> e com um transporte contrário de um K<sup>+</sup> (e possivelmente 1 OH<sup>-</sup> ou 1 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Sokoloff *et al.*,1989; Schwartz *et al.*,1979). Consequentemente, uma molécula de ATP seria requerida por molécula de glutamato transportado para restaurar o gradiente de sódio e potássio transmembrana via a ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Pellerin e Magistretti, em 1996, propuseram que a captação do glutamato pelos astrócitos é mantida pela glicólise. Contudo, a transformação do

glutamato em glutamina (a forma no qual o "glutamato" retorna ao neurônio) no astrócito consome um ATP, o total de dois ATP seria repostado pela transformação de uma glicose em dois lactatos. Neste trabalho Pellerin e Magistretti (1996) mostraram que a captação de [<sup>3</sup>H] 2-deoxiglicose por cultura de astrócitos aumenta em função da concentração de glutamato no meio de incubação. Os referidos autores também mostraram que a liberação de lactato dos astrócitos para o meio de cultura é função da concentração de glutamato no meio de cultura. O D-aspartato é um aminoácido não natural cotransportado com Na<sup>+</sup> através dos transportadores do glutamato e não é posteriormente metabolizado ( Magistretti et al.,1993 ).

Em 1984, Bowman e colaboradores mostraram que o D-aspartato estimula a captação de <sup>86</sup>Rb (um marcador da ATPase dependente de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> em astrócitos). Várias evidências apontam para o acoplamento entre a atividade da ATPase dependente de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> e a glicólise, sob condições de oxigenação adequadas. Este fenômeno é chamado de glicólise aeróbica, e foi matéria de intenso debate entre Warburg e Krebs(1972) sobre a natureza do seu significado fisiológico. Atualmente, é aceito que certos tecidos (Lynch & Balaban,1987;Parker & Hoffman,1967), incluindo o cérebro, pode transitoriamente consumir glicose glicoliticamente e produzir grande quantidade de lactato na presença de um nível suficiente de oxigênio para a realização de um metabolismo aeróbico. Um mecanismo proposto é a associação entre a ATPase dependente de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> e algumas enzimas da rota glicolítica (notadamente a fosfoglicerato quinase) (Parker & Hoffman,1967). Evidências sugerem que a ATPase dependente de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> utiliza um "pool" de ATP fornecido pela

atividade da glicerato quinase ligada à membrana plasmática. A utilização da glicose produz ATP, porém a utilização do mesmo pela ATPase dependente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  mantém a atividade da fosfofrutoquinase elevada. O  $\text{NAD}^+$  consumido na reação gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é recuperado na reação catalisada pela lactato desidrogenase.

Em 1996, Magistretti e Pellerin mostraram que o D-aspartato aumentou a captação de  $^{86}\text{Rb}$ , e de  $^3\text{H}$ -de 2-deoxiglicose e aumentou a liberação de lactato dos astrócitos para o meio de cultura. Estes resultados estão em consonância com os resultados obtidos *in vivo* em humanos através da técnica de imagem funcional de ressonância magnética (Prichard *et al.*, 1991; Frahm *et al.*, 1996), que mostram um aumento da produção de  $^1\text{H}$ -lactato durante a ativação da atividade cerebral. Os resultados de Pellerin e Magistretti (1996) também são consistentes com os resultados obtidos através da tomografia por emissão de pósitron (Fox *et al.*, 1988; Fox & Raichle, 1986), que mostram que durante a ativação fisiológica do Sistema Nervoso Central, há um desacoplamento entre a utilização da glicose e o consumo de oxigênio.

O glicogênio em cérebro de mamíferos é principalmente encontrado nos astrócitos (Cataldo e Broadwell, 1992). A glicogênio fosforilase, a principal enzima da glicogenólise, é também predominantemente encontrada nos astrócitos (Pfeiffer *et al.*, 1990; Reinhart *et al.*, 1990). A função do glicogênio nos astrócitos, todavia é desconhecida. O glicogênio pode ser uma fonte de energia para os astrócitos ou para as células vizinhas como os neurônios (Magistretti, 1988). A glicogenólise nos astrócitos é induzida pelos

neurohormônios noradrenalina (Quach *et al.*,1978;Cambray *et al.*,1988;Rosemberg & Dichter,1987), histamina (Magistretti *et al.*,1981), serotonina (Quach *et al.*,1982), peptídeo intestinal vasoativo (Magistretti *et al.*,1981 ),e adenosina (Magistretti *et al.*,1986). O nível do glicogênio nos astrócitos é também modificado pela concentração de glicose (Cambray *et al.*,1988;Swanson *et al.*,1990). A insulina é um dos principais hormônios que regula a concentração do glicogênio nos órgãos periféricos (Stalmans *et al.*,1987;Van de Werve & Jeanrenaud,1987). Em hepatócitos em cultura, a insulina aumenta a síntese do glicogênio e reduz a atividade da glicogênio fosforilase (Schudt,1979; Schudt,1980; Hartmann *et al.*,1987; Salhanick *et al.*,1989). O cérebro contém peptídios semelhantes à insulina, incluindo o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF I) (Wood *et al.*,1989), da mesma forma contém os receptores correspondentes (Roth *et al.*,1986;Rosenfeld *et al.*,1987). Ademais, os receptores do IGF I estão presentes nos astrócitos (Shemer *et al.*,1987). A retirada de glicose do meio de uma cultura primária de astrócitos ocasiona uma rápida diminuição do nível de glicogênio nos astrócitos, com uma meia vida de sete minutos (Dringen & Hamprecht,1992). Ao se adicionar novamente glicose ao meio de cultura a concentração do glicogênio nos astrócitos volta a aumentar, atingindo um patamar na concentração de 5,0 mM de glicose (Dringen & Hamprecht,1992). A metade da quantidade máxima da concentração de glicogênio é atingida após 45 minutos da adição da glicose na cultura e o máximo da concentração de glicogênio é atingida após 2-3 horas da adição da glicose ( Dringen & Hamprecht,1992 ). A adição de insulina ou IGF I ao meio de uma cultura primária de astrócitos aumenta

significativamente a síntese de glicogênio nos mesmos (Dringen & Hamprecht, 1992). Tanto a insulina, quanto o IGF I, propiciaram uma mesma concentração máxima de glicogênio nos astrócitos; porém a concentração dos hormônios para atingir este máximo foi diferente (Dringen & Hamprecht, 1992). O IGF I foi 1,5 ordem mais potente do que a insulina para o estímulo que ocasionou o aumento da metade da concentração máxima de glicogênio nos astrócitos. Um dos mais importantes aspectos da degradação do glicogênio nos astrócitos é o destino dos resíduos glicosila. A glicose proveniente da degradação do glicogênio dos astrócitos não aparecem no meio de incubação (Wiesinger *et al.*, 1997). Quase a totalidade da glicose contida no glicogênio dos astrócitos é transformada em lactato e aparece como tal no meio de cultura (Wiesinger *et al.*, 1997). Este lactato poderia ser um excelente substrato energético para os oligodendrócitos, (Kao-Jen *et al.*, 1980; Snyder *et al.*, 1983) e alguns neurônios como as células de Purkinge (Kao-Jen & Wilson, 1988).

Vários estudos sugerem que o Sistema Nervoso Central não é necessariamente diferente de outros tecidos com respeito à produção de lactato em condições aeróbicas. Sobre condições de estimulação do Sistema Nervoso Central, a concentração de lactato intracerebral aumenta significativamente em relação à concentração de lactato no estado não estimulado, tanto em humanos (Schurr *et al.*, 1988) como em ratos (Fellows *et al.*, 1993). Vários estudos *in vitro* mostraram que o tecido cerebral produz lactato aerobicamente, enquanto outros mostraram a capacidade do Sistema Nervoso Central utilizar lactato como nutriente energético.

Há mais de quatro décadas atrás, McIlwain (McIlwain,1953; McIlwain,1956) mostrou que fatias de córtex cerebral de cobaia utilizam lactato. Quando o substrato energético utilizado foi a glicose, o lactato acumulou no meio de incubação (McIlwain,1953). O acúmulo de lactato no meio de incubação a partir da glicose foi inicialmente rápido (50  $\mu\text{mol/g/h}$ ), porém diminuiu após alguns minutos para cerca de 75% da velocidade inicial. Este declínio nos “níveis de produção” foi devido à utilização do lactato como substrato energético, quando a sua concentração no meio de incubação atingiu níveis superiores a 3,0 mM . Larrabee (1995) mostrou que o gânglios simpáticos produzem mais  $\text{CO}_2$  a partir de 2,0 mM de lactato do que a partir de 5,5 mM de glicose. Se o Sistema Nervoso Central produz substancial quantidade de lactato, uma diferença artério-venosa ( A-V ) seria esperada (isto é: O Sistema Nervoso Central liberaria lactato para o sangue venoso). Contudo, uma diferença artério-venosa negativa raramente foi encontrada ( Magistretti *et al.*,1993;Kety,1957 ). Se o Sistema Nervoso Central não acumula lactato, então qual seria o destino deste produto glicolítico final? Provavelmente, o cérebro utiliza o lactato, e neste caso o termo produto final é totalmente inadequado. O lactato é um substrato energético para o Sistema Nervoso Central?

Em 1988, Schurr e colaboradores mostraram evidências de que o lactato pode completamente substituir a glicose para a manutenção da atividade neural em fatias de hipocampo. Em três estudos separados Drewes *et al*, em 1973, Ljunggren *et al*, em 1974 e Steen *et al*, em 1979, determinaram o nível de glicose e lactato em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido cerebral *in vivo* em situações de oxigenação normal (normoxia), no final do período de isquemia/anoxia e depois do período de

reperfusão/reoxigenação. O nível de glicose cerebral diminuiu acentuadamente após o período de isquemia em relação ao período de normoxia. Após o período de reperfusão/reoxigenação cerebral o nível de glicose cerebral foi superior a duas vezes ao nível do período de normoxia, estes resultados foram encontrados pelos três grupos de pesquisadores (Drewes *et al.*,1973;Ljunggren *et al.*,1974,Steen *et al.*,1979). Quanto ao lactato, a variação foi oposta a da glicose, ou seja, o lactato cerebral aumentou significativamente após o período de isquemia (mais de cinco vezes em relação ao período de normoxia) e diminuiu acentuadamente após o período de reperfusão/reoxigenação, estes resultados também foram encontrados pelos três grupos de pesquisadores.

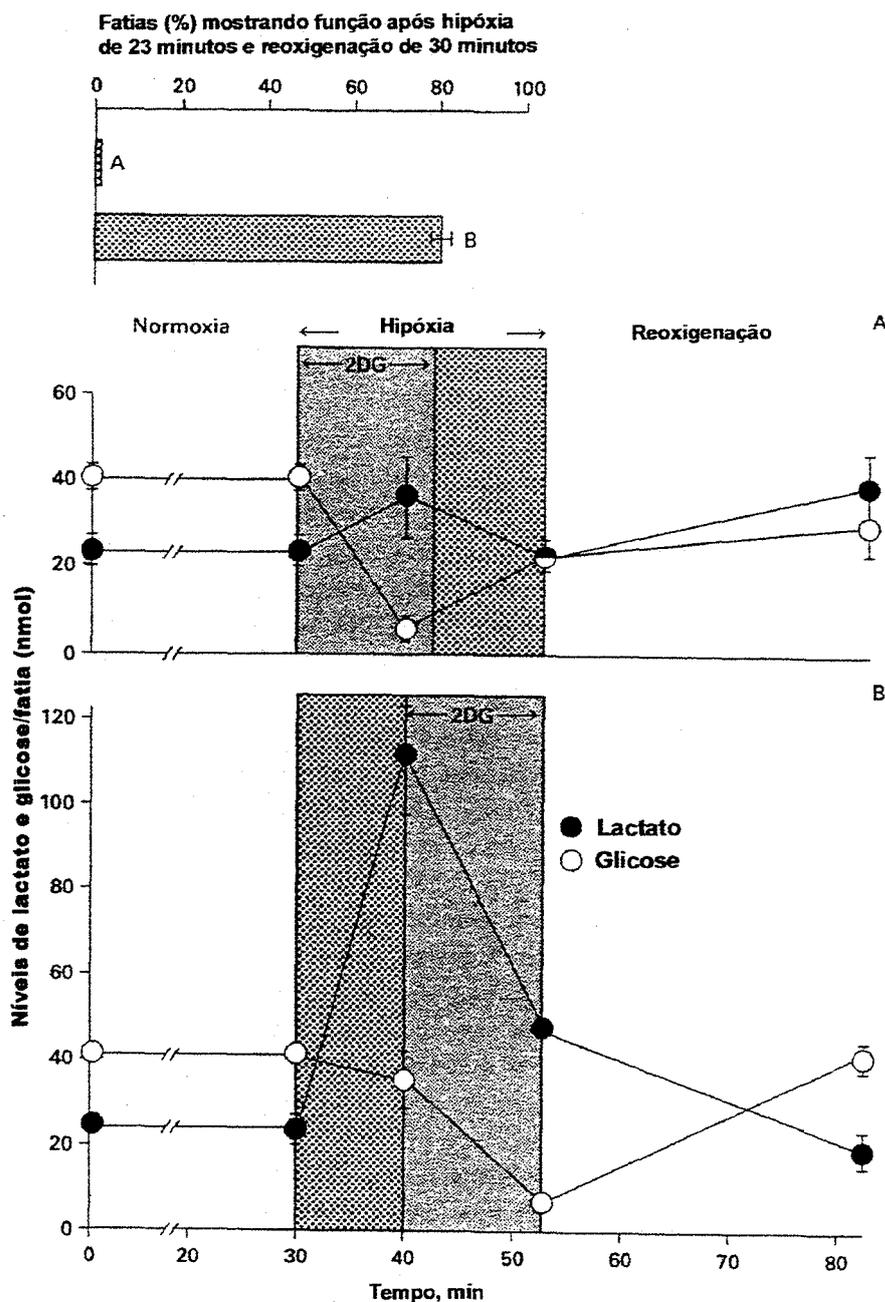
Recentemente, dois transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT1 e MCT2) foram identificados e mostraram diferentes distribuições em cérebro de camundongo. MCT1 é encontrado particularmente no endotélio vascular, enquanto o MCT2 foi encontrado principalmente no hipocampo e nos neurônios corticais. Medidas da liberação de lactato por neurônios e astrócitos mostraram que só os astrócitos podem produzir substancial quantidade de lactato quando submetidos a condições de hipoxia ou de reduzida concentração de glicose no meio de cultura (Walz & Mukerji,1988; Walz & Mukerji,1990).

A liberação do lactato dos astrócitos para os neurônios tem recebido muita atenção nos últimos anos (Lear & Kasliwal,1991;Volk *et al.*,1997). O transporte do lactato dos astrócitos para os neurônios pode exercer um papel importante depois de insultos metabólicos, tais como isquemia, ou hipoxia. Cabe salientar que a lactato

desidrogenase que predomina nos astrócitos é a LDH-5, ou seja a mesma forma encontrada no tecido muscular esquelético, tecido que pode fazer principalmente glicólise anaeróbica em determinadas situações (Bittar *et al.*,1996), enquanto a isoforma da LDH que predomina nos neurônios é a LDH-1, que é a forma que predomina no músculo cardíaco, tecido que faz glicólise aeróbica (Bittar *et al.*,1996).

Recentes estudos realizados pelo grupo de Schurr e colaboradores (Schurr *et al.*,1997), utilizando fatias de hipocampo de ratos adultos, mostraram que o acúmulo de lactato durante o período de privação de oxigênio é de absoluta necessidade para a recuperação da função sináptica após a reoxigenação.

Como pode ser observado na figura V.2 (Schurr *et al.*,1997), as fatias de hipocampo que durante a privação de oxigênio puderam produzir grande quantidade de lactato, após o período de reoxigenação conservaram uma elevada porcentagem de atividade sináptica. De outro modo, aquelas fatias que não puderam produzir lactato em quantidade significativa durante o período de privação de oxigênio, apresentaram uma atividade sináptica desprezível após o período de reoxigenação.



**FIGURA V.2.** Níveis de lactato e glicose em fatias de hipocampo de rato antes, durante e após 23 minutos de hipóxia. As fatias receberam 20 mM de D-glicose em líquido cefalorraquidiano artificial. A D-glicose foi substituída por 2-deoxiglicose (2DG, 20 mM) por 13 minutos tanto no início do período hipóxico (A) quanto 10 minutos após o início da hipóxia (B). A recuperação da função sináptica com a reoxigenação é mostrada no painel superior. Adaptado de Schurr *et al.*, *Dev Neurosci.* 20: 348-357,1998

No que se refere aos resultados de utilização do lactato por fatias de cerebelo de ratos realizados nesta Tese, pode ser observado nas figuras IV.25,27,29,31 que o lactato foi o nutriente energético mais oxidado a  $\text{CO}_2$  nas idades de 21 dias de gestação, 10 dias de idade e 21 dias de idade em relação aos demais nutrientes estudados. Na idade adulta a glutamina apresentou uma maior oxidação a  $\text{CO}_2$  do que o lactato. O lactato foi o nutriente energético mais utilizado para a síntese de lipídios aos 10 dias de idade em relação aos demais nutrientes energéticos (figura IV.28). Nas demais idades, o lactato e a glicose tiveram uma participação na síntese de lipídios equivalente entre si, porém em relação aos demais nutrientes energéticos a participação da glicose e do lactato foram significativamente superiores como pode ser observado nas figuras IV.26,29,30.

Em função do exposto, quanto a utilização do lactato como nutriente energético pelo Sistema Nervoso Central nesta Tese; a resposta ao questionamento feita por Schurr (1997) e por nós mesmos (página 135), em relação a utilização do mesmo como nutriente energético pelo Sistema Nervoso Central, a resposta é sim. Como afirmativa, foi a resposta de Schurr para sua própria indagação (1988) . Durante as 2-3 primeiras horas de vida pós-natal o lactato é o principal nutriente energético utilizado pelo Sistema Nervoso Central (Medina *et al.*,1990). Durante o período de lactação, se a lactatemia aumentar, aumenta a utilização do mesmo pelo Sistema Nervoso Central (Cremer *et al.*,1982). Durante a vida adulta o Sistema Nervoso Central utiliza o próprio lactato que produz (Schurr *et al.*,1988 ;

Magistretti & Pelleri, 1996; Larrabee *et al.*, 1995; Drewes *et al.*, 1973 ; Ljunggren, 1974; Steen *et al.*, 1979).

Cabe neste momento abordar alguns aspectos do metabolismo do Sistema Nervoso Central relativos à função (ou existência) da enzima glicose-6-fosfatase, a liberação de lactato pelos astrócitos, a não liberação de glicose pelos astrócitos. O sucesso das técnicas de autoradiografia, das técnicas da tomografia por emissão de pósitrons, que são variantes do método de captação de 2-deoxiglicose para a estimação da velocidade metabólica regional do cérebro, que pressupõem mínima atividade (desprezível) da enzima glicose-6-fosfatase, fortaleceram a convicção geral de que o Sistema Nervoso Central não possui atividade significativa da enzima glicose-6-fosfatase (Fox *et al.*, 1986), não obstante, o fato de diversos pesquisadores terem encontrado baixa atividade desta enzima no Sistema Nervoso Central (Karnovsky *et al.*, 1982 ; Colilla *et al.*, 1975). Estudos realizados em humanos, utilizando a técnica de dupla imunofluorescência, detectaram a enzima glicose-6-fosfatase (colocalizada com a proteína glial fibrilar ácida, GFAP) em alguns astrócitos, porém não em todos astrócitos (Bell *et al.*, 1993). A glicose-6-fosfatase também foi localizada em cultura primária de astrócitos por técnica de "imunoblot" e sua atividade também foi determinada (Forsyth *et al.*, 1993). A principal diferença encontrada entre a glicose-6-fosfatase cerebral e as glicose-6-fosfatases hepática e renal é o elevado Km da glicose-6-fosfatase cerebral (5-15 mM) em relação aos Km das glicose-6-fosfatase renal e hepática (em torno de 0,5 mM)

(Forsyth,1996). Contudo, a enzima cerebral não é uma nova isoenzima, conforme verificado por Forsyth e colaboradores em 1993.

Forsyth e colaboradores, em 1996, encontraram um Km de 2,0 mM para a glicose-6-fosfatase cerebral de ratos de até 40 dias de idade. Com o aprimoramento dos métodos de detecção da glicose-6-fosfatase foi possível mostrar que esta enzima não se encontra apenas em tecidos classicamente gliconeogénéticos, mas também se encontra em uma variedade de tecidos, incluindo o tecido cerebral (Burchell *et al.*, 1983; Shank *et al.*,1985). As enzimas piruvatocarboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Zimmer & Magnuson,1990) e frutose 1,6-bi-fosfatase (Majumber & Eisenberg,1977; Liu & Fromm,1988; Schmoll *et al.*,1995) que são enzimas essenciais para a gliconeogênese, foram todas elas encontradas nos astrócitos.

Existem evidências que a gliconeogênese ocorre em fatias cerebrais (Forsyth *et al.*,1996) e em cultura de astrócitos (Forsyth *et al.*,1996).

Forsyth e colaboradores,em 1996, incubaram astrócitos com um meio contendo 0; 0,5 ou 20 mM de frutose e mediram a concentração de glicose e lactato no meio de incubação durante um período de três horas. Durante este período, a liberação de lactato para o meio de incubação foi acentuadamente superior à liberação de glicose para o meio de incubação em todas as condições estudadas. Em 1993, Dringen e colaboradores, não conseguiram detectar a liberação de glicose dos astrócitos para um meio de cultura que antes da incubação não continha glicose.

Possivelmente existem diversas razões para a relativa falta de liberação de glicose para o meio de incubação por células que expressam a enzima glicose-6-fosfatase (Forsyth *et al.*,1996). O volume extracelular numa cultura celular em monocamada pode ser considerado infinito, o qual pode facilitar a difusão do lactato, exagerando o papel do metabolismo glicolítico em relação ao metabolismo oxidativo (Hertz & Peng,1992). O Km da glicose-6-fosfatase em astrócitos é alto (Schmoll *et al.*,1995), porém o valor do Km *in vivo* não é conhecido. *In vitro*, os Km relativos a glicose-6-fosfatase e hexoquinase (aproximadamente 5 mM e 40  $\mu$ M respectivamente) tenderão a favorecer a captação da glicose e sua fosforilação. Contudo, quando astrócitos foram pré- incubados por 20 minutos em um meio contendo 5,0 mM de glicose + 2,0 mM de 2-deoxiglicose+ [2-<sup>3</sup>H]2-deoxiglicose e após transferidos para um meio que não continha nem glicose nem 2-deoxiglicose, observou-se o seguinte: 1- no final da pré-incubação, a concentração de 2-deoxiglicose-6-fosfato intracelular era quatro vezes superior à concentração intracelular de 2-deoxiglicose; 2- após 60 minutos de incubação, a concentração de 2-deoxiglicose-6-fosfato intracelular caiu à metade e a concentração de 2-deoxiglicose no meio de incubação era superior a duas vezes a concentração de 2-deoxiglicose intracelular no final do período de pré-incubação. Este experimento mostra claramente que astrócitos “précarregados” com 2-deoxiglicose-6-fosfato (em torno de 5 mM, quantidade suprafisiológica) podem liberar glicose em grande quantidade para o meio externo.

Um modelo *in vivo* no qual os astrócitos regulem a liberação de glicose para os neurônios implica e necessita que seja um modelo em

que haja compartimentalização da glicose no Sistema Nervoso Central (Forsyth, 1996). Alguns estudos anteriores (Betz *et al.*, 1974; Cremer *et al.*, 1975) mostram claras evidências da compartimentalização da glicose no Sistema Nervoso Central. Contudo, os modelos correntes não admitem a compartimentalização do “pool” de glicose no Sistema Nervoso Central; isto significa que toda glicose cerebral, qualquer que seja a sua localização, é considerada como um “pool” único e universal. Esta visão é devido à crença de que o transporte de glicose entre os vários compartimentos do Sistema Nervoso Central (neuronal e astrocítico intracelular, e o espaço extracelular) é limitado pela fosforilação; isto é, que sobre condições fisiológicas a velocidade do transporte da glicose sempre excede a sua utilização. Isto implica que a concentração de glicose é rapidamente equilibrada entre os diferentes compartimentos anatômicos. Tal visão pressupõe que a precisa captação de glicose pelos neurônios (plasma → neurônio; astrócito → neurônio) não apresenta significância funcional, devido ao fato de serem cineticamente indistinguíveis. A concentração de glicose cerebral (“pool” universal) é estimada em 2,5 mM (Forsyth, 1996).

Em 1996, Forsyth e colaboradores e Fellows & Boutelle, em 1993, utilizando a técnica de microdiálises e o método de fluxo zero de Lonroth e colaboradores (Lonroth *et al.*, 1997) determinaram a concentração de glicose no líquido extracelular do *striatum* em ratos despertos (sem anestesia) e em ratos submetidos a um estresse de imobilização por dez minutos (Fellows & Boutelle, 1993) e em ratos que tiveram suas caudas pressionados por cinco minutos. Nas três condições estudadas, a concentração de glicose no meio extracelular-cerebral não ultrapassou a 1,0 mM. Tanto os ratos submetidos a

imobilização por dez minutos, quanto aos ratos que tiveram suas caudas pressionadas por cinco minutos, apresentaram uma concentração de glicose no líquido extracelular superior ao grupo controle (ratos despertados não submetidos a testes). A concentração de glicose no líquido extracelular dos ratos imobilizados foi 80% superior ao grupo controle (Fellows & Boutelle, 1993). O pico do fluxo sanguíneo nos ratos experimentais antecedeu em mais de 15 minutos ao pico da concentração da glicose no líquido extracelular (Fellows & Boutelle, 1993). A fim de examinar se havia alguma relação entre o aumento da concentração de glicose no fluido extracelular do *striatum* e a velocidade do fluxo sanguíneo regional aplicou-se 50  $\mu$ M de propranolol, um antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgico no fluido de perfusão nos ratos que foram submetidos à pressão na cauda (Forsyth, 1996). O propranolol bloqueou completamente o aumento da concentração de glicose no fluido extracelular de *striatum*, porém não causou nenhuma modificação no fluxo sanguíneo regional (Forsyth, 1996). A adição de isoprenalina um agonista  $\beta$ -adrenérgico causou aumento da concentração de glicose no fluido extracelular (Forsyth, 1996). Determinações da concentração de glicose no fluido extracelular do *striatum* realizado por Forsyth e colaboradores, em 1996, e Fellows & Boutelle, em 1993, apontam evidências da compartimentalização do "pool" de glicose no Sistema Nervoso Central. Especificamente, o trabalho de Forsyth e colaboradores, em 1996, sugere que a concentração de glicose no líquido extracelular do *striatum* pode ser influenciado por mecanismos operando independente do fluxo sanguíneo, incluindo mecanismos mediados por receptores  $\beta$ -adrenérgicos. A significância destas observações

realizadas no *striatum*, é que os astrócitos do mesmo possuem a mais elevada concentração de receptores  $\beta$ -adrenérgicos encontrada no Sistema Nervoso Central (Wilkin *et al.*, 1990). Assim, o efeito da infusão de  $\beta$ -agonistas e  $\beta$ -antagonistas no *striatum* modificam a concentração de glicose do fluído extracelular do mesmo, provavelmente através de mecanismos atuando via receptores  $\beta$ -adrenérgicos situados nos astrócitos. Devido a bem conhecida ação glicogenolítica dos  $\beta$ -agonistas nos astrócitos *in vitro* (Magistretti *et al.*, 1993), é possível que os efeitos dos  $\beta$ -agonistas observados no estudo de Forsyth e colaboradores, em 1996, operem via glicogenólise nos astrócitos, causando um aumento da concentração de glicose no fluído extracelular, estimulada pela ativação neuronal. Atualmente, não se pode precisar qual seria o principal nutriente liberado pelos astrócitos para nutrição neuronal. Acreditamos que o lactato é o principal candidato. Pelo que foi exposto, podemos dizer que o metabolismo do Sistema Nervoso Central é flexível, complexo e fascinante.

## VI. CONCLUSÕES

Dos resultados encontrados e discutidos anteriormente, pode-se concluir que:

1- Que o metabolismo de todos os nutrientes energéticos utilizados nesta tese variaram ontogeneticamente. A oxidação a  $\text{CO}_2$  dos nutrientes energéticos glicose, lactato, glicerol e glutamina aumentaram com as idades dos animais, enquanto a oxidação a  $\text{CO}_2$  dos nutrientes  $\beta\text{OH}$ -Butirato e glicina diminuíram com as idades dos animais.

A síntese de lipídios a partir dos nutriente energéticos glicose,  $\beta\text{OH}$ -Butirato e glicerol aumentaram com as idades dos animais , enquanto a síntese de lipídios a partir do lactato, glutamina e glicina diminuíram com as idades dos animais.

2- A oxidação do lactato a  $\text{CO}_2$  foi superior à oxidação dos demais nutrientes energéticos em todas as idades estudadas, exceção feita em relação à idade adulta, onde a glutamina apresentou uma maior oxidação a  $\text{CO}_2$  do que o lactato.

3- A glutamina foi o segundo principal nutriente energético a ser oxidado a  $\text{CO}_2$  por fatias de cerebelo de ratos.

4- Nas idades de 7, 14 e 21 dias de vida pós-natal, o  $\beta\text{OH}$ -Butirato apresentou uma maior oxidação a  $\text{CO}_2$  do que o glicerol em qualquer

idade estudada, porém na idade adulta a oxidação do glicerol a  $\text{CO}_2$  foi superior à oxidação do  $\beta\text{OH}$ -Butirato na mesma idade.

5- A oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  foi superior à oxidação do  $\beta\text{OH}$ -Butirato e do glicerol em todas as idades estudadas.

6- A glicina nas idades de 21 dias de gestação e aos 10 dias de vida pós-natal apresentou uma oxidação a  $\text{CO}_2$  superior à glicose nas mesmas idades.

7- A glicina e o  $\beta\text{OH}$ -Butirato foram os nutrientes energéticos que apresentaram uma menor oxidação a  $\text{CO}_2$  na idade adulta.

8- Na idade de 10 dias a síntese de lipídios a partir do lactato foi superior a síntese de lipídios a partir da glicose; nas demais idades estudadas, a glicose e o lactato não apresentaram diferença entre si. A glicose e o lactato foram os principais nutrientes energéticos utilizados para a síntese de lipídios em todas as idades estudadas.

9- Na idade adulta a síntese de lipídios a partir do  $\beta\text{OH}$ -Butirato foi superior a síntese de lipídios a partir do glicerol, nas demais idades estudadas a síntese de lipídios a partir dos dois substratos não apresentaram diferença entre si.

10- A glicina e a glutamina foram os nutrientes energéticos menos utilizados para a síntese de lipídios por fatias de cerebelo de ratos em todas as idades estudadas.

11- A oxidação do  $[1-^{14}\text{C}]$ glicina a  $\text{CO}_2$  foi em torno de 35 vezes maior do que a oxidação da  $[2-^{14}\text{C}]$ glicina na idade de 10 dias.

12- A síntese de lipídios a partir da  $[1-^{14}\text{C}]$ glicina não diferiu da síntese de lipídios a partir da  $[2-^{14}\text{C}]$ glicina na idade de 10 dias.

13- A adição de lactato na concentração de 10 mM não modificou a oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  nem a síntese de lipídios a partir da mesma num meio na qual a glicose estava na concentração de 5,0 mM em relação ao meio no qual o lactato não foi adicionado, na idade de 10 dias.

14- A adição de glicose na concentração de 5,0 mM a um meio que continha lactato a 10 mM estimulou a oxidação do lactato a  $\text{CO}_2$  e a síntese de lipídios a partir do mesmo em relação ao meio no qual não foi adicionado glicose, na idade de 10 dias.

## **VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDUHL-RAHMAN,A. and SIESJO,B. Local cerebral glucose consumption during insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration.**Acta Physiol. Scand.** v.110 ,p. 149-159,1980.

ALTMAN,J,DAS,G.D. and SUDARSHAN,K. The influence of nutrition on neural behavioral development.Critical review of some data on the growth of the body following dietary deprivation during gestacional and lactation.**Development Phychobiology** v.3,p.281-301,1970.

ARIZMENDI,C. and MEDINA,J.M. Lactate as an oxidizable substrate for rat brain in vitro during the perinatal period.**Biochemistry Journal** v.214,p.633-635,1983.

AUGENFELD,J. and FRITZ,I.B. Carnitine palmitoyltransferase actillity and fatty acid oxidation by illers from fetal and neonatal rats. **Can.J.Biochemistry** v.48,p.288-294,1970.

BAILEY,E. and LOCKWOOD,E.A. Some aspects of fatty acid oxidation and ketone body formation and utilization during development in the rat. **Enzime** v.15,p.239-253,1973.

BALLARD,F.J. The development of gluconeogenesis in rat IIIler.Controlling factors in the newborn. **Biochemistry Journal** v.124,p.265-274,1971.

BALAZS,F.J. The development of glucogenesis in rat IIIler.Controlling factors in the newborn.**Biochemistry Journal** v.124,p.265-274,1971.

BASHAN,N.,GROSS,Y,MOSES,S and GURMAN,A. Rat IIIler glycogen metabolism in the perinatal period.**Biochemistry Biophysiology.Acta** 587,p.145-154,1979.

BATTAGLIA,F.C. AND MESCHIA,G. Principal substrates of fetal metabolism.**Physiological Review** v.58,p.499-527,1978.

BIRNBAUM,M.J.,HASPEL,H.C. and ROSEN,H.M.Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein.**Science** , N.Y. v.229,p.941-945,1986.

BENJAMIN,J.A . and MCKHANN G.M. Glycerol Kinase. **Journal of Neurochemistry**, v.20,p.1111-1120,1973.

BENJAMIN,A.M.,QUASTEL,J.H. Fate of L-glutamate in the brain.  
**J.Neurochem.**,v.23,p.457-464,1974.

BERL,S.,TAKAGAKI,G.,CLARKE,D.D.,WAELSCH,H. Metabolic  
compartments in vivo.**J.Biol.Chem.**,v.237,p.2562-2569,1962.

BETZ,A .L.,GILBOE D.D.,DREWES L.R. Effects of anoxia on net  
uptake and unidirectional transport of glucose into isolates dog  
brain. **Brain Research** v.67,p.307-316,1974.

BETZ,A.L. and GOLSTEIN,G.W.Polarity of the blood-brain barrier :  
neutral aminoacid transport into isolated brain  
capillaries.**Science,N.Y.** v.202,p.225-227,1978.

BETZ,A.L. and GOLDSTEIN,G.W. Developmental changes in  
metabolism and transport properties of capillaries isolated from rat  
brain.**Journal of Physiology** v.312,p.365-370,1981.

BIXEL,G.,DRINGER,R.,WIESINGER,H.,STOCK,W.,HAMPRECHT,B.  
Consumption of branched-chain amino acids and glycine by  
astroglia-rich rat brain cell cultures.**Biol.Chem.Hoppe-Seyler**  
v.374,p.915,1993.

BOOTH,R.F.G.,PATEL,T.B and CLARK,J.B. The development of  
enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial ( guinea  
pig) and non-precocial ( rat ) species.**Journal of Neurochemistry**  
v.34,p.17-25,1980.

BOOTH,R.F.G., PATEL,T.B and CLARK,J.B. Energy metabolism in rat brain,inhibition of pyruvate decarboxylation by 3-hydroxybutyrate in neonatal mitochondria. **Journal of Neurochemistry** v.37,p.179-185,1980.

BRAZITIKOS,P.D. AND TSACOPOULOS,M. Metabolic signaling between photoreceptors and glial cells in the retina of the drone ( *Apis mellifera* ).**Brain Research** v.567,p.33-41,1991.

BUCKLEY,B.M. and WILLIAMSON,D.H. Acetoacetate and brain lipogenesis: developmental pattern of acetoacetyl-coenzyme A synthetase in the soluble fraction of rat brain. **Biochemistry Journal**, v.132,p.653-656,1973.

BUENO,D.;AZZOLIN,I.R and PERRY,M.L.S. Ontogenetic study of glucose and lactate utilisation by cerebellum slices.**Medical Science Research**,v.22,p.631-632,1994.

CAHILL,G.F.,Jr,HERRERA,M.G.,MORGAN,A.P.,SOELDNER,J.,STEIN KE,J.,LEVY,P.L.,RICHARD,G.A.,Jr and KIPNIS,D.M. Hormone - fuel interrelationships during fasting.**Journal Clinical investigation** v.45,p.1751-1769,1966.

CATALDO A .M. and BROADWELL R.D. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under

normal and experimental conditions : neurons and glia. **J.Electron Microsc. Tech.** v.3,p.413-437,1986.

CAKE,M.H.,YEUNG,D and OLLIER,I.T. The control of postnatal hypoglycemia.Suggestions based on experimental observations in neonatal rats.**Biol.Neonate** v.18,p.183-192,1971.

CAMBRAY-DEAKIN M.,PEARCE B.,MORROW C. and MURPHY S. Effects of neurotransmitters on astrocyte glycogen stores in vitro.**J.Neurochem.**,v.51,p.1852-1857,1988.

CHRISTENSEN,H.N.Implications of the cellular transport step for amino acid metabolism. **Nutrition Research** v.35,p.129-133,1977.

CLARK,J.B.;BATES,T.E.;CULLINGFORD,T. and LAND,J.M. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Development Neuroscience** v.15,p.174-180,1993.

CONN,A.R.,FELL,D.I and STEELE,R.D. Characterization of alpha-keto acids transport across the blood-brain barrier in rats.**Am.J.Physiology** v.245,p.E253-E260,1983.

CREMER,J.E and HEATH,D.F. The estimation of rates of utilization of glucose and ketone bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data.**Biochemistry Journal** v.142,p.527-544,1974.

- CREMER, J.E., HEATH, D.F. Glucose and ketone body utilisation in young rat brain : A compartmental analysis of isotopic data. **Metabolic Compartmentation of Neurotransmission. Relation to Brain Structure and Function.** BERL S., CLARKE D.D., SCHNEIDER D. eds. Plenum Press, N.Y., p.545-558, 1975.
- CREMER, J.E.; BRAUN, L.D. and OLDENDORF, W.H. Changes during development in transport processes of the blood-brain barrier. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.448, p.633-637, 1976.
- CREMER, J.E., RAY, D.E., SARNA, G.S., CUNNINGHAM, V.J. A study of the kinetic behaviour of glucose based on simultaneous estimates of influx and phosphorylation in brain regions of rats in different physiological states. **Brain Research** v.221, p.331-342, 1981.
- CREMER, J.E., TEAL, H.M. and CUNNINGHAM, V.J. Inhibition, by 2-oxo acids that accumulate in maple-syrup-urine disease, of lactate, pyruvate and 3-hydroxybutyrate transport across the blood-brain barrier. **Journal of Neurochemistry** v.39, p.674-677, 1982.
- CREMER, J.E. Substrate utilization and brain development. **J.cereb.Blood Flow Metab.** v.2, p.394-407, 1982.
- CRONE, C. Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. **Journal Physiology**, London, v.181, p.103-113, 1965.

CRONE,C. The permeability of brain capillaries to non-electrolytes. **Acta Physiol.Scand.**,v.64,p407-417,1965.

CUEZVA,J.M,MORENO F.J.,MEDINA,J.M. and MAYOR,F. Prematurity in the rat. I. Fuels and glucogenic enzymes. **Biol.Neonate** v.37,p.88-95,1980.

CUEZVA,J.M.,VALCARCE,C. and MEDINA,J.M. Substrate availability for the maintenance of energy homeostasis in the immediate postnatal period of the fasted newborn rat. **Physiological Development of fetus and neonate**,London,p.63-70,1985.

CUTLER,R.W.P. and DUDZINSKI,D.S. Regional changes in amino acid content in developing rat brain. **Journal of Neurochemistry** v.23,p.1005-1009,1974.

DAHLQUIST,G. Cerebral utilization of glucose,ketone bodies and oxigen in starving infant rats and the effect of intrauterine growth retardation. **Acta physiol.scand.**v.98,p.237-247,1976.

DALY,E.C.,NADI,N.S.APRISON,M.H. Regional distribubution and properties of the glycine cleavage system within the central nervous system of the rat: evidence for a endogenous inhibitor during vitro assay. **J.Neurochem.**,v.26,p.179-185,1976.

- DANIEL,P.M.,LOVE,E.R. and PRATT,O.E. The effect of age upon the influx of glucose into the brain. **Journal of Physiology** ,London, v.274 p.141-148,1978.
- DANYSZ,W. and PARSONS,C.G. Glycine and N- Methyl-D-Aspartate Receptors: Physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacological Reviews**,v.50,p.597-664,1998.
- DAVISON,A.N. and DOBBING,J. The developing brain. **Applied Neurochemistry**, Oxford , p.253-286,1968.
- DOBBING,J.,HOPEWELL,J.W.,LYNCH,A. Vulnerability of developing brain. **Biology of Neonate**,v.19,p.363-378,1971.
- DOMBROWSKI,G.J.,SWIATEK,K.R. and CHAO,K.L. Lactate , 3-hydroxybutyrate and glucose as substrate for the early postnatal rat brain.**Neurochemistry Res.** v.14,p.667-675,1989.
- DRINGEN R. and HAMPRECHT. Glucose,Insulin, and Insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures.**J.Neurochemistry**,v.58,p.511-517,1992.
- DRINGEN R.,WIESINGER,H. and HAMPRECHT,B. Uptake of L-Lactate by cultured rat brain neurons.**Neurosci.Lett.**v.163,p.5-7,1993.

- DRINGEN R., VERLEYS DONK S., HAMPRECHT, B., WILLKER W., LEIBFRITZ D., and BRAND A. Metabolism of Glicine in primary astroglial cells : synthesis os creatine, serine, and glutathione. **J. Neurochemistry**, v.70, p.835-840, 1998.
- DREWES L., GILBOE D.D., BETZ L. A . Metabolic alteration in brain during anoxic-anoxia and subsequent recovery. **Arch. Neurol.** v.29, p.385-390, 1973.
- DUNLOP, D.S., MCHALE, D.M. and LAJTHA, A. The rate of protein degradation in developing brain. **Biochemistry Journal** v.208, p.659-666, 1982.
- DUNLOP, D.S., VAN ELDEN, W. and LAJTHA, A. Developmental effects on protein syynthesis rates in regions of the CNS in vivo and in vitro. **Journal Neurochemistry**, v.29, p.939-945, 1977.
- EL MANOUBI, L.S. CALLIKAN, P.H. DUEÈ, P. FERRÉ, and J.R. GIRARD. Development of gluconeogenesis in isolated hepatocytes from the rabbit. **Am. J. Physiol.** v.244, p.E24-E30, 1983.
- ERECINSKA, M., SILVER, I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.**, v.35, p.245-296, 1990.
- ERECINSKA, M., NELSON D., DAIKHIN Y., YUDKOFF M. Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes. **Fluxes Through Enzymes**

of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium, and ketone bodies. **Journal of Neurochemistry**, v.67, p.2325-2334, 1996.

ESCRIVÁ, F., RODRIGUEZ, C. and PASCUAL-LEONE, A.M.  
Glycemia, ketonemia, and brain enzymes of ketone body utilization in suckling and adult rats undernourished from intrauterine life. **Journal of Neurochemistry**, v.44, p.1358-1362, 1985.

EWART, H.S., JOIS, M. and BROSNAN, J.T. Rapid stimulation of hepatic glycine-cleavage system in rats fed on a single high-protein meal. **Biochem. J.**, v.283, p.441-447, 1992.

FELLOWS, L.K., BOUTELLE, M.G. and FILLENZE M. Physiological stimulation increases nonoxidizable glucose metabolism in the brain of the freely moving rat. **J. Neurochem.** v.60, p.1258-1263, 1993.

FELLOWS, L.K. and BOUTELLE, M.G. Rapid changes in extracellular glucose levels and blood flow in the striatum of the freely moving rat. **Brain Res.** v.604, p.225-231, 1993.

FERNANDEZ, J., BERGER, R. and SMIT, G.P.A. Lactate as a cerebral metabolic fuel for glucose-6-phosphatase deficient children. **Pediatric Res.** v.18, p.335-339, 1984.

FERRÉ, P., PÉGORIER, J.P., WILLIAMSON, D.H. and GIRARD, J.  
Interactions in vivo between oxidation of non-esterified fatty acids

and gluconeogenesis in the newborn rat. **Biochemistry Journal** ,  
v.182,p.593-598,1979.

FERNSTROM, J.D. and FALLER, D.V. Neutral amino acids in the brain :  
changes in response to food ingestion. **Journal of  
Neurochemistry**, V.30, p.1531-1538,1978.

FORSYTH ,R.J.,BARTLETT,K.,EYRE,J. Dephosphorylation of 2-  
deoxyglucose 6-phosphate and 2-deoxy glucose export by  
cultured astrocytes. **Neurochem.Int.** V.28,p.243-250,1996.

FORSYTH,R.J.,FRAY,A.BOUTELLE M.,  
FILLENZ,M.MIDDLEDITCH,C.,BURCHELL,A. A role for astrocytes  
in glucose delivery to neurons ? **Dev.Neurosci.**,v.18,p.360-  
370,1996.

FOX,P.T.,RAICHELE,M.E.,MINTUM,M. and DENCE C. Non-oxidative  
glucose consumption during focal physiologic neural  
activity. **Science**.v.241,p.462-464,1988.

FOX,P.T.,RAICHLE,P.T. Focal physiological uncoupling of cerebral  
blood flow and oxidative metabolism during somatosensory  
stimulation in human subjects. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**  
v.83,p.1140-1144,1986.

FRAHM,J.,KRÜGER,G.,MERBOLDT,K.D.,KLEIN-SCHMIDT,<sup>a</sup> Dynamic  
uncoupling and recoupling of perfusion and oxidative metabolism

during focal brain activation in man. **Magn. Reson. Med.** v.35, p.143-148, 1996.

FRÓES, M.M., CORREIA, A .H., ABREU, J.G., SPRAY, D.C., CARVALHO A .C., NETO V.M. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. **Neurobiology**, v.96, p.7541-7546, 1999.

FUGLSANG, A., LOMHOLT, M. and GJEDDE, A. Blood-brain transfer of glucose and glucose analogs in newborn rats. **Journal of Neurochemistry**, v.46, p.1417-1428, 1986.

GALE K. GABA and epilepsy: basic concepts from preclinical research. **Epilepsia**, v.33, p.503-512, 1992.

GOVINATSKI, M.T.O, VELLEDA, L.S, TRINDADE, V.M.T, NAGEL, F.M, BU ENO, D., PERRY, M.L.S. Amino acid metabolism in rat hippocampus during the period of brain growth spurt. **Neurochemical Research**, v.22, p.23-26, 1997.

GREENWOOD, C.E. and CRAIG, R.E.A. Dietary influences on brain function: implications during periods of neuronal maturation. **Basic and clinical aspects of nutrition and brain development.** RASSIN, D.K., HABER, B. and DRUJAN, B. EDS. Alan R, Liss, Inc., New York, v.16 , 1987.

- GRILL,V.BJÖRKEN,M.,GURNIAK,M. and LINDQUIST,M. Brain uptake and release of amino acids in non diabetic and insulindependent diabetic subjects:important role of glutamine release for nitrogen balance.**Metabolism**,v.41,p.28-32,1992.
- GIRARD,J. Gluconeogenesis in late and early neonatal life.**Biol. Neonate** v.50,p.237-258,1986.
- GIRARD,J.,DUÉE,P.H.,FERRÉ,P.,PÉGPRIER,J.P.,ESCRIVIA,F. and DECAUX,J.F. Fatty acid oxidation and ketogenesis during development. **Reprod.Nut.Dev.** v.25,p.303-319,1985.
- GREENWOOD,C.E. and CRAIG,R.E.A. Dietary influences on brain function: implications during periods of neuronal maturation. **Basic and Clinical aspects of nutrition and brain development.** RASSIN,D.K.,HABER,B. and DRUJAN,B.eds.Alan R.Liss,Inc.,N.Y.,v.16,1987.
- GJEDDE,A. High- and low-affinity transport of glucose from blood to brain.**J.Neurochemistry**,v.36,p.1463-1471,1981.
- HAMBERGER,A. Amino acid uptake in neuronal and glial fractions from rabbit cerebral cortex. **Brain Research**,v.31,p.169-178,1971.
- HAMBPRECHT,B. and DRINGEN,R. Energy metabolism. In: **Neuroglia.**KETTENMANN,H. and RANSOM,B.R. eds.Oxford Unillersity Press,Inc.,1995.

- HAMOSH,A.,JOHNSTON,M.V. and VALLE,D. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** SCRIIIER,C.R.,BEAUDET,A.L.,SLY,W.S. and VALLE,D. eds.McGraw-hill,inc.,N.Y.,p.1337-1348,1995.
- HANSON,R.W.,RESHEF,L. and BALLARD,F.J. Hormonal regulation of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase ( GTP ) during development. **Fed.Proc.**,v.34,p.166-171,1975.
- HARA,M.,MATSUDA Y.,HIRAI K.,OKUMURA N.,NAKAGAWA H. Characteristics of glucose transport in neuronal cells and astrocytes from rat brain in primary culture.**Journal of Neurochemistry**.,v.52,p.902-908,1989.
- HARTMANN H.,PROBST I.,JUNGERMANN K., and CREUTZFELDT W. Inhibition of glycogenolysis and glycogen phosphorylase by insulin and proinsulin in rat hepatocyte culture. **Diabetes**,v.36,p.551-555,1987.
- HAWKINS,R.A.,WILLIAMSON,D.H. and KREBS,H.A. Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. **Biochemistry Journal**,v.122,p.13-18,1971.

HERRERA,M.G.,KAMM,D.,RUDERMAN,N. and CAHILL G.F.  
Nonhormonal factors in the control of glucogenesis.  
**Adv.Enz.Regul.** v.4,p.225-235,1966.

HERTZ L.,PENG L. Energy metabolism at the cellular level of the CNS.  
**Can.J.Physiol.Pharmacol.**,v.70,p.s145-s157,1992.

HIPOLITO-REIS,C.,BAILEY,E. and BARTLEY,W. Factors involved in  
the control of the actlllity of enzymes of hepatic ketogenesis  
during development of the rat. **Int.Journal Biochemistry** v.5,p.31-  
39,1974.

IZUMI,Y.,BENZA ,ZORUMSKI,C.F., and OLNEY ,J.W. Effects of  
lactate and pyruvate on glucose deprlllation in rat hippocampal  
slices.**Neuroreport**,v.5,p.617-620,1994.

JOHANSON,C.E. Permeability and vascularity of the developing brain:  
cerebellum vs cerebral cortex. **Brain Research**,v.190,p.3-  
16,1980.

JUANES,M.C.,ARIZMENDI,C and MEDINA,J.M. Attenuation of  
postnatal hypoxia in the premature newborn rat by maternal  
treatment with dexamethasone,it's relationship with lung  
phospholipid content.**Biol.Neonate** v.50,p.337-344,1986.

- KETY, S.S. The general metabolism of the brain in vivo. In: **Metabolism of the Nervous System**, p.221-237, Ed.D, Richter Pergamon Press, Oxford, 1957.
- KORF, J. Intracerebral trafficking of lactate in vivo during stress, exercise, electroconvulsive shock and ischemia as studied with microdialysis. **Dev. Neurosci.**, v.18., p.405-414, 1996.
- KRAUS, H., SCHLENKER, S. and SCHWEDESKY, D. Developmental changes of cerebral ketone body utilization in human infants. **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.** v.355, p.164-170, 1974.
- KREBS, H.A., WILLIAMSON, D.H., BATES, M.W., PAGE, M.A. and HAWKINS, R.A. The role of ketone bodies in caloric homeostasis. **Adv. Enzyme Regul.** v.9, p.387-409, 1971.
- KREBS, H.A. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. **Essays Biochem.** v.8, p.1-34, 1972.
- KRNJEVIC, K. Chemical nature of synaptic neurotransmission in vertebrates. **Physiol. Ver.**, v.54, p.418-540, 1974.
- LAJTHA, A., DUNLOP, D.S., PATLAK, C. and TOTH, J. Compartments of protein metabolism in the developing brain. **Biochemistry Biophysical Acta** v.561, p.491-501, 1979.

LYNCH R.M.,BALABAN,R.S. Coupling of aerobic glycolysis and Na + - K+ -ATPase in renal cell line MDCK.**Am.J.Physiol.**,v25C,p C269-C276,1987.

LARRABEE,M.G. Extracellular intermediates of glucose metabolism : fluxes of endogenous lactate and alanine through extracellular pools in embryonic sympathetic ganglia.**Journal of Neurochemistry** v.59,p.1041-1052,1992.

LARRABEE,M.G. Lactate metabolism and its effects on glucose metabolism is na excised neural tissue.**J.Neurochem**.v.64,p.1734-1741,1995.

LEAR J.L.,KASLIWAL R.K. Autoradiographic measurement of cerebral lactate transport rate constants in normal and actillated conditions. **J.Cereb.Blood Flow Metab**.VII,p.576-580,1991.

LARRABEE,M.G. Partitioning of CO<sub>2</sub> production between glucose and lactate in excised sympathetic ganglia, with implications for brain.**J.Neurochem**.v.67,p.1726-1734,1996.

LEONG,S.E. and CLARK,J.B. Regional enzyme development in rat brain: Enzymes of energy metabolism. **Biochemistry Journal** v.218,p. 139-145,1984.

LINARES,A .,CAMANO,G.J.,DIAZ,R.,GONZALEZ,F.J. and GARCIA-PEREGRIN,E. Utilization of ketone bodies by chick brain and

spinal cord during embryonic and postnatal development. **Neurochem. Res.**, v.18, p.1107-1112, 1993.

LIU F., FROMM H.J. Purification and characterization of fructose-1,6-bisphosphatase from bovine brain. **Arch Biochem. Biophys.**, v.260, p.609-615, 1988.

LJUNGGREN B., NORBERG K., SIESJÖ B.K. Influence of tissue acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia. **Brain Res.**, v.77, p.173-186, 1974.

LÖNNROTH, P., JANSSON, P.A., SMITH U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in human. **Am. J. Physiology** v.253, p.E228-E231, 1987.

LUND-ANDERSEN, H. Transport of glucose from blood to brain. **Physiology Rev.** v.59, p.305-351, 1979.

LUCKEY, T.D., MENDE, T.J. and PLEASANTS, J. The physical and chemical characterization of rat's milk. **Journal Nutrition** v.54, p.345-359, 1954.

LYONNET, S., C. COUPÉ, J. GIRARD, A. KAHN, and A. MUNICH. In vivo regulation of glycolytic and gluconeogenic enzyme expression in newborn rat liver. **J. Clin. Invest.**, v.81, p.1682-1689, 1988.

MAGISTRETTI, P.J., MORRISON J.H., SHOEMAKER W.J., SAPIN V. and BLOOM F.E. Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.78, p.6535-6539, 1981.

MAGISTRETTI, P.J., HOF P.R., and MARTIN J.L. Adenosine stimulates glycogenolysis in mouse cerebral cortex : a possible coupling mechanism between neuronal activity and energy metabolism. **J. Neurosci.**, v.6, p.2558-2562, 1986.

MAGISTRETTI, P.J. Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. **Diabete Metab.** V.14, p.237-246, 1988.

MAGISTRETTI, P.J., SORG, O., YU N., MARTIN, J.L. and PELLERIN L. Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. **Dev. Neurosci.** v.15, p.306-312, 1993.

MAGISTRETTI, P.J., SORG, O., MARTIN, J.L. Regulation of glycogen metabolism in astrocytes : Physiological and pathological aspects. **Astrocyte : Pharmacology and Function.** MURPHY S. eds . Academic Press, S.D., p.243-265, 1993.

MAJUMBER, A. L., EISEMBERG F. Unequivocal demonstration of Fructose-1,6-bisphosphatase in mammalian brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.74, p.3222-3225, 1977.

MAHER,F.,VANNUCCI,S.J. and SIMPSON,I.A. Glucose transporter proteins in brain. **FASEB J.**v.8.,p.1003-1011,1994.

MAKER,H.S.,LEHRER,G.M.,WEISSBARTH,S. and BORNTTEIN,M.B. Changes in LDH isoenzymes of the brain developing in situ and in vitro. **Brain Res.**,v.44,p.189-196,1972.

MAKER,H.S. and HAUSER,G. Incorporation of glucose carbon into gangliosides and cerebrosides by slices of developing rat brain.**J.Neurochemistry**,v.14,p.457-464,1967.

MANTZ J.,CORDIER J.,GIAUME C. Effects of general anesthesia on inter-cellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture. **Anesthesiology**,v.78,p.892-901,1993.

MAYER D. and LETSCH I. Glucose-6-phosphate plays a central role in the regulation of glycogen synthesis in a glycogen-storing Miller cell line.**Cell Biochem.Funct.**v.7,p.243-256,1989.

MAYOR,F. and CUEZVA,J.M. Hormonal and metabolic changes in the perinatal period.**Biol.Neonate**,v.48,p.185-196,1985.

MASON, C.A .EDMONDSON J.C., HATTEN M.E. The extending astroglial process: development of glial shape, the growing tip, and interactions with neurons.**J.Neurosci.**v.8,p.3124-3134,1988.

MCKENNA, M.C., BEZOLD, L.I., KIMATIAN, S.J. and TILDON, J.T.  
Competition of glycerol with other oxidizable substrates in rat  
brain. **Biochemistry Journal** v.337, p.47-51, 1986.

McLLWAIN H. Substances which support respiration and metabolic  
response to electrical impulses in human cerebral  
tissues. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** v.16, p.257-266, 1953.

McLLWAIN H. Electrical influences and speed of chemical change in  
the brain. **Physiol. Ver.**, v.36, p.355-375, 1956.

MEDINA, J.M., FERNANDEZ, E., BOLANOS, J.P., VICARIO, C. and  
ARIZMENDI, C. Fuel supply to the brain during the early postnatal  
period. In: **Endocrine and Biochemical Development of the  
Fetus and Neonate**. CUEZVA, J.M. PASCUAL, A.M. and  
LEONE, M.S. eds. Plenum Press, N.Y., p.175-194, 1990.

MILLER, A.L. Regional glucose and b-hydroxybutyrate use by  
developing rat brain. **Metab. Brain Dis.** v.1, p.53-61, 1986.

MOORE, T.J., LIONE, A.P., SUGDEN, M.C. and REGEN, D.M. b-  
hydroxybutyrate transport in rat brain, developmental and dietary  
modulations. **Am. J. Physiol.** v.230, p.619-630, 1976.

- MORELL,P.,QUARLES,R.H. and NORTON,W.T. In: **Basic Neurochemistry**.SIEGEL,G.,AGRANOFF,B.,ALBERS,R.W. and MOLINOFF,P.eds.Raven Press,N.Y.,p117-143,1994.
- MORGAN,B.L. and NAISMITH,D.J. The effect of early postnatal undernutrition on the growth and development of rat brain.**British Journal of Nutrition**,v.48,p.15-23,1982.
- MORGANE,P.J.,MILLER,M.,KEMPER,T.,STERN,W.,FORBES,W.B.,HALL,R.,BRONZINO,J.D.,KISSANE,J.,HAWRYLEWICZ,E. and RESNICK,O. The effect of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat.**Neuroscience and Biobehavioral Reviews**,v.2,p.137-230,1978.
- MORGANE,P.J. The vulnerable brain and environmental risks.**Malnutrition and hazard assessment**.Edited by Robert L.Issacson and Karl F.Jensen.Plenum Press,N.Y.,1992.
- MOUREK,J. Oxidative metabolism of nervous tissue during ontogeny in rat. In: **Developmental Neurobiology**,p.370-390 .Ed.W.A.Himwich.Charles C.Thomas,Springfield,1970.
- MULLER C.M. Glial cells and activity-dependent central nervous system plasticity. In: **Neuroglia**, p.805-814,Ed.Kettenmann h.,Ransom B.R., N.Y.1995.

NEHLING,A.,BOYET,S. and PEREIRA DE VASCONCELOS,A.  
Autoradiographic measurement of local cerebral B-hydroxybutirate uptake in the rat during postnatal development.**Neuroscience** v.40,p.871-878,1991.

NEMOTO,E.M.HOFF,J.T. and SEVERINGHAUS,J.W. Lactate uptake and metabolism by brain during hyperlactatemia and hipoglycemia.**Stroke** v.5,p.48-53,1974.

NORTON,W.T. and PODUSLO,S.E. Myelin in rat brain.Changes in myelin composition during brain maturation.**J.Neurochem.**v.21,p.759-773,1973.

OCKNER,R.K. Sex differences in long chain fatty acid utilization and fatty acid binding protein concentration in rat liver. **J.Clin.Invest.**v.64,p.172-181,1979.

OKOYE,G.S., POWELL E.M., GELLER H.M. Migration of A7 immortalized astrocytic cells grafted into the adult rat striatum. **J.Comp.Neurol.**v.362,p.524-534,1995.

OLDENDORF,W.H. Blood-brain barrier permeability to lactate. **Eur.Neurology** v.6,p.49-55,1972.

OLDENDORF,W.H. Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short chain monocarboxylic organic acids.**Am.J.Physiology** v.224,p.1450-1453,1973.

OWEN, O.E., MORGAN, A.P., KEMP, H.G., SULLIVAN, J.M., HERRERA, M. G. and CAHILL, G.F. Brain metabolism during fasting. **Journal Clinical Investigation**, v.46, p.1589-1595, 1967.

OWEN, O.E. and REICHARD, G. A. Ketone body metabolism in normal, obese and diabetic subjects. **Israel J. Med. Sci.**, v.11, p.560-570, 1975.

OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian Central Nervous System. **Progress in Neurobiology**, v.54, p.581-618, 1998.

PAGE, M.A., KREBS, H. A. and WILLIAMSON, D.H. Activities of enzymes of ketone body utilization in brain and other tissues of suckling rats. **Biochem. J.**, v.121, p.49-53, 1971.

PARDRIDGE, W.M. Brain metabolism: A perspective from the blood-brain barrier. **Physiological Review** v.63, p.1481-1535, 1983.

PARKER, J.C., HOFFMAN J.F. The role of membrane phosphoglycerate kinase in the control of glycolytic rate by anion transport in human red blood cells. **J. Gen. Physiol.** v.50, p.893-916, 1967.

PASTI, L., VOLTERRA A., POZZAN T., CARMIGNOTO G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic bidirectional form

of communication between neurons and astrocytes *in situ*. **J.Neurosci.** v.17,p.7817-7830,1997.

PATEL,M.S. and BALAZS,R. Manifestation of metabolic compartmentation during the maturation of the rat brain. **Journal of Neurochemistry** v.17,p.955-971,1970.

PERRY,M.S.,CARRASCO,M.A.,DIAS,D.R. and IZQUIERDO,I. B-endorphin like immunoreactivity of brain,pituitary gland and plasma rats inhibited to postnatal protein malnutrition : Effect of behavioral training. **Peptides** v.5,p.15-20,1984.

PERRY,M.L.S.,GAMALLO,J.L. and BERNARD,E.A. Effect of protein malnutrition on glycoprotein synthesis in rat cerebral cortex slices during the period of brain growth spurt. **Journal of Nutrition** v.116,p.2486-2489,1986.

PETERS A., PALAY S.L.,WEBSTER H.D. The neuroglial cells. In: The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells. London: Oxford University Press; p.273-295,1991.

PFEIFFER B.,ELMER K.,REIHART P.H.,ROGGENDORF W. and HAMPRECHT B. Immunohistochemical demonstration of glycogen phosphorylase in rat brain slices.**Histochemistry** v.94,p.73-80,1990.

PHILIPPIDIS, H., and F.J. BALLARD. The development of gluconeogenesis in rat liver. Experiments in vivo. **Biochem. Journal** v. 113, p. 651-657, 1969.

POLLAK, J.K. The maturation of the inner membrane of fetal rat liver mitochondria. An example of a positive-feedback-mechanism. **Biochem. J.**, v. 150, p. 477-488, 1975.

POLLAK, J.K. The interdependence of mitochondrial maturation and glycogen metabolism in perinatal rat liver. **Biochem. Soc. Trans.** v. 5, p. 341-348, 1977.

PORTER T.G. and MARTIN D.L. Rapid inactivation of brain glutamate decarboxylase by aspartate. **J. Neurochem.** v. 48, p. 67-72, 1987.

PRICHARD, J., ROTHMAN, D., NOVOTNY, E., PETROFF, O., KUWABARA, A.T., AVISON, M., MHOWSEMAN, A., HANSTOCK, C., SCHULMAN, R. Lactate rise detected by <sup>1</sup>H-NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. **Med. Sci.** v. 88, p. 5828-5831, 1991.

PRIP-BUUS, C., J.P. PÉGORIER, P.H. DUÉE, C. KOHL, and J. GIRARD. Evidence that the sensitivity of carnitine palmitoyl-transferase I to malonyl-CoA inhibition is the major site of regulation of hepatic fatty acid oxidation in the fetal and newborn rabbit. **Biochem. J.** v. 269, p. 409-415, 1990.

PROBST,A .,CORTESE,R. and PALACIO,J.M. The distribution of glycine receptors in the human brain. A light microscopic autoradiographic study.**Neuroscience** v.17,p.11-36,1986.

QUACH T.T.,DUCHEMIN A .M.,ROSE C.,and SCHWARTZ J.C (3 H ) Glycogen hydrolysis in brain slices:responses to neurotransmitters and modulation of to neurotransmitters and modulation of noradrenalina receptors.**J.Neurochem.**v.30,p.1335-1341,1978.

QUACH T.T.,DUCHEMIN A .M.,ROSE C.,and SCHWARTZ J.C. 3 H- Glycogen hydrolysis elicited by histamine in mouse brain slices: selective involvement of H1 receptors.**Mol.Pharmacol.**v.17,p.301-308,1980.

QUACH T.T.,DUCHEMIN A .M.,ROSE C.,and SCHWARTZ J.C Glycogenolysis induced by serotonin in brain : identification of a new class of receptor.**Nature** v.298,p.373-375,1982.

QUANT,P.A, ROBIN,D.ROBIN,P.FERRÉ,BRAND,M. and GIRARD,J. Control of hepatic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase during the fetal / neonatal transition,suckling and weaning in the rat. **Eur.J.Biochemistry** v.195,p.449-454,1991.

RASSIN,D.K. Protein nutrition in the neonato :assessment and implications for brain development. In: Current topics in nutrition disease,v.16:**Basic and Clinical Aspects of Nutrition and Brain**

**Development.** RASSIN, D.K., HABER, BERNARD and DRUJAN, B. eds. Alan R. Liss, Inc., N. Y., p.43-56, 1987.

REINHART P.H., PFEIFFER B., SPENGLER S. and HAMPRECHT B. Purification of glycogen phosphorylase from bovine brain and immunocytochemical examination of rat primary cultures using monoclonal antibodies raised against this enzyme. **J. Neurochem.** v.54, p.1474-1483, 1980.

ROBINSON, A.M. and WILLIAMSON, D.H. Physiological roles of ketone bodies as substrate and signals in mammalian tissues. **Physiological Reviews** v.60, n°1, p.143-216, 1980.

ROBINSON, J.L., P.H. DUEÉ, O. SCHREIBER, B. BOISJOYEUX, M. CHANEZ, J.P. PÉGORIER, and J. PERET. Development of gluconeogenic enzymes in the liver of fasting or suckling newborn pigs. **J. Dev. Physiol.** v.3, p.191-201, 1981.

ROEDERT, L.M. and TILDON, J.T. Competition among oxidizable substrates in brain of young and adult rats. **Trans. Am. Soc. Neurochemistry** v.14, p.113, 1983.

ROEDER, L.M., TILDON, J.T. and WILLIAMS I.B. Transport of 2-deoxy-D-glucose by dissociated brain cells. **Brain Res.**, v.345, p.289-305, 1985.

ROSENBERG ,P.A . and DICHTER M.A . A small subset of cortical astrocytes in culture accumulate glycogen.**Int.J.Dev.Neurosci.**,v.5,p.227-235,1987.

ROSENFELD ,R.G.PHAM H.,KELLER B.T.,BOCHARDT,R.T. ,and PARDRIDGE,W.M. Demonstration and strutural comparison of receptors for insulin-like growth factor-I and II ( IGF-I and II ) in brain and blood-brain barrier. **Biochem.Biophys .Res.Commun.** ,v.149, p.159-166,1987.

ROTH,R.A .,MORGAN,D.O .,BEAUDOIN,J. and SARA,V. Purification and characterization of the human brain insulin receptor.**J.Biol.Chem.**,v.261,p.3753-3757,1986.

SALHANICK,A .I.,CHANG,C.L., and AMATRUDA,J.M. Hormone and substrate regulation of glycogen accumulation in primary cultures of rat hepatocytes.**Biochem.J.**,v.261,p.985-992,1989.

SATO,K.,YOSHIDA,S.,FUJIWARA,TADA,K. and TOHYAMA,M. Glycine cleavage system in astrocytes. **Brain Research** v.567,p.64-70,1991.

SATO,K.,KASHIWAYA,Y.,KEON,C.A,TSUCHIYA,N.,KING,M.T.,RADD A,G.R.,CHANCE,B.,CLARKE K., and VEECH,R.L. Insulin,ketone bodies,and mitochondrial energy transduction.**FASEB J.**,v.9,p.651-658,1995.

SCHROEDER, H. BOMONT, L. and NEHLIG A. Influence of early chronic phenobarbital treatment on cerebral arteriovenous differences of glucose and ketone bodies in the developing rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* v.9, p.453-461, 1991.

SCHUDT, C. Regulation of glycogen synthesis in rat-hepatocyte cultures by glucose, insulin and glucocorticoids. *Eur. J. Biochem.*, v.97, p.155-160, 1979.

SCHUDT, C. Influence of insulin, glucocorticoids and glucose on glycogen synthase activity in hepatocyte cultures. *Biochim. Biophys. Acta*, v.629, p.499-509, 1980.

SCHMOLL, D., MIDDLEDITCH, C., CESAR, M., JUNGEMANN, K., HAMP RECHT, B., BURCHELL, A. Gluconeogenic enzymes in rat brain. Abstr.2 Brain Energy and Int. Conf. Metabolism : **Molecules to Man**, Blaubeuren, August, 1995.

SCHURR A., REID K.H., TSENG M.T., EDMONDS H. L. Jr., and RIGOR B.M. A dual chamber for comparative studies using the brain slice preparation. *Biochem. Physiol.* v.32 A, p.701-704, 1985.

SCHURR A., PAYNE R.S., MILLER J.J. and RIGOR B.M. Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation : an in vitro study. *Brain Res.* v.744, p.105-111, 1997.

SHELLEY,H.J.Glycogen reserves and their changes at birth and in anoxia. **Br.Med.Bull.**v.17,p.137-143,1961.

SHEMER,J.,RAIZADA M.K.,MASTERS B.A ,OTA A.,and LE ROITH D. Insuline-like growth factor I receptors in neuronal and glial cells.**J.Biol.Chem.**v.262,p.7693-7699,1987.

SIBSON N.R.,SHEN J.,MASON G.F.,ROTHMAN D.L.,BEHAR K.L.,SCHUMAN R.G. Functional energy metabolism: in vivo <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy evidence for coupling of cerebral glucose consumption and glutamatergic neuronal activity. **Dev.Neurosc.**v.20,p.321-330,1998.

SIVITZ,W.,DESAUTEL,S.,WALKER,P.S. and PESSIN,J.E. Regulation of the glucose transporter in the developing rat brain. **Endocrinology** v.124,p.1875-1880,1989.

SNELL,K. Glucose turnover in the newborn rat. In: *Metabolic Adaptation to Extrauterine Life*,p.81-105.Ed.A.De Meyer Nijhoff, The Hague,1981.

SMART,J.L. and DOBBING,J. Vulnerability of devoloping brain.II.Effects of early nutritional deprillation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research** v.28,p.85-95,1971.

SMITH, Q.R., MOMMA, S., AOYAGI, M. and RAPPAPORT, S.I. Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. **J. Neurochem.**, v.49, p.1651-1658, 1987.

SMITH, S.J. Do astrocytes process neural information? **Prog in Brain Res.**, v.94, p.119-136, 1992.

SOKOLOFF, L. Relationship among local functional activity, energy metabolism and blood flow in the central nervous system. **Fed. Proc.** v.40, p.2311-2316, 1981.

STALMANS, W., BOLLEN, M., and MVUMBI L. Control of glycogen synthesis in health and disease. **Diabetes Metab. Rev.** 3, 127-161, 1987.

STEEN, P.A., MICHENFELDER, J.D., MILDE, J.H. Incomplete versus complete cerebral ischemia: Improved outcome with a minimal blood flow. **Ann. Neurol.**, v.6, p.389-398, 1979.

SWANSON, R.A., YU, A.C.H., CHAN, P.H. and SHARP, F.R. Glutamate increases glycogen content and reduces glucose utilization in primary astrocyte culture. **J. Neurochem.** v.54, p.490-496, 1990.

SWIATEK, K.R., DOMBROWSKI, J.G., Jr. and CHAO, K.L. The metabolism of D- and L-3-hydroxybutirate in developing rat brain. **Biochem. Med.**, v.31, p.332-346, 1984.

SYKOVA E., SVOBODA J., JENDELOVA P. Role of astrocytes in ionic and volume homeostasis in spinal cord during development and injury. **Prog. Brain Res.**, v.94, p.47-56, 1992.

TILDON, J.T., MERRILL, S. and ROEDER, L.M. Differential substrate oxidation by dissociated brain cells and homogenates during development. **Biochemistry Journal** v.216, p.21-25, 1983.

TILDON, J.T. and ROEDER, L.M. Glutamine oxidation by dissociated cells and homogenates of rat brain : kinetics and inhibitor studies. **Journal of Biochemistry** v.42, p.1069-1076, 1984.

TILDON, J.T. and ROEDER, L.M. Transport of 3-hydroxy [3-C 14 ] butyrate by dissociated cells from rat brain. **Am. J. Physiology**, v.255, p.C133-C139, 1988.

TILDON, J.T., McKENNA, M.C., STEVESON, J. and COUTO, R. Transport of L-Lactate by cultured rat brain astrocytes. **Neurochem. Res.**, v.18, p.177-184, 1993.

TSACOPOULOS, M., MERCIER, V.E., PERROTTET, P. and BUCHNER, E. Honeybee retinal glial cells transform glucose and supply the neurons with metabolic substrate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.85, p.8727-8731, 1988.

TSACOPOULOS, M., VEUTHEY, A., SARAVELOS, G., PERROTTET, P. and TSOUPRAS, G. Glial cells transform glucose to alanine with

fuels the neurons in the honeybee retina. **Journal Neurosci.**v.14,p.1339-1351,1994.

TSACOPOULOS ,M. and MAGISTRETTI,P.J. Metabolic coupling between glia and Neurons. **Journal of Neuroscience** v.16,p.877-885,1996.

VAN DE WERVE G. and JEANRENAUD B. Liver glycogen metabolism:an overview.**Diabetes Metab.Rev.**v.3,p.47-78,1987.

VICARIO,C.,ARIZMENDI,C.,MALLOCH,G.,CLARCK,J.B. and MEDINA,J.M. Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain. **Journal of Neurochemistry** v.57,p.1700-1707,1991.

VOLK C.,KEMPSKI B., and KEMPSKI O .S. Glial cells exhibit a specific transport system for lactate.**J.Cereb.Blood Flow Metab.** v.15,p.S572,1995.

VOLK,C.,KEMPSKI,B.,KEMPSKI,O.S. Inhibition of lactate export by quercetin acidifies rat glial cells in vitro.**Neurosci.Lett.**v.223,p.121-124,1997.

WAELSCH,H. and LAJTHA,A. Protein metabolism in the nervous system. **Physiology Review** v.41,p.709-736,1961.

WALZ,M.,MUKERJ,S. Lactate production and release in cultured astrocytes.**Neurosci.Lett.**,v.86,p.296-300,1988.

WARNES,D.M.,R.F.SEAMARK, and F,J,BALLARD. The appearance of gluconeogenesis at birth in sheep : activation of the pathway associated with blood oxygenation. **Biochem.Journal** v.162,p.627-634,1977.

WALZ,W. and MUKERJI S. Simulation of ischemia in cell culture: changes in lactate compartmentation.**Glia** v.3,p.522-528,1990.

WASTERLAIN,C.G. and DWYER,B.E. Brain metabolism during prolonged seizures in neonates. In: **Advances in Neurology**,v.34,p.241-260,1983.

WATANABE,T., RAFF,M.C. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. **Nature**,v.332,p.834-837,1988.

WEBBER,R.J. and EDMOND,J. The in vivo utilization of acetoacetate, D- (-)-3 – hydroxybutirate and glucose for lipid synthesis in brain in the 18- day- old rat. **J.Biol.Chem.**,v.254,p.3912-3920,1979.

WELLS,M.A. and DITTMER,J.C. A comprehensive study of the postnatal changes in the concentration of the lipids of developing rat brain. **Biochemistry** v.6,p.3169-3175,1967.

WELLS, M.A. . Fatty acid metabolism and ketone formation in the suckling rat. **Federation Proc.**, v.44, p.2365-2368, 1985.

WIELAND, O . Glycerol kinase. **Biochem.J.** v.329, p.313-319, 1957.

WIESINGER, H., HAMPRECHT, B., DRINGEN, R. Metabolic pathways for glucose in astrocytes. **Glia**, v.21, p.22-34, 1997.

WILLIANS, D.H., BATES, M.W., PAGE, M.A, and KREBS, H. Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. **Biochem.J.**, v.121, p.41-47, 1971.

WILKIN, G.P., MARRIOT, D.R., CHOLEWINSKI, A .J. Astrocyte heterogeneity. **Trends Neurosci.**, v.13, p.43-46, 1990.

WINICK, M. and NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **Journal of nutrition** v.89, p.300-306, 1966.

WINICK, M. Nutrition and nerve cell growth. **Federation Proceedings** v.29, p.1510-1515, 1970.

WINICK, M., ROSSO, P. and BRASEL, J.A. Nutrition and cell growth. **In: Nutrition and Development.** WINICK, M. ed. John Wiley, N.Y. v.1, p.49-97, 1972.

WOOD, T.L., BERELOWITZ, M., and MCKELLY, J.F. Hormonal feedback regulation of brain IGF I and IGFII gene expression. **Molecular and**

cellular biology of insuline-like growth factors and their receptors. **LE Roith D. and Raizada M.K.,eds.,p.209-217.Plenum Press,N.Y.,1989.**

**WU,J.Y. and ROBERTS,E.Properties of brain L-glutamate descarboxylase:inhibition studies.J.Neurochem.,v.23,p.759-767,1974.**

**YEH,Y.Y.,STREULI,V.L. and ZEE,P. Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rat. Lipids,v.12,p.957-964,1977.**

**YEH,Y.Y. and SHEEHAN,P.M. Preferencial utilization of ketone bodies in the brain and lung of newborn rats.Federation Proc.v.44,p.2352-2358,1985.**

**YUDKOFF,M.,DAIKHIN,Y.,LIN,Z.P.,NISSIM,I.STERN,J. and PLEASURE ,D. Interrelationships of leucine and glutamate metabolism in cultured astrocytes.J.Neurochem.,v.62,p.1192-1202,1994.**

**YUDKOFF,M.,DAIKHIN,Y.,GRUSTEIN,L.,I.,STERN,J.,PLEASURE,D., and NISSIM,I. Astrocyte leucine metabolism: significance of branched-chain amino acid transamination. J.Neurochem.,v.66 , p.378-385,1996.**

**ZAMMIT,V.A. Intrahepatic regulation of ketogenesis. Tibs.,v.6,p.46-49,1981.**

ZHOU, H.F., LUND,R.D. Migration of astrocytes transplanted to the midbrain of neonatal rats. **J. Comp. Neurol.**,v.317, p.145-155, 1992

ZIMMER,D.Z.,MAGNUSON,M.A. Immunohistochemical localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in adult and developing mouse tissues.**J.Histochem.Cytochem.**,v.38,p.171-178,1990.

ZIVIN,J.A. and SNARR,J.F. Glucose and D (- )-3-hydroxybutirate uptake by isolated perfused brain. **J.Appl.Physiol.**v.32,p.664-668,1972.