

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

Kiara França Campos

**AVALIAÇÃO DOS CORPOS CETÔNICOS NO METABOLISMO ENERGÉTICO EM
RATOS MACHOS E FÊMEAS DURANTE O PERÍODO NEONATAL**

Porto Alegre

2024

Kiara França Campos

**AVALIAÇÃO DOS CORPOS CETÔNICOS NO METABOLISMO
ENERGÉTICO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS DURANTE O
PERÍODO NEONATAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Coorientador(a): Prof^ª. Dr. Luz Elena Dúran Carabali

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

França Campos, Kiara
AVALIAÇÃO DOS CORPOS CETÔNICOS NO METABOLISMO
ENERGÉTICO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS DURANTE O PERÍODO
NEONATAL / Kiara França Campos. -- 2024.
137 f.

Orientador: Carlos Alexandre Netto.

Coorientadora: Luz Dúran-Carabali.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Neurodesenvolvimento. 2. Corpos cetônicos. 3.
Substratos energéticos. 4. Dimorfismo sexual. 5.
Neonatos. I. Netto, Carlos Alexandre, orient. II.
Dúran-Carabali, Luz, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto por me acolher desde o primeiro instante em seu grupo de pesquisa, pelo seu voto de confiança, e compartilhamento de conhecimentos. Por sua orientação e mentoria enriquecedoras.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Luz Elena Durán Carabali pelos seus vastos ensinamentos, apoio, planejamento e paciência em todo o mestrado. Aos colegas do Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção, pelo aprendizado, e muitas risadas, o que deixou todo o processo mais leve e possibilitou que a realização do trabalho fosse prazerosa e responsável, em especial ao Diorlon, Andrey, Francielle, Danielli, Djuly, Bruna, Eduarda e Marcel.

À colega de trabalho Dr. Adriana Fernanda K. Vizuete, pela parceria nas análises, compartilhamento de conhecimentos e paciência.

À UFRGS, ao ICBS, ao Departamento de Bioquímica, ao PPG Fisiologia, por possibilitarem o desenvolvimento e a finalização do trabalho.

Ao CNPq pelos recursos oferecidos que permitiram a execução desse trabalho.

Aos meus pais que sempre me apoiaram incondicionalmente e acreditaram em mim até quando eu mesma duvidei.

À minha irmã, amiga e parceira de vida Karem França Campos pelo extremo apoio, confiança, por me manter focada e me sustentar com suas palavras incentivadoras durante todo o período da realização do trabalho.

À Uly e Estéfani, que são o presente que Porto Alegre me deu. Me acompanharam diariamente, me deram suporte e permitiram que toda essa experiência fosse vivenciada de uma maneira mais satisfatória.

À toda minha família que mesmo de longe sempre me mostraram que era capaz.

Muito obrigada a todos, sem vocês este trabalho não seria possível!

Resumo

O sistema nervoso central (SNC) tem a capacidade de alternar a utilização de diferentes substratos energéticos, sendo eles a glicose, corpos cetônicos (CC) e lactato. Em situações hipoglicêmicas, essa alternância evita prejuízos no metabolismo celular e futuros déficits cognitivos, motores, ou até mesmo à morte. Dados da literatura confirmam a existência de diferenças morfológicas, comportamentais, bioquímicas e fisiológicas entre os sexos, indicando uma maior vulnerabilidade para o sexo masculino em relação aos distúrbios do neurodesenvolvimento. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o metabolismo energético, com enfoque na utilização CC, durante o neurodesenvolvimento de animais saudáveis e investigar possíveis respostas sexo-específicas. Para isso, foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, nos dias pós-natais 1, 7, 14, 21 e 60. Foram realizadas, no hipocampo, análises bioquímicas focadas no imunoconteúdo dos transportadores de CC (MCT1, MCT4, MCT2) e glicose (GLUT1 e GLUT3). Além disso, foi feita a dosagem de glicose, lactato e beta-hidroxibutirato (BOHB) no hipocampo, no soro e no líquido cerebrospinal. Após, estimativa da utilização do BOHB como substrato energético, foi medida a atividade da enzima beta-hidroxibutirato desidrogenase (BHD) no fígado e no hipocampo. Para a análise morfológica das células neurais e os seus respectivos transportadores no hipocampo, foi realizada a dupla marcação por imunofluorescência conforme segue: oligodendrócitos com MCT1 e GLUT1, astrócitos com MCT4 e GLUT1, e neurônios com MCT2 e GLUT3. Nossos resultados evidenciam que, até a primeira semana pós-natal, o lactato e o BOHB acumulados durante o período gestacional tardio foram responsáveis por manter o metabolismo energético cerebral. Devido à lactação, os animais no DPN14 utilizaram principalmente o BOHB como substrato, seguidos por uma fase de transição durante o desmame. Além disso, foi confirmado que os animais adultos apresentaram um predomínio glicolítico. Por fim, as fêmeas apresentaram maior imunoconteúdo de MCT2 e GLUT3, o que pode resultar em maior eficiência na captação e utilização dos substratos energéticos, e garantir uma vantagem metabólica, em relação aos machos, frente a insultos cerebrais. Além de confirmar a alternância de substratos durante a maturação cerebral, essas descobertas ressaltam que as fêmeas utilizam de forma mais eficiente as moléculas energéticas. Isso confere vantagens relacionadas ao dimorfismo sexual na prevenção de deficiências metabólicas em diferentes estágios do desenvolvimento cerebral.

Palavras chaves: Neurodesenvolvimento; Corpos cetônicos; Substratos energéticos; Neonatos; Dimorfismo sexual; Hipocampo.

Abstract

The central nervous system (CNS) can alternate the use of different energy substrates, including glucose, ketone bodies (KBs), and lactate. In hypoglycemic situations, this alternation prevents damage to cell metabolism and future cognitive and motor deficits, or even death. Data from the literature confirms the existence of morphological, behavioral, biochemical, and physiological differences between the sexes, indicating that males are more vulnerable to neurodevelopmental disorders. The aim of this study was therefore to evaluate energy metabolism, with a focus on CC utilization, during neurodevelopment in healthy animals and to investigate possible sex-specific responses. To this end, Wistar rats of both sexes were used on postnatal days 1, 7, 14, 21, and 60. Biochemical analyses were carried out in the hippocampus, focusing on the immunocontent of the CC (MCT1, MCT4, MCT2) and glucose (GLUT1 and GLUT3) transporters. In addition, glucose, lactate, and beta-hydroxybutyrate (BOHB) were measured in the hippocampus, serum, and cerebrospinal fluid. After estimating the use of BOHB as an energy substrate, the activity of the enzyme beta-hydroxybutyrate dehydrogenase (BHD) was measured in the liver and hippocampus. For the morphological analysis of the neural cells and their respective transporters in the hippocampus, double immunofluorescence labeling was performed as follows: oligodendrocytes with MCT1 and GLUT1, astrocytes with MCT4 and GLUT1, and neurons with MCT2 and GLUT3. Our results show that, until the first postnatal week, the lactate and BOHB accumulated during the late gestational period were responsible for maintaining cerebral energy metabolism. Due to lactation, the animals at DPN14 mainly used BOHB as a substrate, followed by a transition phase during weaning. In addition, it was confirmed that adult animals showed a glycolytic predominance. Finally, females showed a higher immunocontent of MCT2 and GLUT3, which may result in greater efficiency in the capture and utilization of energy substrates, and ensure a metabolic advantage over males in the face of brain insults. In addition to confirming the alternation of substrates during brain maturation, these findings emphasize that females use energy molecules more efficiently. This confers advantages related to sexual dimorphism in preventing metabolic deficiencies at different stages of brain development.

Keywords: Neurodevelopment; Ketone bodies; Energy substrates; Neonates; Sexual dimorphism; Hippocampus.

Lista de figuras

Figura 1: Produção do BOHB no fígado pela beta-oxidação bem como sua disponibilização para tecidos extra-hepáticos.

Figura 2: Utilização dos substratos e localização dos transportadores de monocarboxilato (MCTs) e de glicose (GLUTs) nas células do sistema nervoso central.

Figura 3: Desenho experimental das análises executadas a fim de avaliar o metabolismo durante o neurodesenvolvimento, ratos Wistar machos e fêmeas.

Figura 4: Imunoconteúdo dos transportador MCT1, MCT2 e MCT4 no hipocampo direito.

Figura 5: Imunoconteúdo de GLUT1 e GLUT3 no hipocampo direito.

Figura 6: Imunoconteúdo de GFAP e S100B pela técnica de ELISA.

Figura 7: Captação de glicose em diferentes períodos do neurodesenvolvimento.

Figura 8: Glicemia ao longo da maturação cerebral.

Figura 9: Concentração de lactato no soro e no líquido cerebrospinal em diferentes períodos pós-natais.

Figura 10: Concentração de BOHB no soro e líquido cerebrospinal no decorrer do desenvolvimento.

Figura 11: Atividade da BHD avaliada pela redução do NAD no fígado e hipocampo.

Figura 12: Imunofluorescência marcador da proteína básica de mielina (MBP) na região do corpo caloso.

Figura 13: Imagens representativas do MBP na região mais superior e inferior do corpo caloso, em cada idade e em ambos os sexos.

Figura 14: Quantificação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) nas regiões hipocampais durante o neurodesenvolvimento.

Figura 15: Quantificação do antígeno nuclear neuronal (NeuN) nas regiões hipocampais durante o neurodesenvolvimento.

Figura 16: Quantificação do MCT1 no corpo caloso.

Figura 17: Imunomarcagem MBP e MCT1.

Figura 18: Imunofluorescência MCT4 nas regiões hipocampais.

Figura 19: Colocalização GFAP e MCT4.

Figura 20: Imunofluorescência MCT2 no hipocampo.

Figura 21: Colocalização de NeuN e MCT2 no hipocampo.

Figura 22: Imunomarcagem GLUT1 no hipocampo.

Figura 23: Colocalização do MBP e GLUT1 no hipocampo.

Figura 24: Imunofluorescência GLUT1 no hipocampo durante o neurodesenvolvimento.

Figura 25: Colocalização de GFAP e GLUT1 no hipocampo.

Figura 26: Intensidade do transportador GLUT3 no hipocampo.

Figura 27: Colocalização de NeuN e GLUT3 no hipocampo.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Metabolismo encefálico	10
1.2 Astrócitos	14
1.3 Oligodendrócitos.....	17
1.4 Dimorfismo Sexual	19
1.5 Justificativa	21
1.6 Hipótese.....	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos gerais	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Aspectos éticos.....	24
3.2 Animais	24
3.3 Delineamento experimental	25
3.4 Western Blotting.....	26
3.5 Ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	28
3.5.1 S100B.....	28
3.5.2 GFAP.....	29
3.6 Captação de Glicose	29
3.7 Dosagens de Glicose, Lactato e Corpos Cetônicos	30
3.8 Atividade enzimática (BHD – β hidroxibutirato desidrogenase)	30
3.9 Análise histológica por imunofluorescência.....	30
3.10 Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS	34
4.1 Os níveis dos transportadores MCT2 e MCT4 aumentam ao longo do neurodesenvolvimento encefálico.....	34
4.2 O transportador de glicose neuronal apresenta uma resposta sexo-específica, estando aumentados em fêmeas	36
.....	37
4.3 Os níveis de GFAP apresentam um aumento progressivo com o decorrer da maturação cerebral, enquanto os níveis S100B permanecem constantes a partir do DPN7	38
4.4 A captação da glicose no hipocampo aumentou no decorrer do neurodesenvolvimento em ambos os sexos.....	40
4.5 A glicemia aumenta progressivamente em relação à maturação cerebral	41
4.6 A quantidade de lactato sérico aumenta logo após o nascimento e também após o desmame no SNC.....	42

4.7 Animais no seu primeiro dia pós-natal exibem uma maior concentração de BOHB sérica, com relação a períodos posteriores.....	44
4.8 A atividade da BHD aumenta no hipocampo a partir do desmame, mas também no primeiro dia pós-natal no fígado	45
4.9 A intensidade de oligodendrócitos no corpo caloso aumentou durante o neurodesenvolvimento	48
4.10 Os astrócitos apresentam um aumento gradual na intensidade no hipocampo ao longo do neurodesenvolvimento	51
4.11 Em DPN1 e em adultos a intensidade neuronal é menor do que nos outros períodos avaliados.....	56
4.12 Os níveis de MCT1 não foram alterados significativamente durante o desenvolvimento cerebral no corpo caloso.....	61
4.13 A colocalização de MBP e MCT1 aumentou durante a maturação cerebral.....	63
4.14 Os níveis do MCT4 permanecem relativamente estáveis ao longo da maturação cerebral	66
4.15 A colocalização de GFAP e MCT4 diminuiu acentuadamente a partir do desmame	68
4.16 A intensidade do MCT2 diminuiu consideravelmente a partir da segunda semana de vida dos neonatos	73
4.17 Houve diminuição acentuada da colocalização entre NeuN e MCT2 a partir do desmame	75
4.18 O GLUT1 aumentou principalmente após o desmame, no corpo caloso, sem alteração no hipocampo.....	81
4.19 Maior colocalização pelos entre os oligodendrócitos e o GLUT1 após o desmame	83
4.20 A quantidade do GLUT1 astrocitário permaneceu constante ao longo do neurodesenvolvimento.....	86
4.21 Apesar da maior quantidade de GLUT1 após o desmame, os filhotes do DPN1 apresentaram maior colocalização	88
4.22 Maior presença de GLUT3 na primeira semana pós-natal.....	93
4. 23 Maior colocalização de NeuN e GLUT3 no primeiro dia pós-natal, seguido de uma queda após o desmame.....	95
5. DISCUSSÃO	104
7. PERSPECTIVAS	118
8. REFERÊNCIAS.....	119

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo encefálico

Durante o neurodesenvolvimento, o cérebro demonstra a capacidade de utilizar diversos substratos como fontes energéticas primárias. O leite materno é predominantemente constituído por ácidos graxos e constitui o principal alimento para bebês até o período de desmame por volta dos 2 anos de idade¹. Os ácidos graxos são convertidos em corpos cetônicos (CC), que são utilizados como substratos energéticos. Em adultos, a glicose emerge como o principal substrato metabólico do sistema nervoso central (SNC), desempenhando um papel crucial em vias metabólicas essenciais, tais como a via das pentoses fosfato, glicólise e por conseguinte, o ciclo do ácido tricarbóxico (TCA, por suas siglas em inglês *tricarboxylic acid cycle*), também conhecido como o ciclo de Krebs²⁻⁵. O consumo de glicose está diretamente relacionado com a quantidade de transportadores disponíveis⁴. No cérebro, encontramos a presença dos transportadores de glicose tipo 1 (GLUT1) e tipo 3 (GLUT3). O primeiro encontra-se principalmente localizado na barreira hematoencefálica, enquanto o GLUT3 é responsável pela de glicose pelos neurônios⁶⁻⁸

Em situações de eventos hipoglicêmicos, como o período logo após o nascimento ou então durante a lactação com uma elevada ingestão de ácidos graxos, as células neurais recorrem a substratos alternativos para sustentar a atividade metabólica, incluindo os corpos cetônicos, lactato, acetoacetato, glutamina e glutamato^{7,9-11}. Este mecanismo revela a notável adaptabilidade metabólica do cérebro diante de diferentes condições fisiológicas.

Os CC, metabólitos empregados pelo cérebro como substrato energético, resultam da oxidação dos ácidos graxos no fígado, diferenciando-se em beta-hidroxibutirato (BHOB) e acetona¹². Sua biossíntese ocorre quando duas moléculas de acetil-CoA se condensam para formar acetoacetil-CoA, o qual, por sua vez, se une a outra molécula

de acetil-CoA, originando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA). Este último é também um intermediário na biossíntese do colesterol. A HMGCoA é posteriormente clivada para liberar uma molécula de acetil-CoA e uma molécula de acetoacetato. Parte do acetoacetato é reduzida a BHOB. Ambos, o acetoacetato e o BHOB são altamente solúveis na corrente sanguínea e prontamente captados pelos tecidos extra-hepáticos ^{13,14}. Nos tecidos-alvo, como o cérebro, o β -hidroxibutirato é oxidado novamente em acetoacetato, que é então convertido em seu éster CoA. Esse éster é clivado para produzir duas moléculas de acetil-CoA, que podem ingressar no TCA para oxidação completa ^{5,15}. Assim, a produção hepática dos CC possibilita a disponibilidade de carbonos dos ácidos graxos em outros tecidos, onde podem ser utilizados para oxidação e geração de ATP ^{13,16,17}, conforme apresentado na Figura 1.

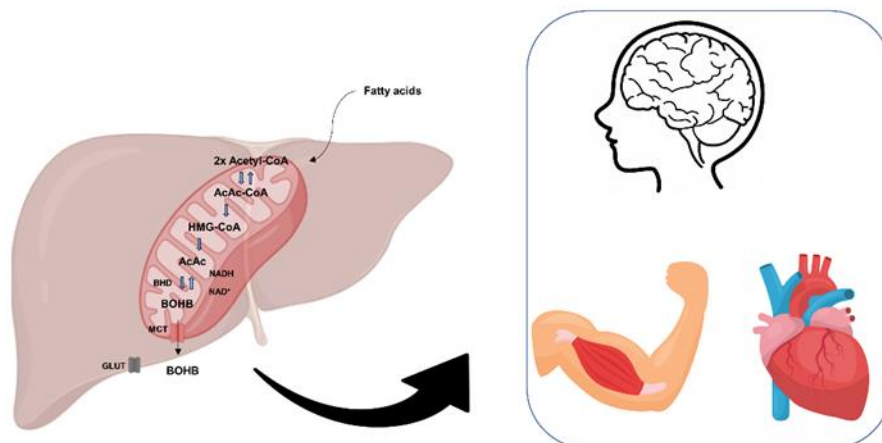


Figura 1: Produção do BHOB no fígado pela beta-oxidação bem como sua disponibilização para tecidos extra-hepáticos. BHD: Beta-hidroxi-butanóide desidrogenase; BHOB: Beta-hidroxi-butanóide; GLUT: Transportador de glicose; MCT: Transportador de monocarboxilato. (Biorender.com com modificações)

Nos tecidos extra-hepáticos, os CC atravessam a membrana celular por meio dos transportadores de monocarboxilato (MCT). Embora a família desses transportadores inclua 14 membros, apenas três deles (MCT1, MCT2 e MCT4) são reconhecidos como próton-dependentes,

catalisando o transporte de lactato, piruvato e CCs ¹⁸⁻²⁰. O MCT1 destaca-se como o membro mais abundante, encontrado em diversos tecidos, incluindo o tecido nervoso. No SNC, o MCT1 é presente em células gliais, como astrócitos e oligodendrócitos, e demonstra habilidade para transportar lactato, piruvato, acetoacetato, BOHB e gama-hidroxi-butírico (GHB) (Figura 2)^{19,21,22}. Além de facilitar o transporte unidirecional dos monocarboxilatos ligados a prótons nas células gliais, o MCT1 pode operar como um permutador, permitindo o transporte bidirecional com a troca de um monocarboxilato por outro, sem movimento de prótons ¹⁹. Similarmente, o MCT2 exibe uma especificidade semelhante de substratos em comparação com o MCT1 e é encontrado no SNC sendo expresso exclusivamente em neurônios, especialmente nas regiões do córtex, hipocampo e cerebelo (Figura 2)²³⁻²⁵. Um segundo transportador de monocarboxilato no cérebro é o MCT4, predominantemente expresso nos astrócitos ^{19,26}. Assim, durante a lactação, o consumo de leite com alto teor lipídico proporciona alta produção de CC, sendo fonte de grande parte da energia necessária para o desenvolvimento cerebral em recém-nascidos ², além de favorecer a economia do uso de glicose, permitindo o uso das mesmas em vias que não podem ser substituídas por cetonas, como a via das pentoses fosfato ¹⁵. Características específicas durante o período neonatal como um maior uso de CC, menor atividade basal do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial, bem como maior eficiência no combate ao estresse oxidativo têm sido apontados como mecanismos que conferem a neuroproteção intrínseca ao encéfalo imaturo ²⁷.

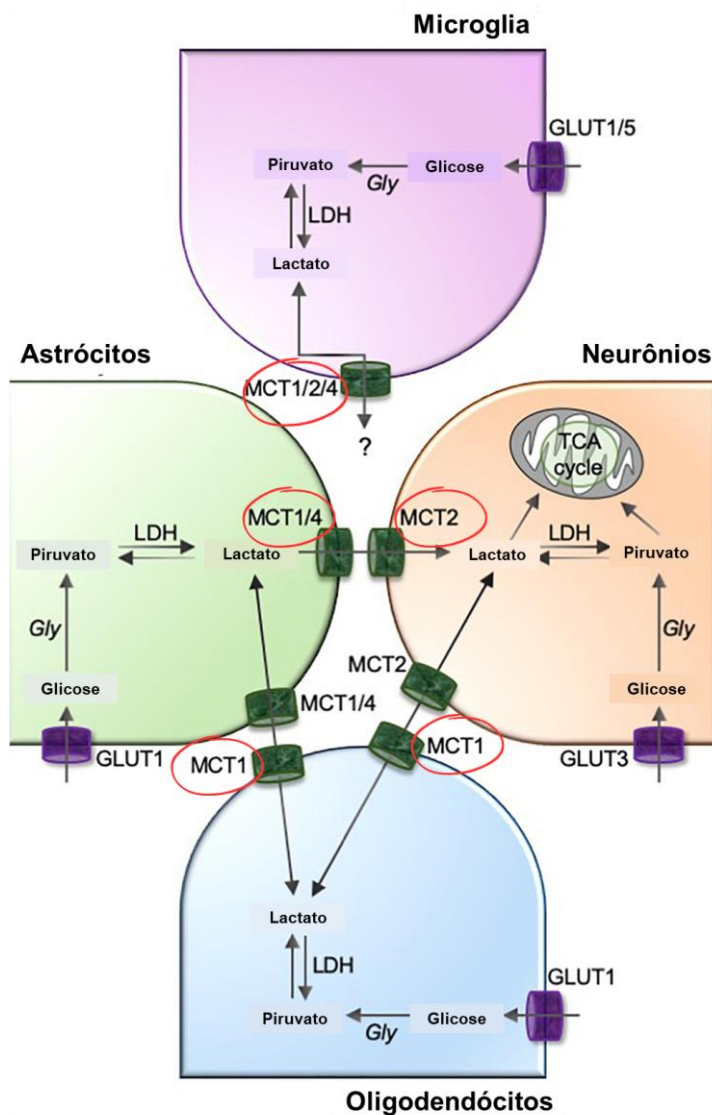


Figura 2: Utilização dos substratos e localização dos transportadores de monocarboxilato (MCTs) e de glicose (GLUTs) nas células do sistema nervoso central (JMK JHA, BM Morrison; 2020 com modificações).

Dada a capacidade dos CC de serem utilizados como substrato energético, estes estão sendo usados como ferramentas terapêuticas no tratamento de patologias como como epilepsia refratária, doença de Parkinson e doença de Alzheimer²⁸⁻³⁰. Nos casos de epilepsia refratária, os CC possuem características anticonvulsivas decorrentes da amplificação dos mensageiros cerebrais e substâncias neuroativas, como o ácido gama-aminobutírico, a agmatina e as monoaminas, o que resulta na redução da hipersensibilidade neuronal. Além disso, influenciam na

regulação do glutamato através da alteração do comportamento dos transportadores vesiculares de glutamato, regulam o potencial da membrana neuronal por meio de canais de potássio sensíveis ao ATP e otimizam o TCA, bem como os sistemas energéticos celulares da cadeia de transporte de elétrons^{31,32}. Na doença de Parkinson, os CC podem melhorar a fosforilação oxidativa mitocondrial no cérebro e reforçar o metabolismo energético nos neurónios centrais e periféricos através da estimulação mecânica da biogênese mitocondrial. Essas alterações podem contribuir para atenuar os déficits da *substantia nigra* e do córtex frontal na atividade do complexo I da cadeia respiratória, que têm sido relatados em pacientes com a doença de Parkinson^{14,33}. No caso da doença de Alzheimer, os CC têm demonstrado diminuir a deposição e formação das placas beta-amiloides removendo sua neurotoxicidade^{34,35}.

Outro substrato utilizado pelo SNC é o lactato, sendo empregado principalmente durante os períodos pré-natal³⁶, e pós-natal precoce com relação às primeiras horas após o nascimento³⁷⁻⁴⁰. Além disso, é utilizado durante o período de lactação, embora em menor proporção⁴¹. Durante o período gestacional, o lactato desempenha um papel crucial como metabólito cerebral. Seu transporte é mediado por transportadores presentes tanto no lado materno quanto no lado fetal, através das membranas placentárias^{39,40,42}. Além disso, os próprios tecidos fetais têm a capacidade de sintetizar lactato devido à elevada atividade da glicólise anaeróbica no feto^{36,42,43} e como resultado, o lactato se acumula na corrente sanguínea³⁶. Nas primeiras 2 horas após o nascimento, o lactato presente na corrente sanguínea é utilizado diretamente pelos tecidos como fonte de carbono e substrato energético, uma vez que ocorre um evento hipoglicêmico transitório logo após o nascimento^{42,43}. Para ser consumido como molécula energética, o lactato compartilha com os CC os mesmos transportadores no tecido encefálico, os MCTs^{19,21,24,26,44}

1.2 Astrócitos

Os astrócitos são um tipo de célula glial especializada e constituem o

tipo mais numeroso no SNC, ultrapassando em mais de cinco vezes o número de neurônios. Os astrócitos se originam de células precursoras neuroepiteliais, compartilhando, portanto, a mesma origem dos neurônios e oligodendrócitos⁴⁵. Em camundongos, a astrogênese inicia por volta do dia embrionário 18 (E18) e termina ao redor do sétimo dia pós-natal (DPN7). No entanto, a maturação astrocitária acontece após o nascimento principalmente entre a segunda e terceira semana pós-natal, e caracteriza-se por mudanças morfológicas, eletrofisiológicas, e na sua conectividade com outros tipos celulares^{46,47}. Além disso, os astrócitos abrangem tanto a substância branca quanto a cinzenta, e desempenham funções complexas e essenciais para a saúde do SNC^{48,49}. Essas células gliais podem ser categorizadas em dois subtipos principais: astrócitos protoplasmáticos e astrócitos fibrosos. Os astrócitos protoplasmáticos predominam na substância cinzenta, apresentando uma morfologia de vários ramos que se estendem para formar numerosos processos finamente ramificados, distribuídos de maneira uniforme e envolvendo sinapses. Em contrapartida, os astrócitos fibrosos são predominantes na substância branca, exibindo processos longos semelhantes a fibras, que entram em contato com os nodos de Ranvier^{49,50}. Ambos os subtipos estabelecem conexões com vasos sanguíneos e formam junções comunicantes entre os processos distais e os astrócitos vizinhos⁵¹.

Os astrócitos desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase cerebral, mas também modulam alterações em seu microambiente, articulando o fluxo sanguíneo decorrente da liberação de óxido nítrico ou ácido araquidônico, e respondendo aos neurotransmissores com aumentos transitórios nos níveis intracelulares de cálcio⁵². Esses sinais de cálcio podem desencadear a liberação de moléculas neuroativas pelos astrócitos, conhecidas como gliotransmissores, tais como glutamato, D-serina ou trifosfato de adenosina (ATP), influenciando, por sua vez, a atividade sináptica e a excitabilidade neuronal⁵³. Ademais, os astrócitos desempenham um papel importante na proteção neuronal contra a excitotoxicidade, realizando a recaptação do neurotransmissor glutamato por meio dos transportadores GLT1 (transportador de glutamato 1) e

GLAST (Transportador glutamato aspartato), assegurando desta forma baixas concentrações de glutamato extracelular sináptico^{54,55}. Os astrócitos também possui alta variedade de mecanismos para eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS).

Apesar dos neurônios conseguirem captar glicose diretamente do espaço extracelular, os astrócitos desempenham um papel imprescindível no acoplamento entre a atividade neuronal e a captação de glicose no cérebro. Isso ocorre através de um mecanismo conhecido como lançadeira de lactato astrócito-neurônio (ANLS, da sigla em inglês astrocyte–neuron lactate shuttle) ⁵⁶. No ANLS, a captação de glutamato na fenda sináptica pelos astrócitos, estimula a glicólise, ou então a captação de glicose diretamente da circulação sistêmica através do GLUT1 ^{3,7}. O lactato produzido pelos astrócitos é liberado no espaço extracelular, e por conseguinte, absorvido pelos neurônios através dos MCT2 ^{57,58}. Uma vez nos neurônios, o lactato pode ser utilizado como substrato energético pela sua conversão em piruvato por intermédio da ação da lactato desidrogenase e com subsequente oxidação no TCA mitocondrial ^{7,59}.

Em resposta a distúrbios neurológicos, os astrócitos assumem um fenótipo reativo, podendo manifestar características neuroprotetoras ou neurotóxicas dependendo da natureza do insulto ou da dificuldade homeostática enfrentada ⁶⁰. Essas células gliais reativas distinguem-se das formas maduras por serem mais proliferativas, contribuírem para a formação de cicatrizes gliais, reduzirem a criação de sinapses e junções comunicantes, alterarem a atividade neuronal, aumentarem a infiltração de células imunes e modificarem a sinalização de cálcio, bem como a captação e recaptação de neurotransmissores ^{60–63}.

Como é amplamente conhecido, os astrócitos desempenham um papel ativo em muitos aspectos fisiológicos e patológicos do SNC ⁶⁴. Essas células gliais possuem filamentos intermediários que constituem o citoesqueleto celular, sendo, portanto, uma parte fundamental da estrutura celular^{60,64,65}. A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é um biomarcador

amplamente utilizado para a identificação astrocitária, embora também seja encontrada em outras células não gliais, como células de Schwann não mielinizantes, células testiculares de Leydig e condrócitos⁶⁶. Aumento nos níveis de GFAP tem sido associado a processos migratórios, motilidade celular, ancoragem do transportador de glutamato GLAST/EAAT1 na membrana e mitose^{64,67}. Outro marcador do citoesqueleto é a S100B, um biomarcador composto por duas subunidades β , e pertencente a uma família multigênica de proteínas de ligação ao cálcio. A S100B tem sido implicada na regulação da montagem dos microtúbulos e filamentos intermediários do tipo III, em algumas atividades enzimáticas e na proliferação celular, estando atualmente associada a estudos sobre certos tipos de câncer⁶⁸⁻⁷¹. Durante o evento da astrogliose, os níveis de S100B estão aumentados, e tem sido associado à fisiopatologia de doenças cerebrais degenerativas e infecciosas/inflamatórias^{65,70,71}.

1.3 Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos (OL) desempenham um papel essencial na síntese e manutenção da bainha de mielina no SNC, além de auxiliar no suporte da integridade axonal⁷². Essa função vital não apenas facilita a condução rápida e saltatória do impulso nervoso, mas também assegura a sobrevivência axonal⁷³. Durante seu ciclo de desenvolvimento, os progenitores dos OL passam por fases controladas de migração, proliferação e diferenciação. Essas células respondem a uma variedade de fatores de crescimento, promovendo alterações significativas em sua arquitetura celular. Esse processo intrincado culmina na formação da bainha de mielina, caracterizada pela sua propriedade isolante atribuída ao elevado teor lipídico, além de desempenhar um papel fundamental no apoio à integridade e eficiência do sistema nervoso⁷⁴⁻⁷⁶. Um componente essencial dessa constituição citoplasmática mielínica é a proteína básica mielínica (MBP). A MBP desempenha um papel imprescindível na compactação da bainha de mielina, sendo que mutações em seu gene podem resultar em desmielinização severa, comprometendo a funcionalidade do sistema nervoso^{75,76}.

A visão sobre os OL, que antes eram considerados apenas fornecedores de bainhas de mielina isolantes para a propagação de impulsos axonais, tem mudado radicalmente. A mielina constitui um compartimento dinâmico no cérebro maduro que utiliza metabólitos ricos em energia e proteínas de transferência, para manter a integridade funcional dos axônios ⁷². Assim, qualquer perda da integridade da mielina torna-se um fator de risco para uma neurodegeneração irreversível. Além disso, estudos relatam a possível existência de uma “sinapse axo-mielínica”, em que o lactato produzido nos OL poderia ser transportado diretamente aos neurônios, auxiliando na sustentação metabólica neuronal ^{77,78}.

Além disso, os OL são altamente suscetíveis a injúrias mediadas por citotoxicidade, privação de fatores tróficos, estresse oxidativo e ativação de vias apoptóticas ⁷⁹. Quando ocorre degeneração dos OL e danos à mielina, surgem as doenças desmielinizantes, como a esclerose múltipla. Estudos recentes destacam o papel crucial dos OL e da mielina que produzem, especialmente durante períodos de estresse, influenciando o comportamento e a plasticidade dependente da experiência ⁸⁰⁻⁸². A interação complexa entre sinalização hormonal e atividade neuronal pode induzir a proliferação de células precursoras de OL e remodelação da mielina em regiões específicas, como o córtex pré-motor, córtex somatossensorial e corpo caloso ^{74,81}. Assim, a modulação dessa plasticidade, seja por inibição ou aumento, impacta diretamente comportamentos motores, consolidação da memória espacial e aprendizagem motora, sugerindo que a plasticidade da mielina em adultos é crucial para uma sinaptogênese adequada ^{83,84}.

Tendo em mente os críticos eventos do neurodesenvolvimento e o importante papel dos OL em manter a funcionalidade neuronal, os processos de mielinização acontecem após o nascimento em roedores, tendo o ápice entre a segunda e terceira semana pós-natal, convergente ao período lactacional ⁸⁵. Assim, semelhante às outras células gliais e

neurônios, os OL possuem toda a maquinaria necessária para a metabolização dos CC, sendo capazes a utilizá-los como precursores para a síntese de lipídios, como os ácidos graxos da fosfatidilcolina exibindo o nível mais alto de síntese, seguidos pelo colesterol e depois pelos ácidos graxos da fosfatidiletanolamina⁸⁶. Por conseguinte, em condições hipoglicêmicas, sendo elas patológicas ou fisiológicas, o BHOB poderia manter o metabolismo oligodendrítico e manter a integridade do axônio e da bainha de mielina necessária para a condução dos impulsos nervosos no SNC.

1.4 Dimorfismo Sexual

O dimorfismo sexual no SNC tem sido objeto de estudo, devido às divergências morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, patológicas e comportamentais entre machos e fêmeas^{87,88}. O estudo das diferenças entre os sexos começou no início do século XX, mediante a observação de que os cérebros dos machos eram maiores e mais pesados quando comparados às fêmeas⁸⁹.

O hipocampo é uma estrutura cerebral no sistema límbico que desempenha uma função essencial no novo aprendizado, na formação e codificação da memória, mas também está relacionado com a navegação espacial⁹⁰. Atualmente, o hipocampo é uma das regiões amplamente estudada referente às características sexualmente dimórficas, devido à presença de neurônios concentradores de esteróides gonadais⁹¹. A diferenças sexuais observadas nesta estrutura cerebral relacionam-se às arborização dendrítica das células piramidais na região de CA3 e do giro denteado, como também à capacidade de brotamento axonal das eferências hipocampais e ao número de células do giro dentado, sendo até duas vezes mais numerosas em ratos machos do que nas fêmeas^{92,93}.

Por outro lado, no processo de diferenciação sexual das estruturas do SNC, as células gliais podem influenciar as respostas frente a insultos cerebrais, contribuindo nas distintas manifestações patológicas entre machos e fêmeas. Conforme evidenciado em camundongos B6CBA, o

dimorfismo sexual se estende à proliferação e à abundância de OL, com as fêmeas apresentando maior proliferação e renovação celular. Esses achados indicam uma vida útil mais curta e uma maior taxa de renovação em comparação com os machos, o que sugere uma maior resistência à isquemia e estresse oxidativo por parte das fêmeas⁹⁴⁻⁹⁶. Curiosamente, observou-se uma convergência gradual do perfil dos OL em ratos machos castrados em direção ao perfil das fêmeas⁹⁷. Esse fenômeno sugere uma função reguladora dos hormônios esteróides exógenos, provavelmente a testosterona, na formação do número de OL⁹⁷.

Diversos estudos têm demonstrado respostas sexo-específicas em relação ao número, expressão gênica, morfologia e função dos astrócitos em diferentes regiões cerebrais⁹⁸⁻¹⁰⁰. Sendo assim, as fêmeas apresentam uma maior expressão da GFAP nos astrócitos da amígdala medial do que os machos¹⁰¹, bem como maior resistência à privação de oxigênio – glicose. Em concordância, nas fêmeas, os astrócitos apresentam uma melhor função mitocondrial imediatamente após a hipóxia-isquemia neonatal *in vivo*, quando comparado aos machos¹⁰². Entretanto, os machos apresentam uma recuperação mais rápida após o insulto neonatal¹⁰².

Desde o nascimento e durante toda a vida, os ratos machos apresentam uma maior prevalência de astrócitos estrelados caracterizados por processos mais longos e maior ramificação em comparação com as fêmeas¹⁰³. No entanto, a administração de andrógenos a ratas fêmeas no nascimento reverte essas diferenças de sexo nos astrócitos, indicando um mecanismo dependente de hormônio^{104,105}. Interessantemente, estudos sobre astrócitos em ratos no E14 revelaram diferenças de sexo mesmo antes do pico de testosterona fetal, sugerindo mecanismos independentes da influência hormonal¹⁰⁶.

A literatura aponta que a divergência sexual influencia não apenas a função cerebral, mas também a comunicação entre o cérebro e os sistemas corporais, como a interação neural com o sistema imune frente à percepção de dor, na qual a hipersensibilidade à dor em fêmeas não envolve a

contribuição da micróglia como nos machos, e sim de células imunes como os linfócitos T¹⁰⁷. Além disso, estudos mostram que as fêmeas apresentam maiores déficits de memória e mecanismos de morte celular estão relacionados principalmente à via dependente das caspases, enquanto os machos são mais susceptíveis ao estresse oxidativo e à morte celular por necrose^{107,108}. Em humanos também mostram que a incidência da prematuridade, anóxia, hemorragia intraventricular e morte por prematuridade são mais comuns em homens, bem como a presença de patologias como retardo mental e paralisia cerebral^{93,109}. Nesse sentido o sexo masculino tanto em estudos pré-clínicos e clínicos apresenta uma maior vulnerabilidade em relação ao sexo feminino¹¹⁰.

Apesar das evidências sobre as respostas distintas entre os sexos a fatores extrínsecos, como estímulos ambientais, administração de fármacos, nutrição, entre outros, as diferenças entre machos e fêmeas no que se refere ao metabolismo encefálico durante o neurodesenvolvimento não estão totalmente esclarecidas. Em um estudo realizado por Flórez-Vargas e colaboradores (2016) foram analisados 15.311 trabalhos usando camundongos, foi constatado que apenas 47% dos trabalhos levam em consideração o sexo e a idade, e 34% dos artigos analisados não informaram o sexo dos animais¹¹¹. Portanto, torna-se imprescindível obter informações sobre a influência do sexo tanto em condições fisiológicas como em diferentes modelos de lesão encefálica, visto que mecanismos fisiopatológicos distintos necessitam de estratégias diferenciadas.

1.5 Justificativa

Durante o período pós-natal, os CC são os principais substratos para o metabolismo energético cerebral; em contrapartida, em adultos, o principal substrato é a glicose. Os astrócitos conseguem sintetizar CC e lactato, e utilizá-los como fontes de energia para o sustentar o metabolismo das células neurais. Por outro lado, supõe-se que certos pontos da via de oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa (CC) podem apresentar características dimórficas, somando-se às diferenças bioquímicas,

morfológicas, comportamentais e fisiológicas conhecidas entre machos e fêmeas. No entanto, ainda não está completamente esclarecido como o metabolismo energético é afetado no decorrer da maturação cerebral. Portanto, considerar uma resposta específica ao sexo durante os processos de maturação cerebral em neonatos é primordial para o entendimento e o tratamento de insultos metabólicos durante o neurodesenvolvimento.

1.6 Hipótese

A hipótese do presente trabalho é que o metabolismo dos corpos cetônicos apresenta características dimórficas ao longo da maturação cerebral no período pós-natal, e isto é um fator relevante na maior vulnerabilidade de animais machos a desafios metabólicos em períodos críticos do neurodesenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o metabolismo energético de ratos machos e fêmeas, em diferentes estágios de maturidade cerebral durante o período pós-natal, tendo como ênfase a utilização dos corpos cetônicos e uma possível resposta sexo-específica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o imunoconteúdo dos transportadores de corpos cetônicos, MCT1, MCT2 e MCT4, no hipocampo, em diferentes períodos do neurodesenvolvimento, em machos e fêmeas, por meio da técnica de *Western blotting*;
- Avaliar o imunoconteúdo dos transportadores de glicose GLUT1, GLUT3, pela técnica de *Western blotting*, a fim de estabelecer possíveis diferenças no consumo de glicose ao longo do desenvolvimento tanto em machos como em fêmeas;
- Determinar a atividade astrocitária no hipocampo em animais machos e fêmeas, durante o neurodesenvolvimento, por intermédio da verificação dos níveis de GFAP e S100B, através das técnicas de ELISA e imunofluorescência;
- Dosar os níveis de CC e lactato presentes no líquido cérebro espinal e soro, através da técnica de espectrometria, ao longo do desenvolvimento cerebral em ambos os sexos;
- Verificar os níveis de captação de glicose no hipocampo, a fim de estimar a quantidade de glicose usada pelas células neurais em relação à quantidade sistêmica durante o neurodesenvolvimento, em ambos os sexos;

- Mensurar a atividade da enzima BHD no hipocampo e fígado, no intuito de relacionar a atividade da mesma em ambos os órgãos durante a maturação cerebral, em ambos os sexos;
- Determinar a quantidade de transportadores GLUT1, GLUT3, MCT1, MCT4 e MCT2 presente em suas respectivas células neurais, nas regiões CA1, CA3, hilo e giro denteado, do hipocampo, por intermédio da técnica de imunofluorescência durante o neurodesenvolvimento, em ambos os sexos;

3. Materiais e Métodos

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução normativa nº 37, de 1 de fevereiro de 2018 e a resolução normativa nº 57, de 06 de dezembro de 2022 do CONCEA e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011)* do *National Research Council of the National Academies*. Todos os cuidados necessários e os protocolos experimentais utilizados neste projeto foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número 43309.

3.2 Animais

Foram utilizadas 24 ninhadas de ratos Wistar contendo um número de 8 filhotes por mãe, sendo padronizado 4 fêmeas e 4 machos por ninhada. Também foram usados animais adultos DPN60 (machos e fêmeas) de outras ninhadas como grupo controle ao longo dos experimentos. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica - UFRGS, Porto Alegre, RS. Os filhotes foram mantidos com suas mães em caixas padrão com dimensões 41 cm (comprimento) x 34

cm (largura) x 17,8 cm (altura) cm devidamente identificadas de acordo com a Resolução Normativa CONCEA Nº 15, de 2013, em cama de maravalha de pinus selecionada e autoclavada e em ciclos de 12h claro/escuro em salas climatizadas ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com alimentação padrão e água *ad libitum*. A troca da maravalha foi realizada pelos funcionários do Biotério do Departamento de Bioquímica.

Os animais foram retirados do setor de reprodução a partir do DPN1. Cada ninhada (n=8) foi composta por filhotes de ambos os sexos, mantendo uma proporção 1:1, nascidos de 4 mães distintas, para minimizar o efeito ninhada. Algumas ninhadas foram mantidas apenas no DPN1, e outras até o DPN7, DPN14 ou DPN21. Animais de cada período pós-natal, foram profundamente anestesiados com isoflurano inalatório até a perda de reflexos e ausência de sinais de dor e consciência. Foi coletado o líquido cefalorraquidiano e o soro dos animais e em seguida foram decapitados com o auxílio de uma tesoura cirúrgica (filhotes) ou guilhotina (adultos DPN60). Após a utilização dos filhotes para as diversas análises, as ratas adultas fêmeas (progenitoras) foram anestesiadas profundamente com isoflurano inalatório e submetidas à eutanásia por decapitação. As mesmas não foram usadas como grupo controle devido às possíveis alterações metabólicas induzidas pela gestação.

3.3 Delineamento experimental

Os experimentos foram divididos em três etapas de análises (Figura 3). O primeiro bloco previu análises bioquímicas focadas na avaliação do conteúdo protéico dos de monocarboxilato e de glicose, mas também dos marcadores astrocitários GFAP e S100B. No segundo momento, foram feitas análises para mensurar a quantidade dos substratos metabólicos sistemicamente como também presentes no SNC, além da atividade enzimática da BHD no fígado e hipocampo. Uma terceira coorte de animais foi usada para análises morfológicas nas regiões hipocampais e corpo caloso, para uma análise detalhada da colocalização dos transportadores com suas respectivas células neurais.

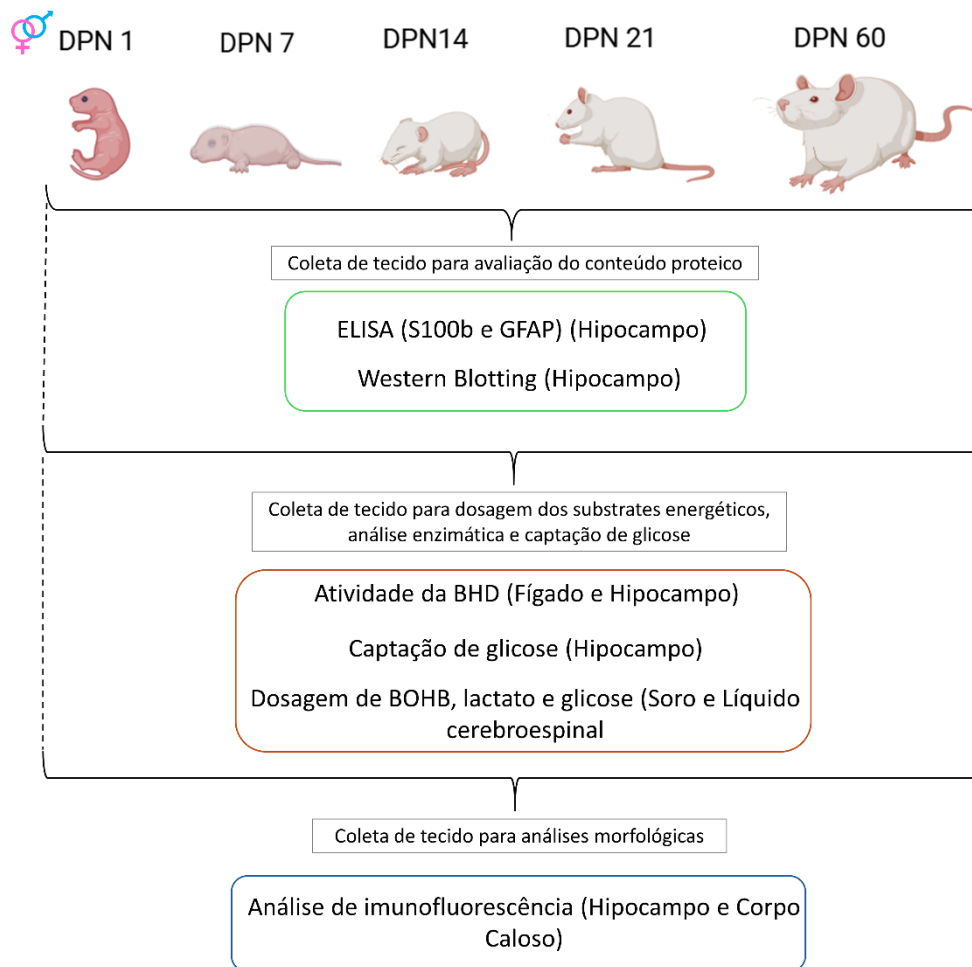


Figura 3: Desenho experimental das análises executadas a fim de avaliar o metabolismo durante o neurodesenvolvimento, ratos Wistar machos e fêmeas.

3.4 Western Blotting

A técnica de Western blotting foi usada para quantificar o conteúdo proteico dos biomarcadores de interesse (MCT1, MCT2, MCT4, GLUT1 e GLUT3) (Figura 3). Para isso, os encéfalos foram rapidamente removidos e ambos os hipocampos foram dissecados e armazenados a -80°C até o processamento, sendo hemisfério direito utilizado na análise de interesse, em todos os animais. A homogeneização foi realizada em tampão HEPES 10 mM e coquetel de inibidor de protease a 1% (Cat. No. 11.697.498.001, Roche, Alemanha) em pH 7,9. Foi adicionado ao tampão, detergente não iônico (NP40 1%, Cat. No. 9016-45-9; Sigma-Aldrich) para romper a

estrutura da membrana plasmática (Seddon et al., 2004) e detergente de ácido biliar iônico em baixa concentração (desoxicolato de sódio 0,25%, Cat. No. D6750; SigmaAldrich) para facilitar a extração de proteínas transmembrana, a solubilização e a estabilidade em solução aquosa (Zhou et al., 2006).

As amostras lisadas foram submetidas à centrifugação refrigerada a 4°C por 10 minutos a uma força de 1000 x g, a fim de obter proteínas celulares presentes no sobrenadante. A determinação da concentração proteica por amostra foi determinada utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Cat. No. 23225; Thermo-Fisher Scientific). A partir disso, as amostras proteicas foram submetidas aos processos de desnaturação, redução e preparo para eletroforese em gel de poliacrilamida gradiente de 4% a 12% (Cat. No. NP0323BOX; Thermo-Fisher Scientific), juntamente com um marcador de peso molecular de 12 a 225 kDa (Cat. No. RPN800E; GE 37 Healthcare). Após a transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose, as membranas foram bloqueadas com solução de leite desnatado em pó 5% em salina tamponada com Tris contendo tween 20 (T-TBS) por 2 horas e lavadas com T-TBS 0,1 M (contendo 0,05% Triton X-100). Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários: anti-MCT1 (Cat No. PA576687, 1:1000, Invitrogen), anti-MCT2 (Cat No. PA576603, 1:1000, Invitrogen), anti-MCT4 (Cat No. BS2698R, 1:1000, Bioss), anti-GLUT1 (Cat No. PA146152, 1:500, Invitrogen), anti-GLUT3 (Cat No. MA532697, 1:1000, Thermofisher) e anti-Beta actina (Cat No. MA515739, 1:500, Thermofisher). Após a incubação dos anticorpos primários anti-MCT1, anti-MCT2 e anti-MCT4, os blots foram incubados por 2 horas a 23 ± 2°C com o anticorpo secundário acoplado à peroxidase correspondente. Os sinais de quimioluminescência foram detectados com o uso do sistema Image Quant LAS4010 (GE Healthcare) e o kit Western Pierce™ ECL (Cat No. 32.106; ThermoFisher). Para os transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3, foram usados anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 555 (anti-camundongo ou anti-coelho) (Cat. No. A21422 ou Cat. No. A-21428, 1:1000; ThermoFisher) e Alexa Fluor 488 anti-coelho (Cat. No. A11001 ou A11008, 1:1000;

ThermoFisher) por 2 horas a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Os resultados foram normalizados pela expressão de beta actina e expressos em porcentagem com relação ao grupo controle (DPN60). As imagens adquiridas foram analisadas por densitometria óptica usando o software Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences). Para esta análise foi utilizado um número de 6-8 animais por grupo).

3.5 Ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

O conteúdo protéico de GFAP e S100B foi quantificado por intermédio do teste de ELISA, nos DPNs descritos previamente (Figura 3). Os animais foram anestesiados profundamente com isoflurano e submetidos à eutanásia por decapitação. Posteriormente, os encéfalos foram removidos e foi realizada a dissecação do hipocampo esquerdo, seguido de crioproteção e armazenamento para posterior processamento. A técnica de Elisa foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O número de animais utilizados para essa técnica foi de 6-8 animais por grupo.

3.5.1 S100B

Para a análise da proteína S100B, as placas foram previamente revestidas durante a noite, a 4°C , com $100\mu\text{L}$ de uma diluição 1:1000 de anti-S100B monoclonal em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 9,5). As placas foram lavadas com $200\mu\text{L}$ de tampão de lavagem (0,1% BSA em PBS contendo 0,05% Tween-20). A solução de bloqueio (2% BSA, $150\mu\text{L}$) foi incubada por 1h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com $200\mu\text{L}$ de tampão de lavagem. Em seguida, $50\mu\text{L}$ de tampão barbital 60 mM ou Tris 50 mM (pH 8,6) juntamente com $50\mu\text{L}$ de amostras (diluídas com PBS contendo 0,2% BSA) ou curva padrão (intervalo de 0,0019 a 1ng/mL) foram incubadas por 2 h a 37°C em uma placa de aquecimento. Posteriormente, as placas foram lavadas com $200\mu\text{L}$ de tampão de lavagem. O anticorpo policlonal anti-S100B, diluído 1/5000 em 0,5% BSA ($100\mu\text{L}$), foi incubado por 30 min a 37°C . Novamente as placas foram lavadas por três vezes com $200\mu\text{L}$ de tampão de lavagem. Em seguida, $100\mu\text{L}$ de conjugado com peroxidase anti-coelho diluído 1:5000 em BSA a 0,5% foi incubado por 30 min a 37°C . Foram executadas

lavagens nas placas com 200µL de tampão de lavagem e uma vez com 200µL de PBS. Finalmente, 200 µL de uma solução fresca de Sigma Fast OPD foi incubada no escuro, por 30 min à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 492nm em um leitor de placas de microtitulação (Tecan-Spectra, Japan). Os dados foram expressos em ng/mg de proteína.

3.5.2 GFAP

Placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram revestidas por 12-18h com as amostras diluídas (TBS) de hipocampo. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com 0,05% Tween-20/TBS e bloqueadas com albumina de soro bovino 2% (ou 5% de leite em pó desnatado) por 2 h à temperatura ambiente. Após o bloqueio, o anticorpo anti-GFAP (anticorpo policlonal anti-GFAP coelho, diluído 1:1000 em 0,5% albumina/TBS, foi incubado por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem com Tween-20 a 0,05%/TBS, uma segunda incubação com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase, diluído 1:1000, foi realizada por 1 h em temperatura ambiente. Depois de duas lavagens com Tween-20 a 0,05%/TBS e uma com TBS, 0,2 mL de substrato de peroxidase (Sigma Fast OPD) foi adicionado e incubado por 30 min no escuro. A reação foi então interrompida pela adição de 50 µL 3 N HCl e a absorbância foi lida em um leitor de placas de microtitulação (Tecan-Spectra). Os dados foram expressos em ng/mg de proteína.

3.6 Captação de Glicose

As fatias de hipocampo foram incubadas a 35°C em HBSS. O ensaio foi iniciado com a adição de 0,1 µCi/poço de D-[3-3H] glicose e a incubação foi interrompida após 30 minutos, removendo o meio e lavando as fatias duas vezes com HBSS gelado. O tecido do hipocampo foi então lisado numa solução de NaOH 0,5M, e a radioatividade foi medida utilizando um contador de cintilação. A captação de glicose foi calculada subtraindo a captação não específica, obtida pelo inibidor do transporte de glicose (citocalasina B (25 µM)), da captação total. Este ensaio de captação de glicose corresponde a uma medida indireta da glicose intracelular e dos

metabólitos derivados. A radioatividade foi medida em um contador de cintilação e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína/min. Para essa técnica foram usados 8 animais por grupos.

3.7 Dosagens de Glicose, Lactato e Corpos Cetônicos

No intuito de analisar a quantidade dos principais metabólitos usados durante o período neonatal, foi coletado o plasma sanguíneo dos animais para a análise de glicose, lactato e CC. adicionalmente foi feita a coleta do líquido cefalorraquidiano para a dosagem de lactato e CC (Figura 3). Assim, as dosagens de lactato e glicose foram realizadas utilizando os kits K084-2 e K082-3, respectivamente (BioClin, Brasil), conforme as indicações do fabricante. De forma semelhante, a dosagem dos CC, mais especificamente o Beta-hidroxibutirato foi feita usando o kit D-3-Hydroxybutyrate Ranbut (RB1008 – Randox, Inglaterra), seguindo as instruções do fabricante. O número de animais utilizados foi de 6 animais neonatos para cada janela temporal e 8 animais adultos de ambos os sexos.

3.8 Atividade enzimática (BHD – β hidroxibutirato desidrogenase)

A atividade da BHD foi avaliada seguindo o protocolo modificado, conforme descrito por¹³¹. O hipocampo e o tecido hepático foram homogeneizados em tampão de lise contendo em mM (0,32 sacarose, 10 Tris-HCl, 1 EGTA), seguido de centrifugação a 800 x g por 20 minutos a 4°C. Depois, o sobrenadante foi incubado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo em mM (100 NAD⁺, 0,5 EDTA, 300 DTT, 4M D- β -hidroxibutirato sal) por 30 minutos a 37 °C. A atividade da enzima foi medida como a taxa de redução de NAD com D- β -hidroxibutirato como substrato a 340 nm. Os dados são expressos em mM/min/mg de proteína. O número de animais utilizados foi de 8-9 animais por grupo.

3.9 Análise histológica por imunofluorescência

A fim de realizar a análise morfológica do tecido encefálico (Figura 3), os animais foram profundamente anestesiados com isoflurano inalatório (0,5 mL) e, então, submetidos à toracotomia para a perfusão transcardíaca com 100-200mL de solução salina (NaCl 0,9%) para lavagem vascular e, posteriormente, com 100-200mL de solução de PFA 4% com tampão fosfato 0,2M e pH na faixa de 7,4 para a fixação tecidual. Os encéfalos foram coletados e mantidos em solução fixadora de PFA 4% por 24h. Após esse tempo, os encéfalos foram destinados ao processamento histológico para a inclusão em parafina. Para isso, os encéfalos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100% I e 100% II). Posteriormente, foram submersos em xilol (xilol I e xilol II) e finalmente impregnados por parafina líquida (parafina I, II e III) a 60°C. Os encéfalos ficaram aptos à microtomia após o resfriamento e endurecimento da parafina. Através do micrótomo de rotação (Leica RM-2125), foram realizadas secções coronais (Bregma 4.7 mm a - 8.5 mm; Paxinos e Watson, 1998) de 10 µm com intervalo de 70 µm entre os cortes e colocados sobre lâminas histológicas previamente gelatinizadas.

Para a imunomarcção neuronal, oligodendrítica e astrocitária, as lâminas foram desparafinizadas com xilol I e xilol II por 5 min. Posteriormente, foram feitas lavagens com PBS por 10 min. Por conseguinte, as fatias foram incubadas em tampão citrato (0,1 mol ácido cítrico anidro e 0,1 mol sal citrato de sódio; PH=6.0) durante 2h. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, permeabilizadas com 0,25% de Tritonx-100 em PBS por 10 minutos, seguido por bloqueios com soro de cabra a 3% durante 45 min (Cat. N°. A8717, 1:250; Sigma-Aldrich). As lâminas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários de interesse: anti-MCT1 (Cat. N°. PA576687, 1:300; Invitrogen), anti-MCT2 (Cat. N°. PA576603, 1:350; Invitrogen), anti-MCT4 (Cat. N°. BS2698R, 1:350; Bioss), anti-NeuN (Cat. N°. MA533103, Termo-Fisher), anti-GFAP (Cat. N°. MA512023, 1:350; Termo-Fisher), anti-MBP (Cat. N°. 808401, 1:250; Biolegend), anti-GLUT1 (Cat. N°. PA146152, Invitrogen) e anti-GLUT3 (MA532697; Termo-Fisher). No dia seguinte, após cinco lavagens com PBS, as fatias foram incubadas por 2h à temperatura ambiente (23°C)

com anticorpos secundários conjugados com Alexa fluor 555 anti-coelho (Cat. Nº. A-21428, 1:2000; ThermoFisher) ou Alexa fluor 488 anti-camundongo (Cat. No. A-11001, 1:2000; Thermo-Fisher). As fatias foram montadas usando Fluoroshield com 4',6'-diamino-2-fenilindol-DAPI (Cat. Nº. 10236276001; Sigma- Aldrich). A imunofluorescência da região CA1, CA3, hilo, giro denteado e corpo caloso do hipocampo foram fotografadas no microscópio Nikon E600. Foram analisadas 3 fatias por animal, utilizando uma região de interesse (ROI) por fatia. A intensidade de fluorescência tanto dos transportadores quanto dos tipos celulares foi quantificada usando o software NIH ImageJ (versão 1.8.0_112), sendo a média por cada animal utilizada na análise estatística. Além disso, foi realizada a análise de colocalização dos biomarcadores de interesse de forma manual em neurônios e astrócitos com seus respectivos transportadores, mas também pela intensidade de fluorescência no caso dos oligodendrócitos com seus transportadores, pelo software NIH ImageJ (versão 1.8.0_112). Para esta técnica foram utilizados entre 4 - 6 animais por cada janela temporal e sexo.

3.10 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS versão 21.0 (IBM SPSS Statistics). A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Assim, os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas, enquanto os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do post hoc de Tukey para comparar o principal efeito da maturação cerebral. Dado a possível influência do sexo no desenvolvimento, as análises estatísticas foram refeitas usando o Modelo linear generalizado (GZLM) considerando dois fatores fixos, o sexo e a idade (DPN1, DPN7, DPN14, DPN21, DPN60). Durante a modelagem, os dados paramétricos foram analisados utilizando a distribuição linear, enquanto os dados não paramétricos foram analisados usando a distribuição gamma. Em ambos os casos, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Sidak, nos casos em que diferenças estatisticamente significativas entre os fatores e interações foram

observadas entre os grupos. Adicionalmente, foi realizada a análise de correlação de Spearman para determinar a força de relacionamento entre as variáveis analisadas. A presença de outliers foi verificada pelo método de ROUT (Q=1%) no programa GraphPad prism versão 8.0.2. A significância aceita foi de $p < 0,05$. Os dados com distribuição não normal estão expressos em mediana e percentil interquartil 25 e 75. Os gráficos foram realizados usando o programa Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software).

4. RESULTADOS

4.1 Os níveis dos transportadores MCT2 e MCT4 aumentam ao longo do neurodesenvolvimento encefálico

A análise do conteúdo protéico do transportador MCT1 não apontou diferenças significativas considerando a variável idade ou sexos ($p > 0,05$), conforme apresentado na Figura 4. No entanto, para o transportador MCT2 foi evidenciado que os animais do grupo DPN1 apresentaram níveis inferiores do transportador quando comparados com os animais no DPN21 e DPN60 ($H_{(4)} = 19,274$, $p = 0,001$; Figura 4C). Quando os fatores idade e sexo foram considerados, observou-se um efeito significativo do sexo, onde as fêmeas apresentaram níveis mais aumentados de MCT2 quando comparado com os machos ($H_{(1)} = 6,057$, $p = 0,01$, Figura 4D). Além disso, os animais machos do grupo DPN21 mostraram níveis elevados do transportador em comparação com os grupos DPN1 e DPN7 ($H_{(4)} = 20,219$, $p = 0,013$; Figura 4D). De maneira semelhante, as fêmeas exibiram maiores níveis proteicos no DPN21 em comparação com os roedores do DPN1 ($H_{(4)} = 12,374$, $p = 0,001$; Figura 4D). Finalmente, observou-se que os níveis de MCT4 estavam significativamente elevados no DPN21 quando comparados ao DPN1 e DPN7 ($H_{(4)} = 16,958$, $p = 0,002$; Figura 4E). Na análise independente dos sexos, constatou-se que os machos não apresentaram diferenças significativas ao longo do neurodesenvolvimento. Porém, as fêmeas do DPN1 exibiram níveis reduzidos de MCT4 em comparação ao DPN14 ($H_{(4)} = 20,748$, $p = 0,0001$; Figura 4F; Tabela 1).

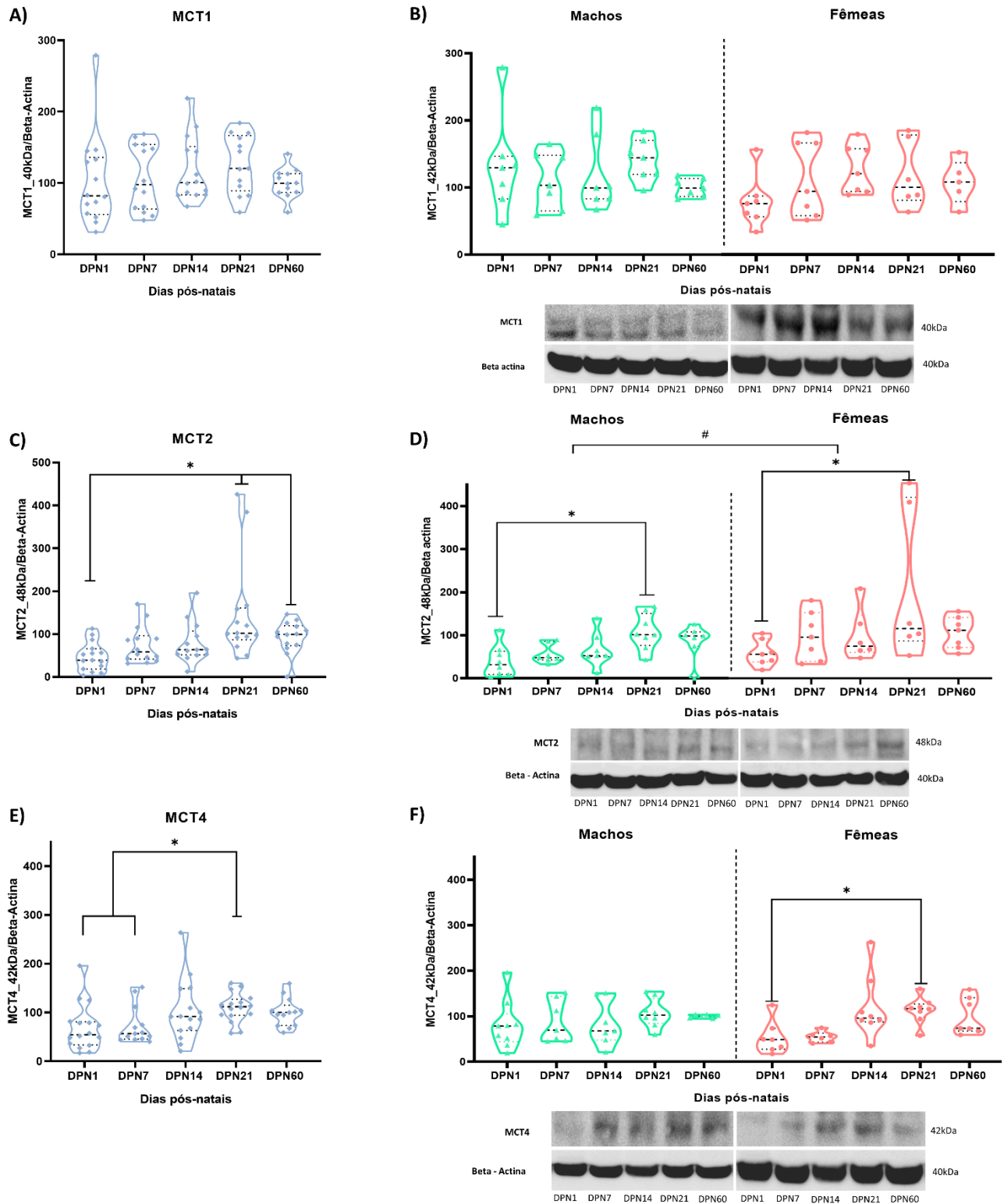


Figura 4: Imunoconteúdo dos transportador MCT1, MCT2 e MCT4 no hipocampo direito. **A** Níveis de MCT1 durante o neurodesenvolvimento, considerando o número total de animais usados no experimento. **B** Conteúdo proteico de MCT1

nos animais machos e fêmeas. **C** Níveis de MCT2 durante o neurodesenvolvimento, considerando o número total de animais usados no experimento. **D** Conteúdo proteico de MCT2 nos animais machos e fêmeas. **E** Níveis de MCT4 durante o neurodesenvolvimento, considerando o número total de animais usados no experimento. **F** Conteúdo proteico de MCT4 nos animais machos e fêmeas. **A-C-E** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações. **B-D-F** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). Os animais DPN60 foram usados como grupo controle. # Diferença entre os sexos. * Diferenças entre os as idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por cada janela temporal e sexo)

4.2 O transportador de glicose neuronal apresenta uma resposta sexo-específica, estando aumentados em fêmeas

As análises com relação aos transportadores de glicose evidenciaram que os níveis de GLUT1 se mantiveram constantes no decorrer do neurodesenvolvimento, sem diferenças significativas entre as idades ($p > 0,05$; Figura 5A). No entanto, a análise independente por sexos, constatou que os animais machos no DPN1 apresentaram níveis mais baixos em comparação com o DPN60 ($H_{(4)}=9,771$, $p=0,044$; Figura 7B). Não foram observadas diferenças significativas para o sexo feminino ($H_{(4)}=3,088$, $p=0,543$; Figura 5B; Tabela 1).

Referente ao transportador GLUT3, foi observado que os animais apresentavam diferenças significativas com relação a idade, assim, animais do grupo DPN1 exibiram níveis reduzidos quando comparado com os roedores do DPN21 ($H_{(4)}=14,043$, $p=0,012$). A análise por GZLM evidenciou um efeito do sexo, onde as ratas fêmeas apresentaram um aumento significativo da expressão em relação aos machos ($H_{(1)}=11,369$, $p=0,001$; Figura 5D). Por outro lado, os animais machos apresentaram níveis mais baixos de GLUT3 no DPN1 em comparação com o DPN14 e DPN21 ($H_{(4)}=11,857$, $p=0,018$; Figura 5D). De maneira semelhante, as fêmeas exibiram redução do imunoconteúdo no grupo DPN1 quando comparado ao DPN14 e DPN21 ($H_{(4)}=10,630$, $p=0,031$; Figura 5D; Tabela 1).

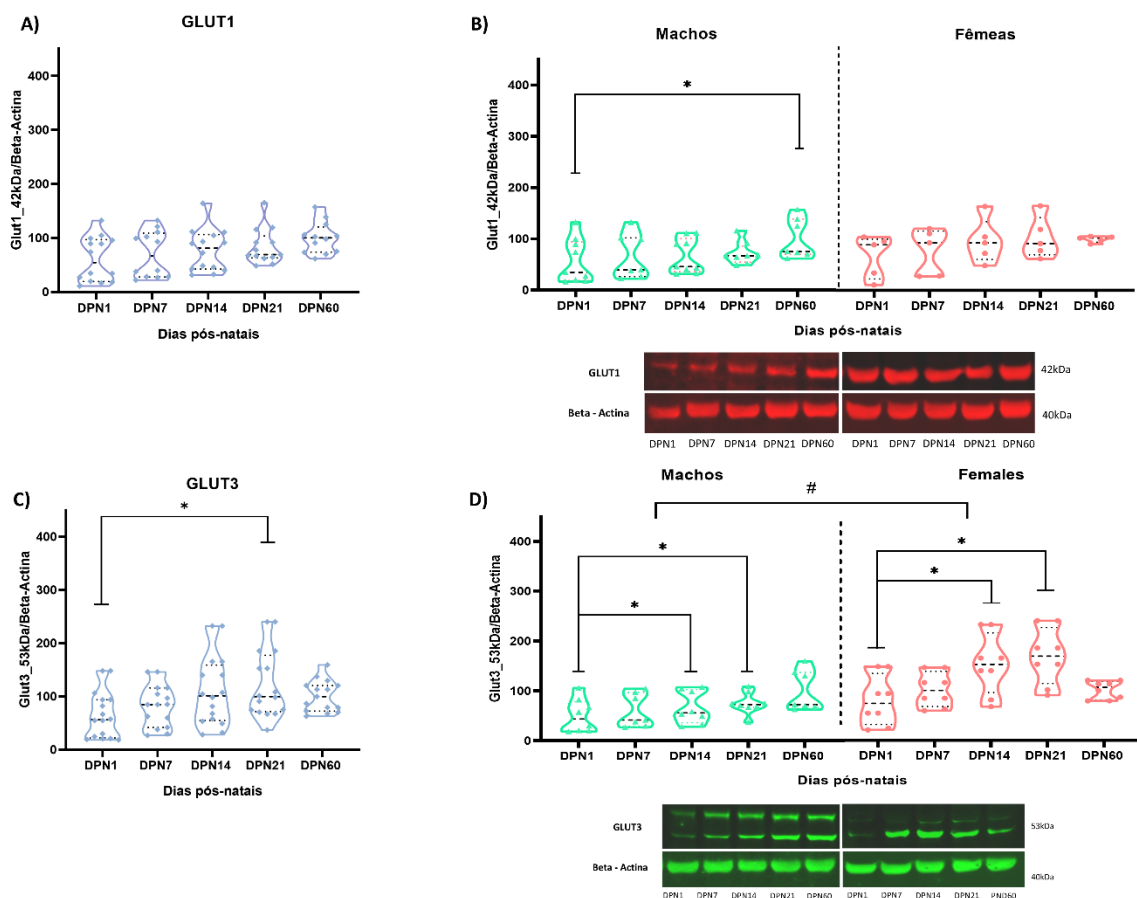


Figura 5: Imunoconteúdo de GLUT1 e GLUT3 no hipocampo direito. **A** Níveis de GLUT1 no decorrer do tempo considerando o número total de animais usados no experimento. **B** Imunoconteúdo de GLUT1 nos animais machos e fêmeas ao longo do desenvolvimento. **C** Níveis de GLUT3 no decorrer do tempo considerando o número total de animais usados no experimento. **D** Imunoconteúdo de GLUT3 nos animais machos e fêmeas. **A-C** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações. **B-D** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). * Diferenças entre os as idades avaliadas. # Diferenças entre os sexos. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 ($n=5-6$ por cada janela temporal e sexo).

4.3 Os níveis de GFAP apresentam um aumento progressivo com o decorrer da maturação cerebral, enquanto os níveis S100B permanecem constantes a partir do DPN7

A análise dos níveis de GFAP, obtidos por meio da técnica de ELISA constatou que os animais do grupo DPN1 apresentaram uma redução significativa no imunocontéudo de GFAP em comparação com os animais dos grupos DPN14 e DPN60. Por sua vez, os animais do grupo DPN7 apresentaram níveis menores em comparação ao DPN60 ($H_{(4)}=17,860$, $p=0,001$; Figura 6A). A análise independente dos níveis de GFAP segundo o sexo dos animais, mostrou que os animais machos no DPN1 apresentaram níveis menores do que os animais do DPN60 ($H_{(4)}=19,504$, $p=0,047$; Figura 6B). Em contrapartida, as fêmeas não exibiram discrepâncias ao longo da maturação cerebral ($H_{(4)}=10,218$, $p>0,05$; Figura 6B). Referente aos níveis de S100B, foi constatado um aumento significativo no DPN1 quando comparado ao DPN14 ($H_{(4)}=9,758$, $p=0,025$; Figura 6C). Semelhante ao comportamento observado para o GFAP, as fêmeas não apresentaram diferenças significativas com o decorrer do tempo ($H_{(4)}=4,671$, $p>0,05$). No entanto, os animais machos exibiram menor imunocontéudo no DPN14 em comparação com o DPN60 ($H_{(4)}=15,116$, $p=0,047$; Figura 6D). As análises feitas pelo modelo GZLM demonstraram que o imunocontéudo de GFAP e S100B não apresentou interação significativa entre os fatores fixos idade e sexo. Da mesma forma, não houve divergência entre os sexos ($p>0,05$).

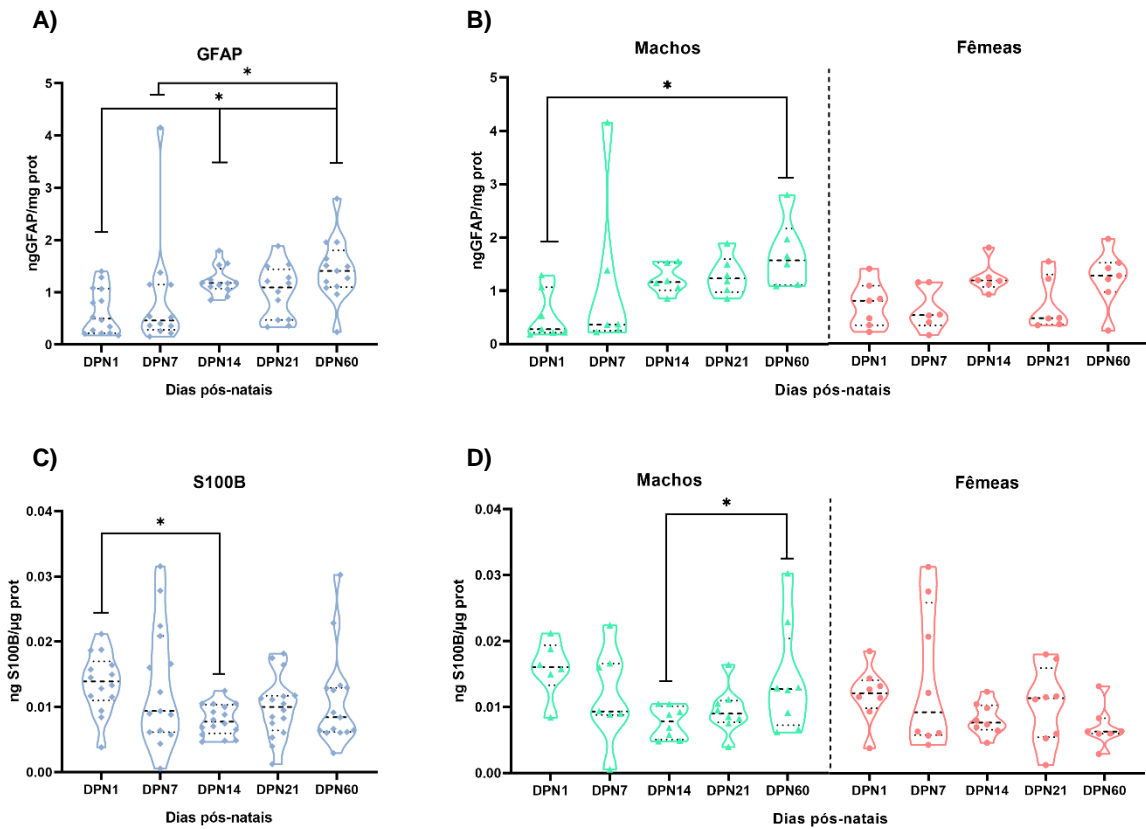


Figura 6: Imunoconteúdo de GFAP e S100B pela técnica de ELISA. **A.** Conteúdo de GFAP em todos os animais analisados. **B.** Medida de GFAP em macho e fêmeas ao longo do desenvolvimento. **C.** Conteúdo de S100B em todos os animais analisados. **D.** Medida de S100B em macho e fêmeas ao longo do desenvolvimento. **A-C** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações. **B-D** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). *Diferenças significativas entre as idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 ($n=5-6$ por cada janela temporal e sexo).

4.4 A captação da glicose no hipocampo aumentou no decorrer do neurodesenvolvimento em ambos os sexos

A avaliação da glicose no hipocampo dos animais, mostrou que os animais do grupo DPN1 apresentaram redução na captação quando comparados aos ratos dos grupos DPN21 e DPN60. De maneira semelhante os roedores DPN60 apresentaram captação aumentada em relação ao grupo DPN14 ($H_{(4)}= 27,501$, $p=0,001$; Figura 7A). A avaliação pelo modelo GZLM demonstrou que as ratas fêmeas apresentaram maior captação quando comparado aos machos ($H_{(1)}= 18,172$, $p<0,05$; Figura 7B). A análise independente por sexos evidenciou que os animais machos DPN60 tiveram maior captação de glicose quando comparados aos roedores no DPN1, DPN7 e DPN14. Além disso, os animais machos DPN21 apresentaram captação aumentada em comparação aos DPN1 ($H_{(4)}=35,204$, $p=0,0001$; Figura 7B). Uma resposta semelhante foi observada nas fêmeas, onde o grupo DPN60 teve níveis maiores comparado com as ratas DPN1, DPN14 e DPN21, enquanto os animais no DPN7 tiveram maior captação de glicose do que os animais no DPN1 ($H_{(4)}=27,534$, $p=0,0001$; Figura 7B; Tabela 1).

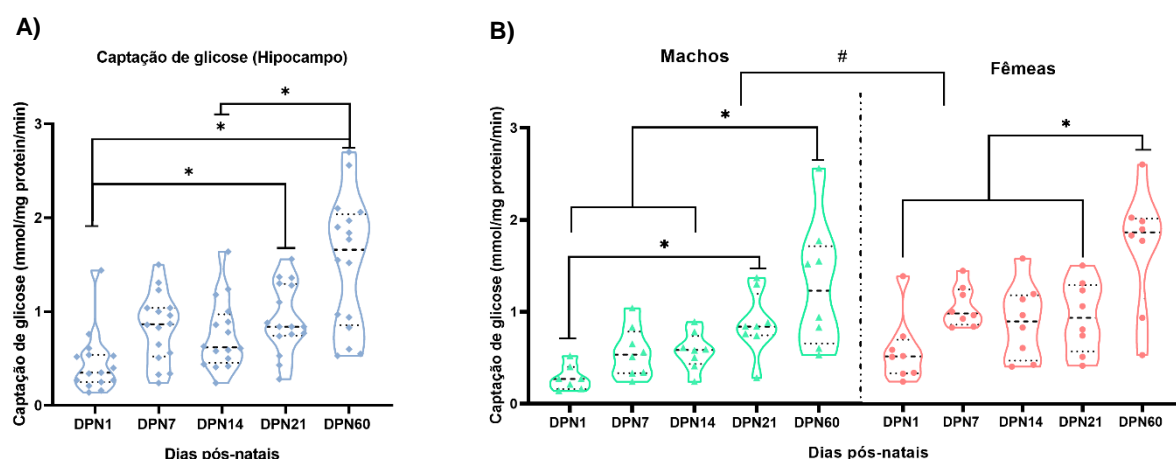


Figura 7: Captação de glicose em diferentes períodos do neurodesenvolvimento.

A Captação de glicose considerando todos os animais utilizados para a técnica. As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações. **B** Captação de glicose em machos e em fêmeas no decorrer da maturação cerebral. As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). *Diferenças entre os as idades avaliadas. # Diferença entre os sexos. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=8 por cada janela temporal e sexo).

4.5 A glicemia aumenta progressivamente em relação à maturação cerebral

A avaliação da glicemia mostrou que os animais DPN1 apresentavam níveis mais baixos quando comparados com os grupos DPN14, DPN21 e DPN60 ($H_{(4)}=30,731$ $p=0,0001$; Figura 8A). As análises feitas pelo modelo GZLM evidenciaram que não houve interação entre o sexo e idade ($H_{(4)}=3,159$, $p > 0,05$), nem houve um efeito específico do sexo ($H_{(1)}=0,103$, $p > 0,05$; Figura 8B). Ao se analisar separadamente machos e fêmeas, foi verificado que os machos DPN1 tiveram menor dosagem em relação às idades DPN14, DPN21 e DPN60, ($H_{(4)}= 21,315$, $p=0,0001$; Figura 8B). De forma similar, as fêmeas apresentaram valor inferior no DPN1 quando comparado a DPN14 e DPN60 ($H_{(4)}=29,587$, $p=0,0001$; Figura 8B; Tabela 1).

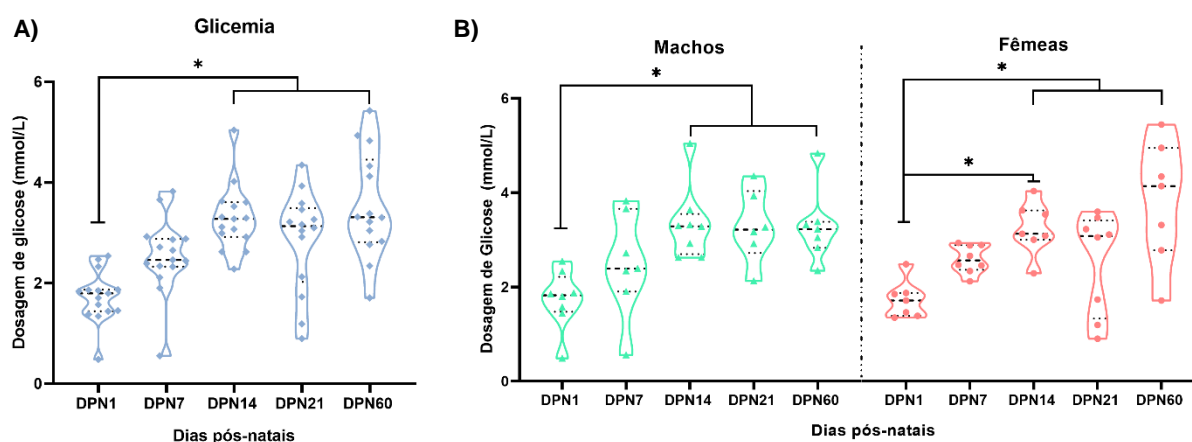


Figura 8: Glicemia ao longo da maturação cerebral. **A** Níveis da glicemia no soro

dos animais durante o neurodesenvolvimento, considerando o número total de animais do experimento. As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações. **B** Níveis glicêmicos comparando animais machos e fêmeas, no decorrer do tempo. As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). *Diferenças entre os as idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=8 por cada janela temporal e sexo).

4.6 A quantidade de lactato sérico aumenta logo após o nascimento e também após o desmame no SNC

A análise dos níveis séricos de lactato evidenciou que os animais do grupo DPN1 estavam aumentados quando comparado aos ratos DPN14, DPN21 e DPN60 ($H_{(4)} = 22,642$, $p = 0,0001$; Figura 9A). Apesar das diferenças sexuais ao longo do neurodesenvolvimento, não houve efeito do sexo, nem interação entre o sexo e idade, ($H_{(4)} = 6,359$ e $H_{(1)} = 2,473$, respectivamente, $p > 0,05$; Figura 9B). Não obstante, ambos os sexos apresentaram maiores concentrações de lactato no DPN1 em comparação ao DPN7 ($H_{(4)} = 18,181$, $p = 0,001$; Figura 9B). Adicionalmente, as fêmeas do DPN21 apresentaram um valor significativamente mais baixo quando comparado com os roedores do DPN1, DPN14 e DPN60 ($H_{(4)} = 30,703$, $p = 0,0001$; Figura 9B; Tabela 1).

Com o intuito de analisar a disponibilidade de lactato no sistema nervoso, a dosagem de lactato no líquido cerebrospinal mostrou que os animais do grupo DPN1 e DPN7 exibiam a menor concentração de lactato em comparação aos animais do grupo DPN21 e DPN60 ($H_{(4)}=27,838$, $p=0,0001$; Figura 9C). A análise independente por sexos evidenciou que os ratos machos DPN21 apresentavam maiores níveis comparado com os neonatos no DPN1 e DPN7 ($H_{(4)}=6,191$, $p=0,0001$). Interessantemente, as fêmeas apresentaram uma diferença semelhante, porém com relação aos animais DPN60 ($H_{(4)}=9,996$, $p=0,0001$, $p<0,05$; Figura 9D). Não foram observadas diferença entre os sexos, nem mesmo interação entre os fatores sexo e as idades ($H_{(1)}=0,109$ e $H_{(4)}=0,514$, respectivamente, $p>0,05$; Figura 9D; Tabela 1).

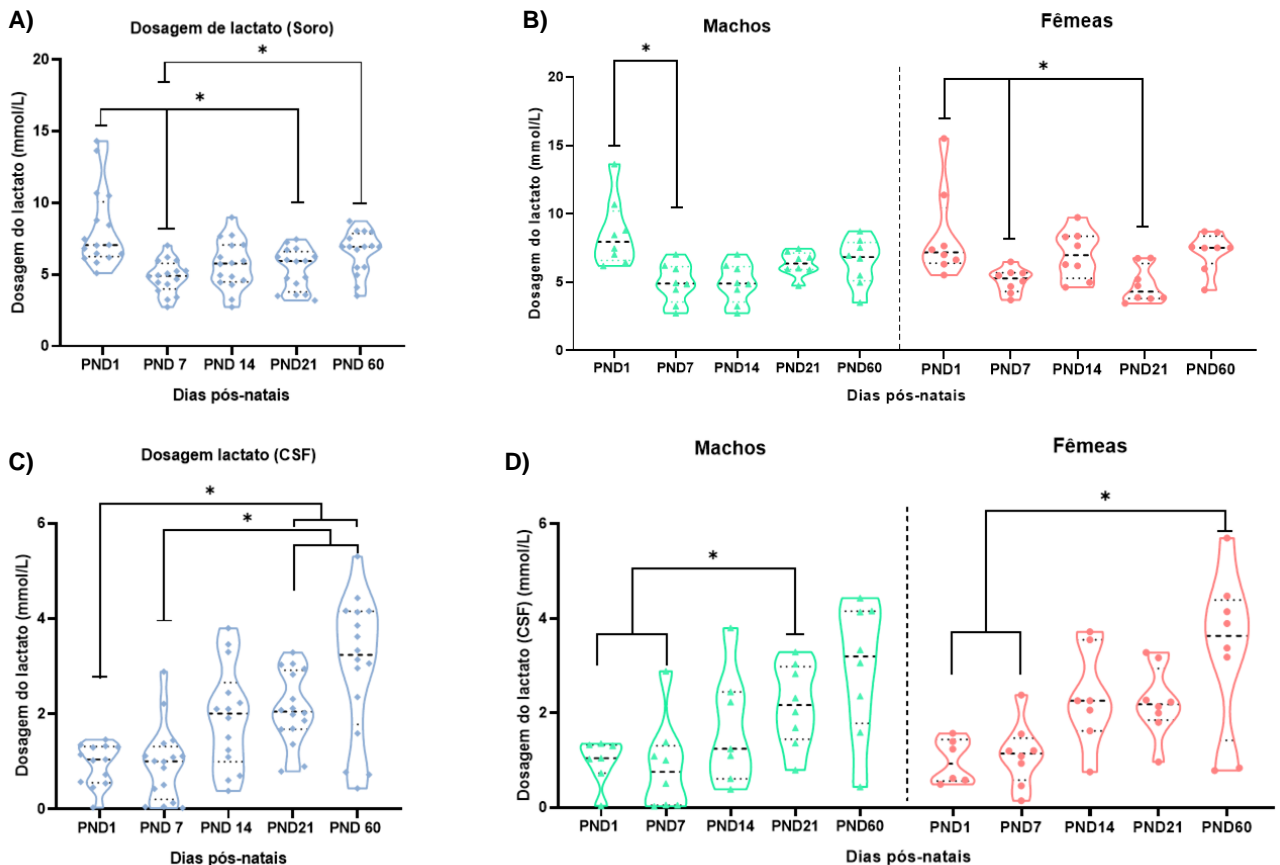


Figura 9: Concentração de lactato no soro e no líquido cerebrospinal em diferentes períodos pós-natais. **A** Dosagem de lactato no soro, considerando o número total de animais ao longo do desenvolvimento. **B** Dosagem de lactato em ambos os sexos. **C** Dosagem de lactato no líquido cerebrospinal levando em

conta todos os animais do experimento. **D** Dosagem de lactato em ambos os sexos. Para as figuras A-C, as análises foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações, enquanto para as figuras **B-D** as avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). *Diferenças entre os as idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 ($n=8$ por cada janela temporal e sexo).

4.7 Animais no seu primeiro dia pós-natal exibem uma maior concentração de BOHB sérica, com relação a períodos posteriores

Observou-se que o BOHB circulante estava aumentado nos animais DPN1 as outras idades avaliadas em relação a todos os outros períodos avaliados ($H_{(4)}=67,634$, $p=0,0001$; Figura 10A). Interessantemente, a análise independente por sexos demonstrou adicionalmente que os machos DNP60 exibiam uma menor quantidade sistêmica de BOHB do que os DPN14 e DPN21 ($H_{(4)}=159,572$, $p=0,0001$; Figura 10B). No entretanto, as fêmeas DPN60 apresentaram valores significativamente menores em relação às outras idades ($H_{(4)}=275,263$, $p=0,0001$; Figura 10B; Tabela 1).

A fim de comparar os valores obtidos a nível sistêmico com o sistema nervoso, foi feita a dosagem de BOHB no líquido cefalorraquidiano. Assim, foi verificado que o grupo DPN14 teve níveis aumentados em relação ao grupo DPN7, do mesmo modo, os animais DPN1, e DPN14 tiveram níveis estatisticamente mais altos em comparação ao grupo DPN21. O grupo DPN60 exibiu os níveis mais baixos de BOHB no SNC em relação a todas as idades ($H_{(4)}=58,909$, $p=0,0001$; Figura 10C). Analisando o comportamento individual de machos e fêmeas independentemente, constatou-se o mesmo padrão descrito previamente em ambos os sexos em relação ao DPN1 e DPN60. Interessantemente, os machos no DPN14 apresentam níveis mais elevados quando comparados com o DPN7 e DPN21, perfil que não foi evidenciado nas fêmeas (machos: $H_{(4)}=153,080$, $p=0,0001$; fêmeas: $H_{(4)}=92,629$, $p=0,0001$; Figura 10D; Tabela 1).

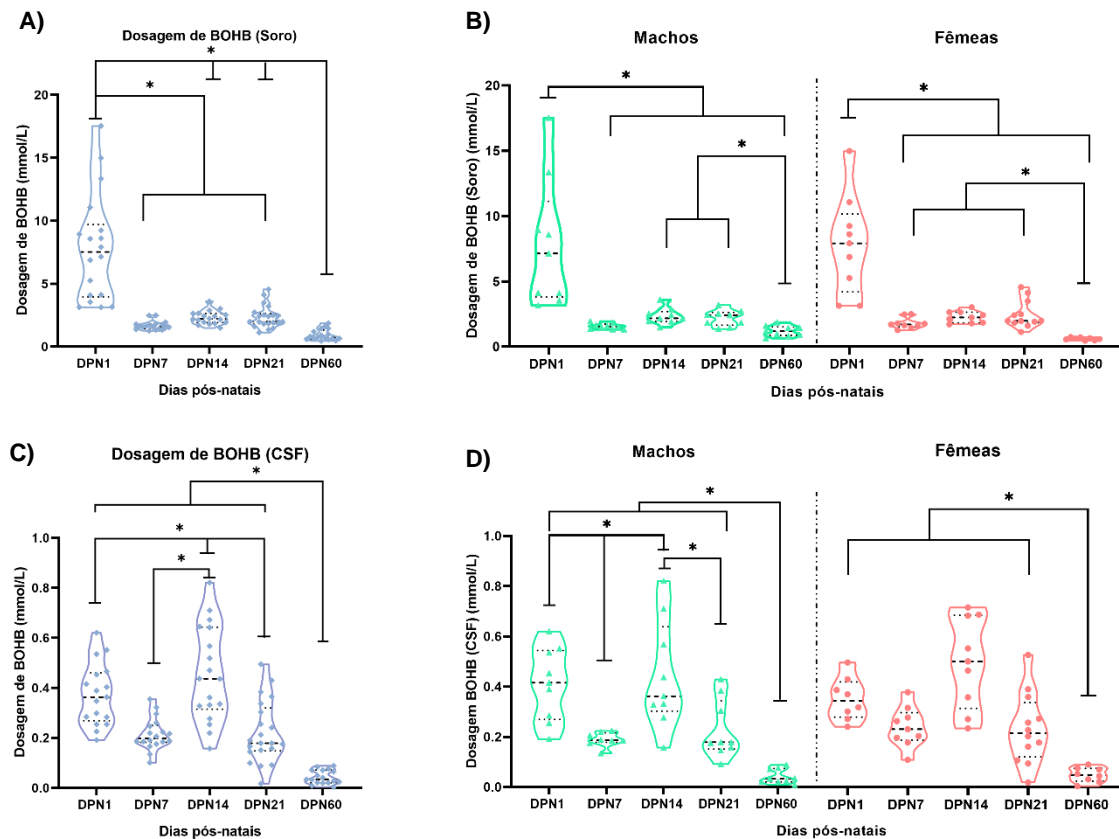


Figura 10: Concentração de BOHB no soro e líquido cerebrospinal no decorrer do desenvolvimento. **A.** Níveis de BOHB no soro levando em conta o número total de animais usados no experimento. **B.** Níveis de BOHB no soro em ambos os sexos. **C.** Níveis de BOHB no líquido cerebrospinal tendo o número total de animais. **D.** Níveis de BOHB no líquido cerebrospinal em machos e fêmeas. Para as figuras A-C, as análises foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações, enquanto para as figuras B-D, as avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). *Diferenças entre os as idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 ($n=8$ por cada janela temporal e sexo).

4.8 A atividade da BHD aumenta no hipocampo a partir do desmame, mas também no primeiro dia pós-natal no fígado

A análise da atividade da BHD foi verificada a nível periférico (fígado) e central (hipocampo). Assim, observou-se um aumento na atividade enzimática nos animais DPN60 em relação aos grupos DPN7, DPN14 e DPN21, bem como no grupo DPN1 em comparação aos grupos DPN14 e DPN7 ($H_{(4)}=44,434$, $p=0,0001$; Figura 11A). A análise individual por sexo, confirmou que os machos DPN14 apresentaram a menor atividade enzimática quando comparados com o DPN1 e o DPN60 ($H_{(4)}=7,325$, $p=0,0001$; Figura 11B). Em contrapartida, as fêmeas DPN60 apresentaram alta taxa de redução do NAD^+ em relação ao DPN7, DPN14 e DPN21, semelhante às roedoras DPN1. Adicionalmente, os animais DPN21 apresentaram níveis mais altos com relação ao DPN7 de ($H_{(4)}=67,368$, $p=0,0001$; Figura 11B; Tabela 1).

A atividade enzimática da BHD no SNC aumentou ao longo do neurodesenvolvimento, os animais do grupo DPN1 apresentaram menor atividade de BHD quando comparado aos grupos DPN14, DPN21 e DPN60, bem como os animais DPN7 em relação aos animais DPN21 e DPN60, ($H_{(4)}=41,897$, $p=0,0001$; Figura 11C). A análise por GLZM constatou interação entre os fatores (sexo e idade). Os animais machos DPN7 exibiram uma atividade reduzida em comparação as fêmeas DPN14, DPN21 e DPN60. Ademais, os animais DPN1 machos também demonstraram atividade enzimática reduzida em relação às fêmeas DPN21. Entretanto, as ratas DPN21 apresentaram atividade aumentada em comparação aos ratos machos PND14 e DPN21 ($H_{(4)}=10,777$, $p=0,029$, Figura 11D; Tabela 1).

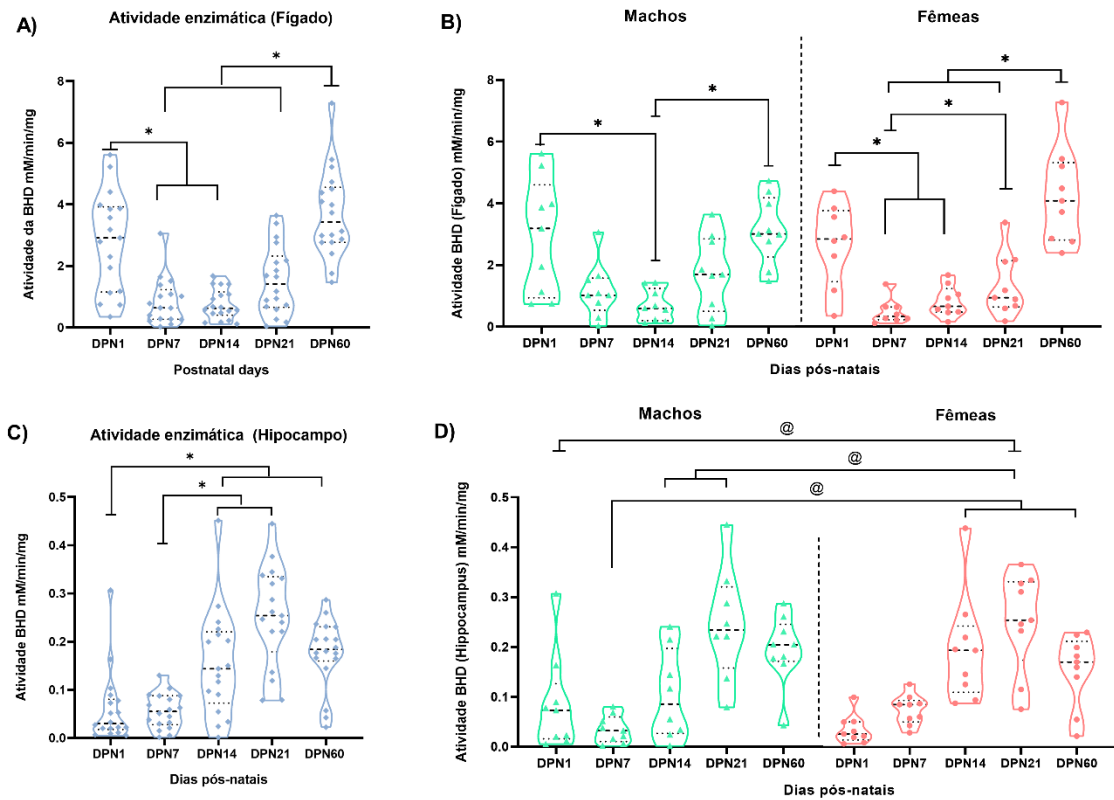


Figura 11: Atividade da BHD avaliada pela redução do NAD no fígado e hipocampo. **A** Atividade da BHD no fígado considerando o número total de animais. **B** Atividade da BHD no fígado em machos e em fêmeas. **C** Atividade da BHD no hipocampo considerando todos os animais do experimento. **D** Atividade da BHD no hipocampo em ambos os sexos. **A-C** As análises foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. **B-D** As avaliações foram feitas por intermédio dos Modelos lineares generalizados (GZLM). * Diferenças entre os as idades avaliadas. # Diferença entre machos e fêmeas. @ Interação entre idade e sexo. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 ($n=8$ por cada janela temporal e sexo).

4.9 A intensidade de oligodendrócitos no corpo caloso aumentou durante o neurodesenvolvimento

A análise da intensidade de OL evidenciou um crescente aumento de MBP na região do corpo caloso ao longo da maturação cerebral, sendo os animais adultos os que apresentaram uma maior intensidade de fluorescência em comparação com o DPN1, DPN7 e DPN14, sem diferenças significativas com o DPN21. De forma semelhante, os ratos DPN21 tiveram níveis elevados de MBP quando comparados aos animais DPN1 e DPN7 em ambas as regiões avaliadas ($H_{(4)}=39,710$ região inferior, $p<0,001$; Figuras 12A e 13A). A análise, considerando os sexos independente, apresentou um perfil semelhante nos níveis de MBP aos previamente descrito ($H_{(4)}=112,035$, $p=0,0001$; Figuras 12B e 13A e $H_{(4)}=54,102$, $p=0,0001$; Figuras 12D e 13B; Tabela 1). No entanto, na região superior do CC, os animais machos DPN60 e DNP21 demonstraram maior intensidade que os neonatos DPN1, DPN7 e DPN14 ($H_{(4)}=81,015$, $p=0,0001$; Figuras 12B, 13A,). Considerando a região inferior do corpo caloso, os neonatos machos DPN1 e DPN7 exibiram menor intensidade de MBP quando comparados às outras idades avaliadas ($H_{(4)}=84,722$, $p=0,0001$; Figuras 12D, 13B; Tabela 1).

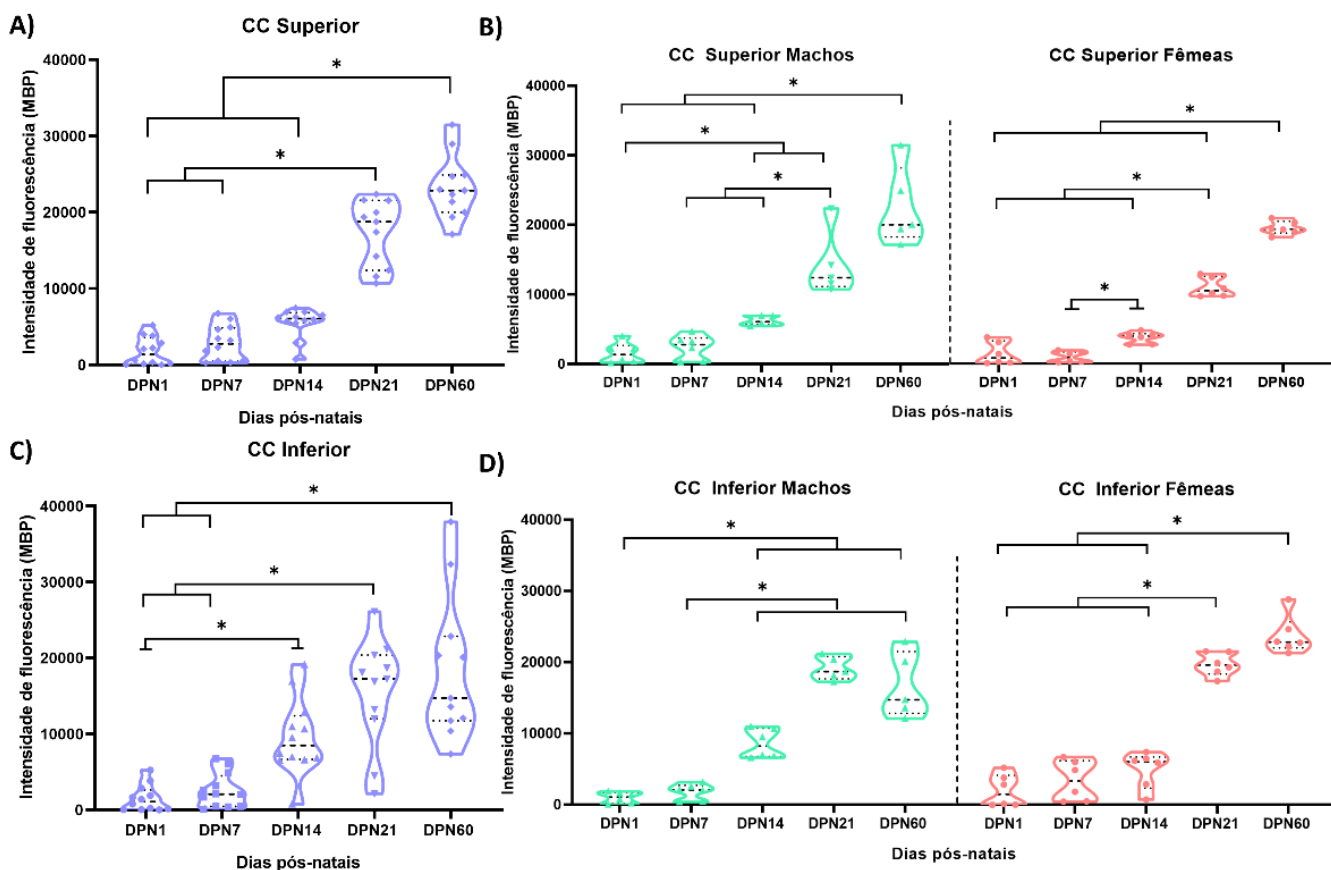


Figura 12: Imunofluorescência marcador da proteína básica de mielina (MBP) na região do corpo caloso. **A** Intensidade de MBP na região superior do corpo caloso considerando o número total de animais usados no experimento. **B** Níveis de MBP nos animais machos e fêmeas ao longo do neurodesenvolvimento. **C** Intensidade de MBP na região inferior do corpo caloso levando em conta o número total de animais usados no experimento. **D** Níveis de MBP nos animais machos e fêmeas ao longo do neurodesenvolvimento. **A-C** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. **B-D**. As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). * Diferenças entre os as idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 ($n=6$ por cada janela temporal e sexo)

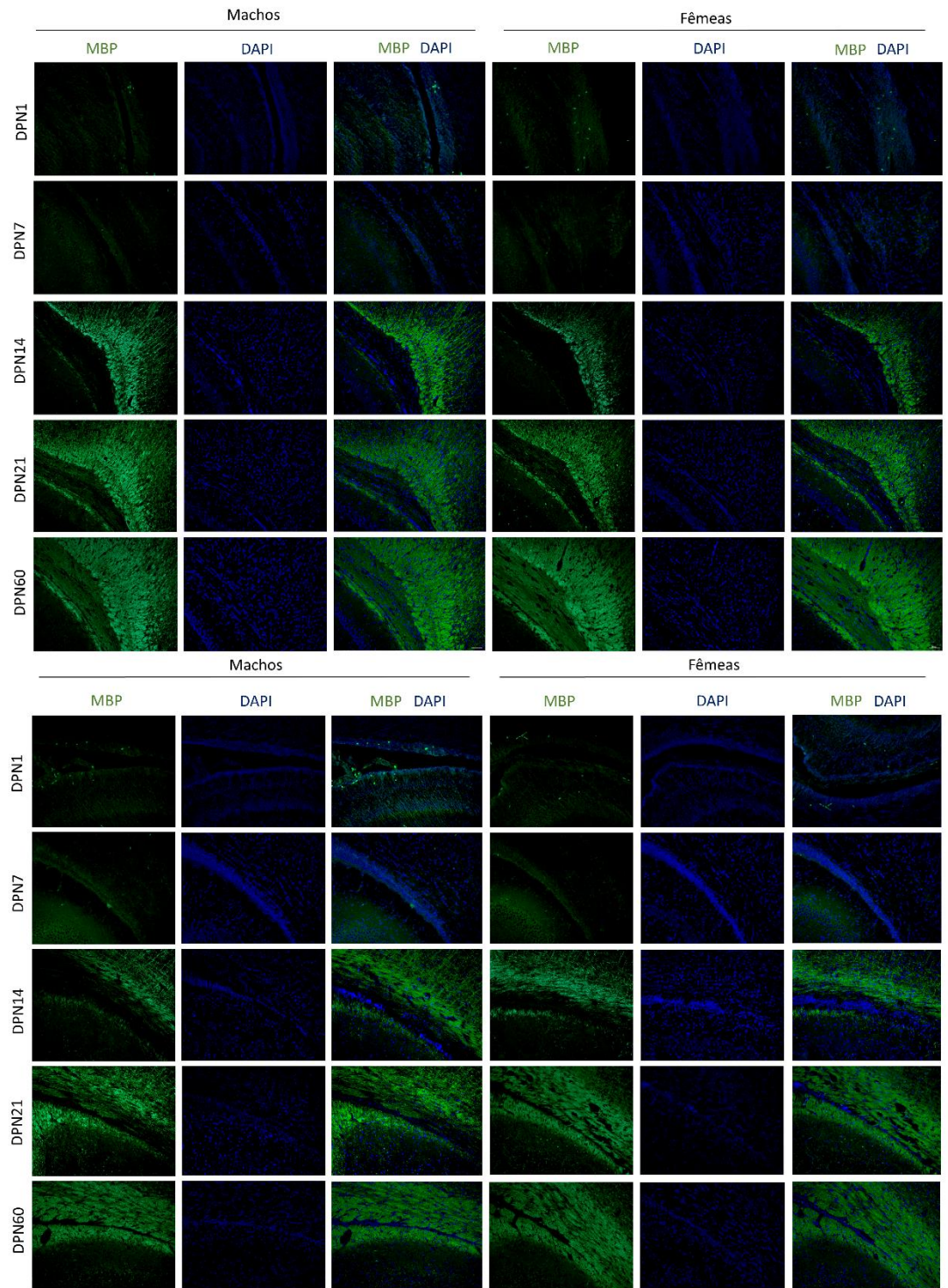
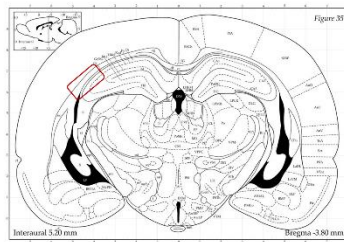
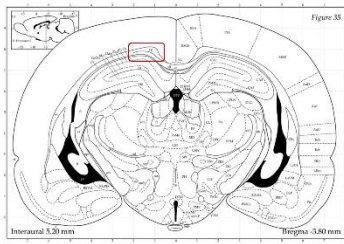
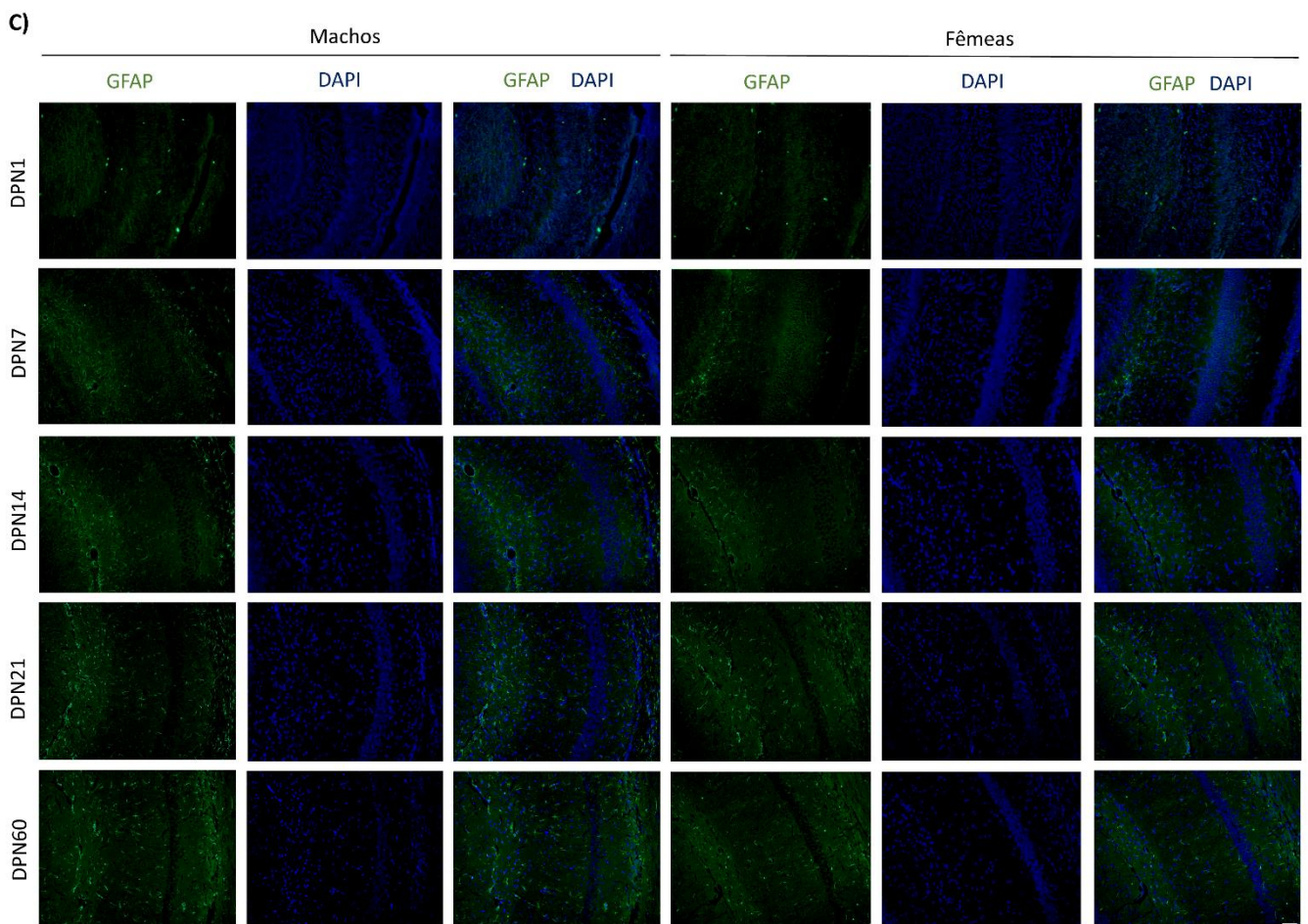
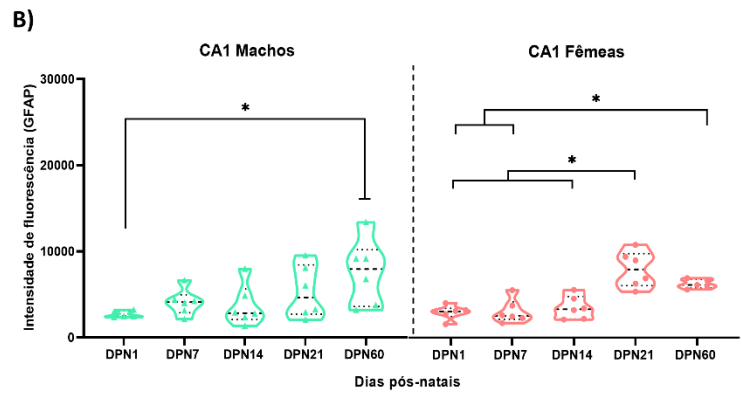
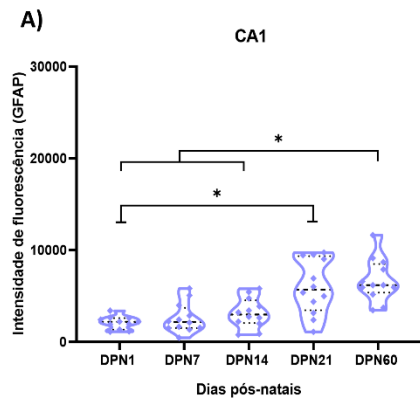
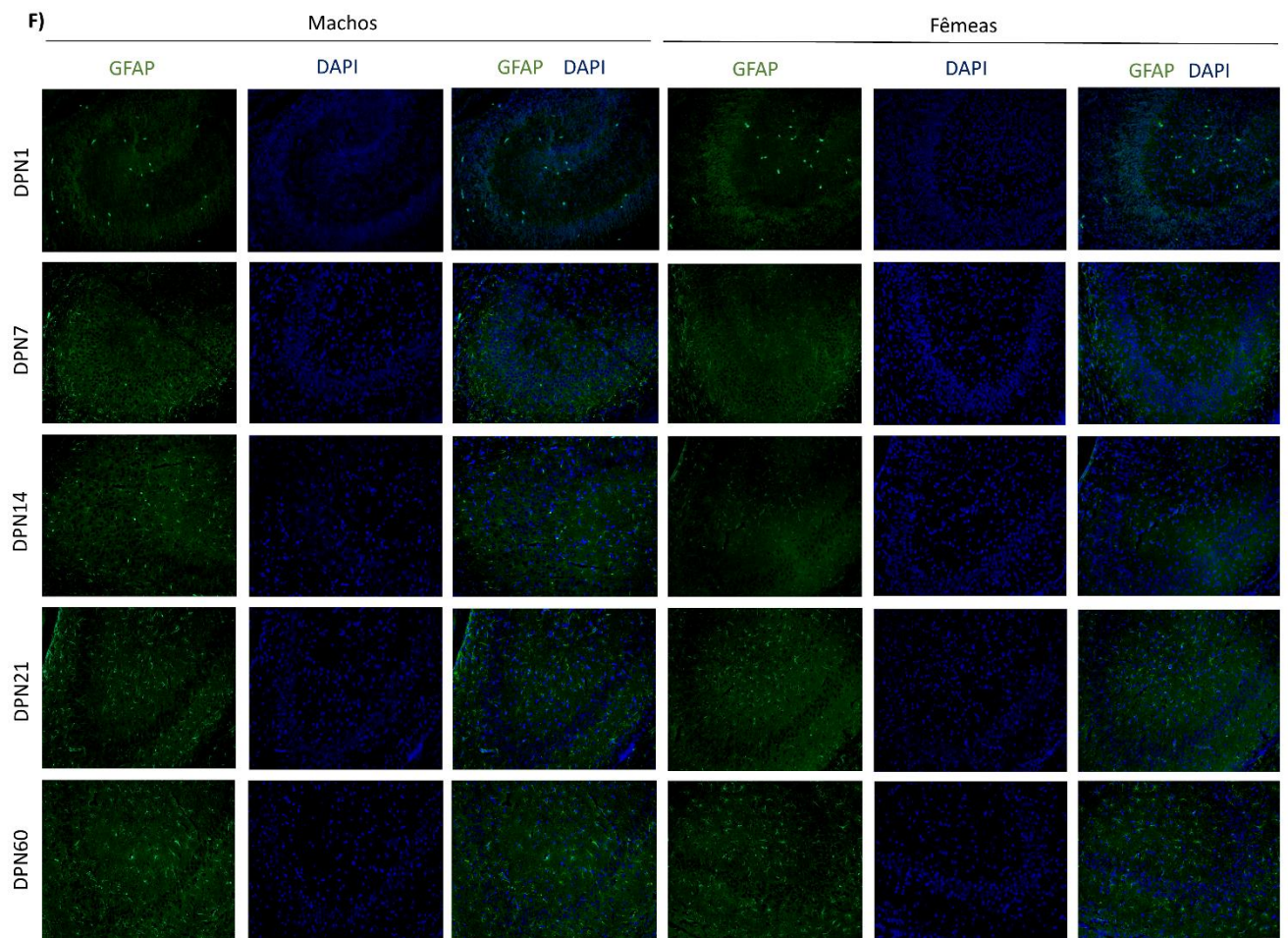
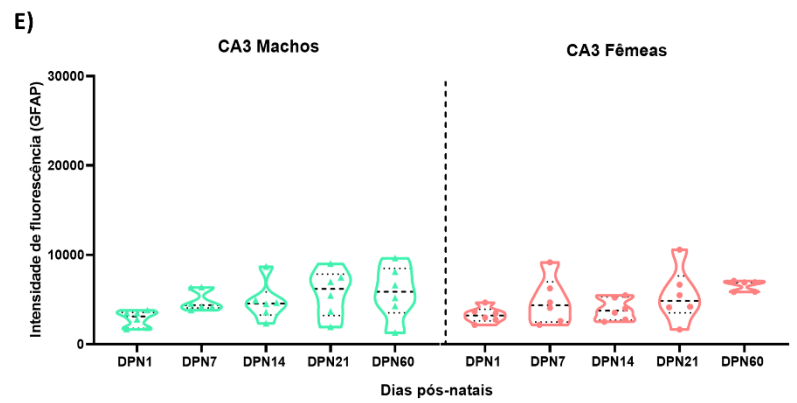
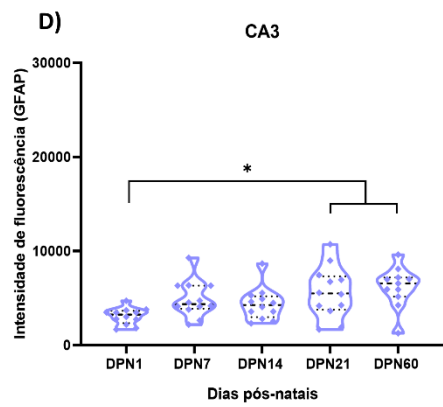


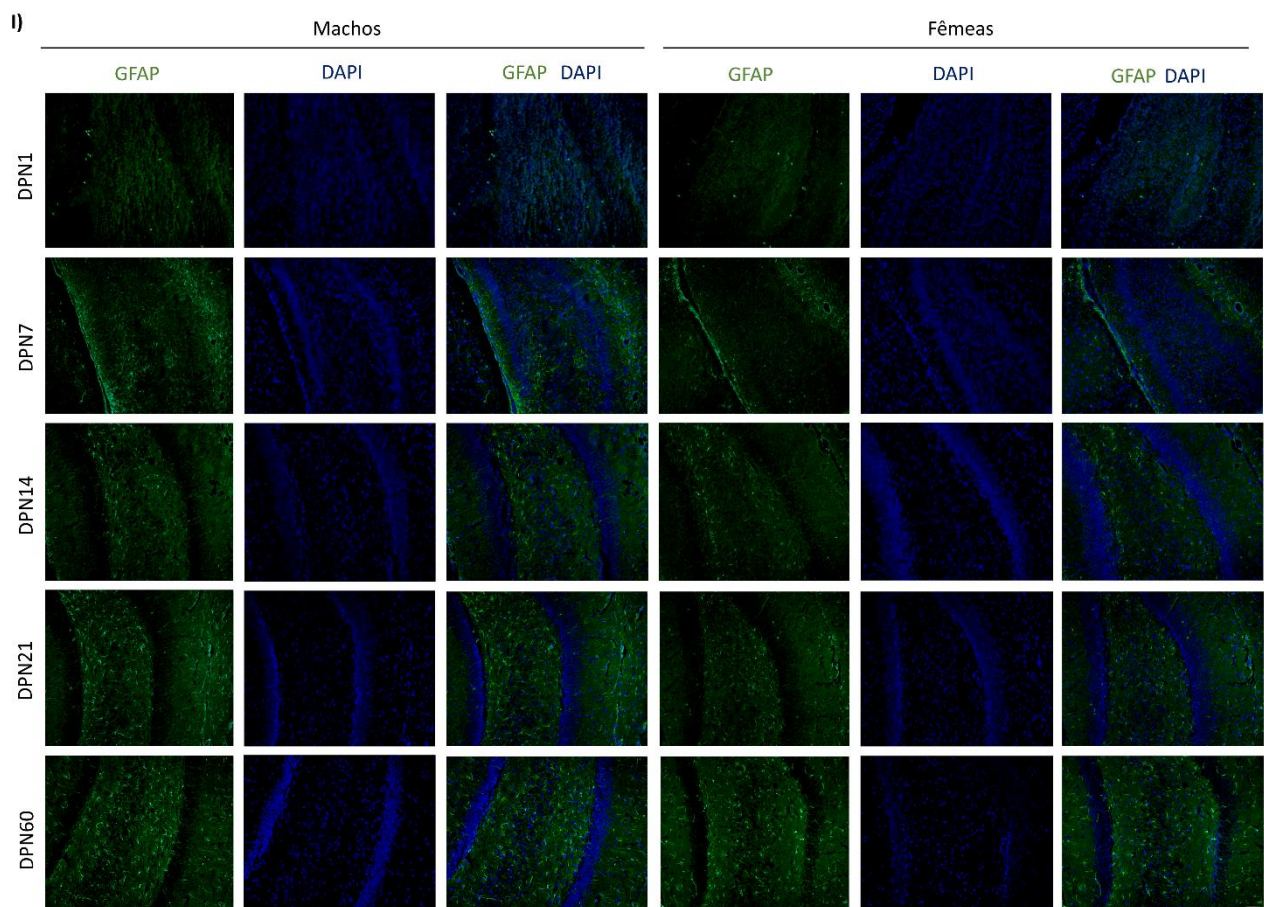
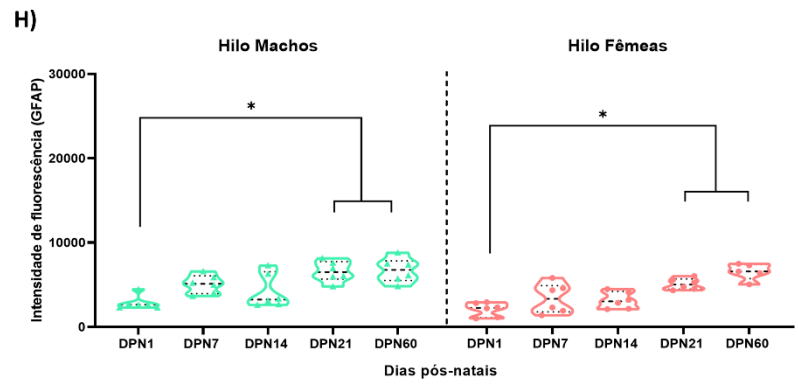
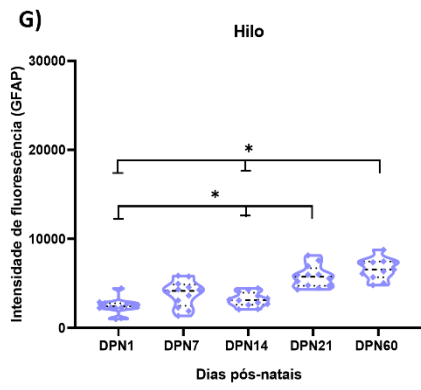
Figura 13: Imagens representativas do MBP na região mais superior e inferior do corpo caloso, em cada idade e em ambos os sexos. **A** MBP na região superior do corpo caloso. **B** Marcação do MBP na região inferior do corpo caloso. Barra de calibração em 100 μ m.

4.10 Os astrócitos apresentam um aumento gradual na intensidade no hipocampo ao longo do neurodesenvolvimento

Na região hipocampal CA1, os animais adultos DPN60 apresentaram níveis elevados de GFAP em comparação com os roedores DPN1, DPN7 e DPN14, bem como os indivíduos DPN21 em relação ao DPN1 ($H_{(4)}=23,108$, $p=0,0001$; Figuras 14A). De modo semelhante, na região CA3 e giro denteado os animais DPN21 e DPN60 possuíram maiores valores apenas em comparação ao DPN1, ($H_{(4)}=16,890$, $p=0,002$ e $H_{(4)}=25,977$, $p=0,0001$; Figura 14C,E, respectivamente). O modelo GLZM não constatou interação entre os sexo e idade (CA1: $H_{(4)}=4,243$; CA3: $H_{(4)}=2,089$; Hilo: $H_{(4)}=3,310$; giro denteado: $H_{(4)}=8,232$, $p>0,05$). A análise independente de cada sexo demonstrou que na região CA3, os machos e as fêmeas não obtiveram diferenças entre as idades avaliadas ($H_{(4)}= 9,969$, $p>0,05$). Entretanto, nas outras regiões, os ratos machos DPN60 apresentaram maior intensidade que os animais DPN1, DPN14 no giro denteado, e DPN21 e no hilo (CA1: $H_{(4)}= 17,018$; Hilo: $H_{(4)}=15,022$; giro denteado: $H_{(4)}=31,540$, $p=0,002$; Figuras 14B,F,H, 15A,C,D, 29A-D; Tabela 1). Similarmente, as fêmeas DPN60 tiveram maior número astrocitário que as DPN1 nas regiões CA1, hilo e giro denteado, e também entre DPN7 na região CA1. As fêmeas DPN21 demonstraram maior intensidade que as outras idades neonatais em CA1, e entre DPN7 no hilo (CA1: $H_{(4)}=42,050$; Hilo: $H_{(4)}=10,760$; giro denteado: $H_{(4)}=16,700$, $p=0,0001$; Figuras 14B,F,H, 15A,C,D, 29A-D; Tabela 1).







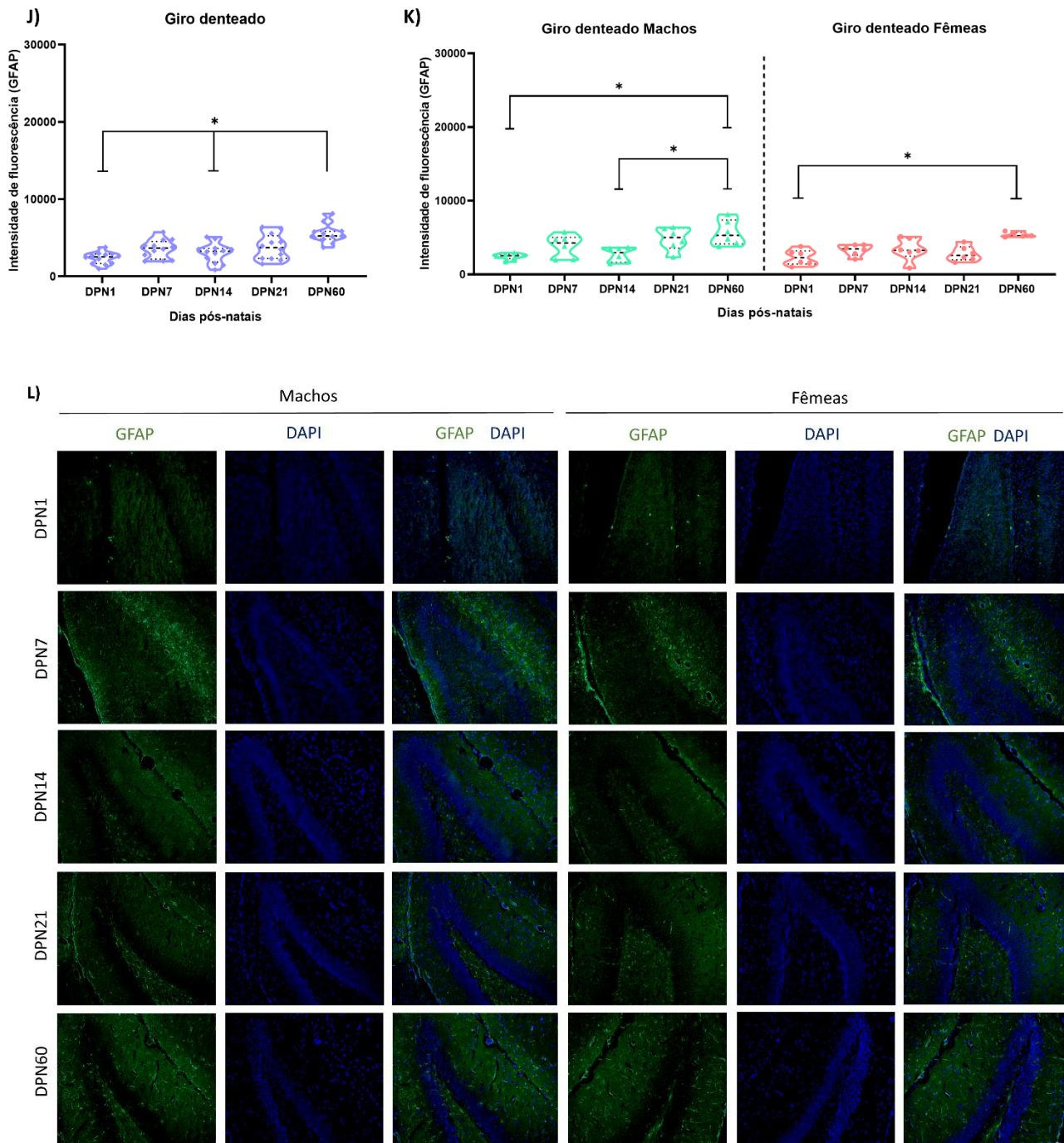
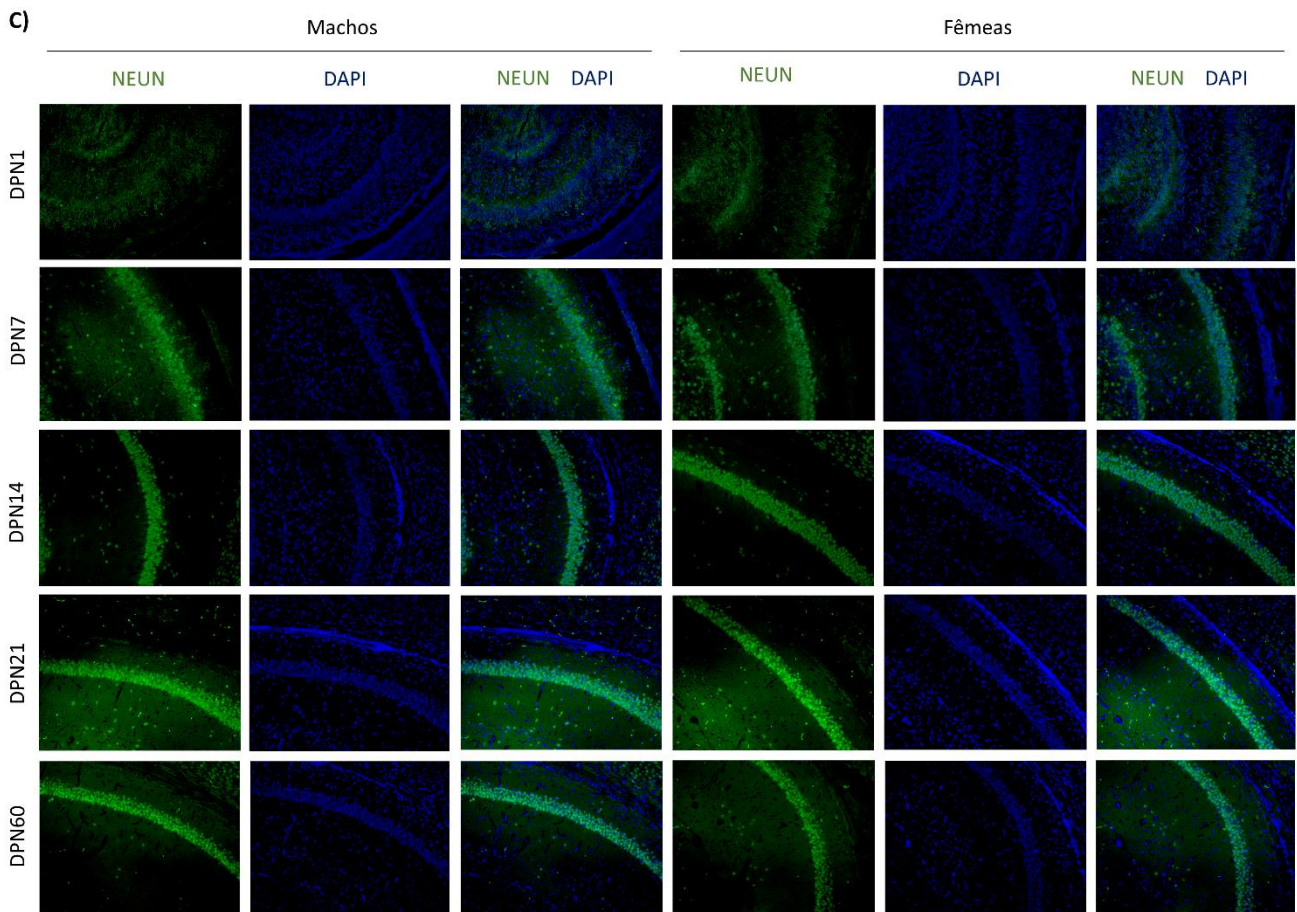
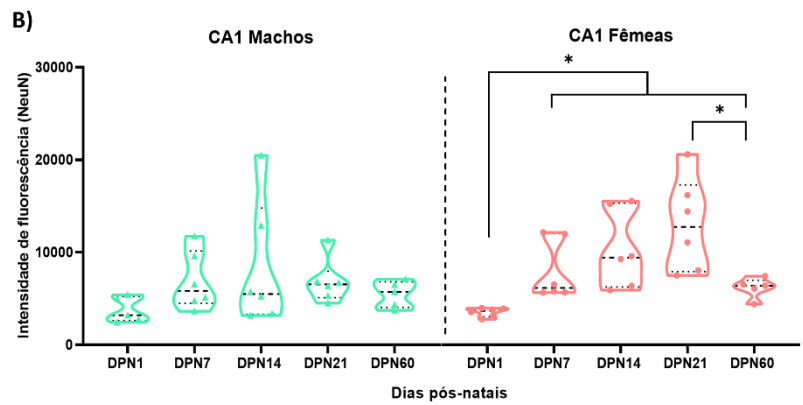
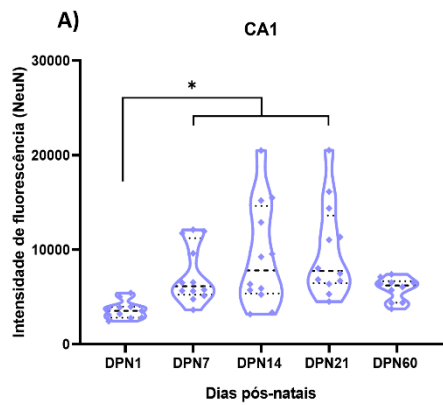


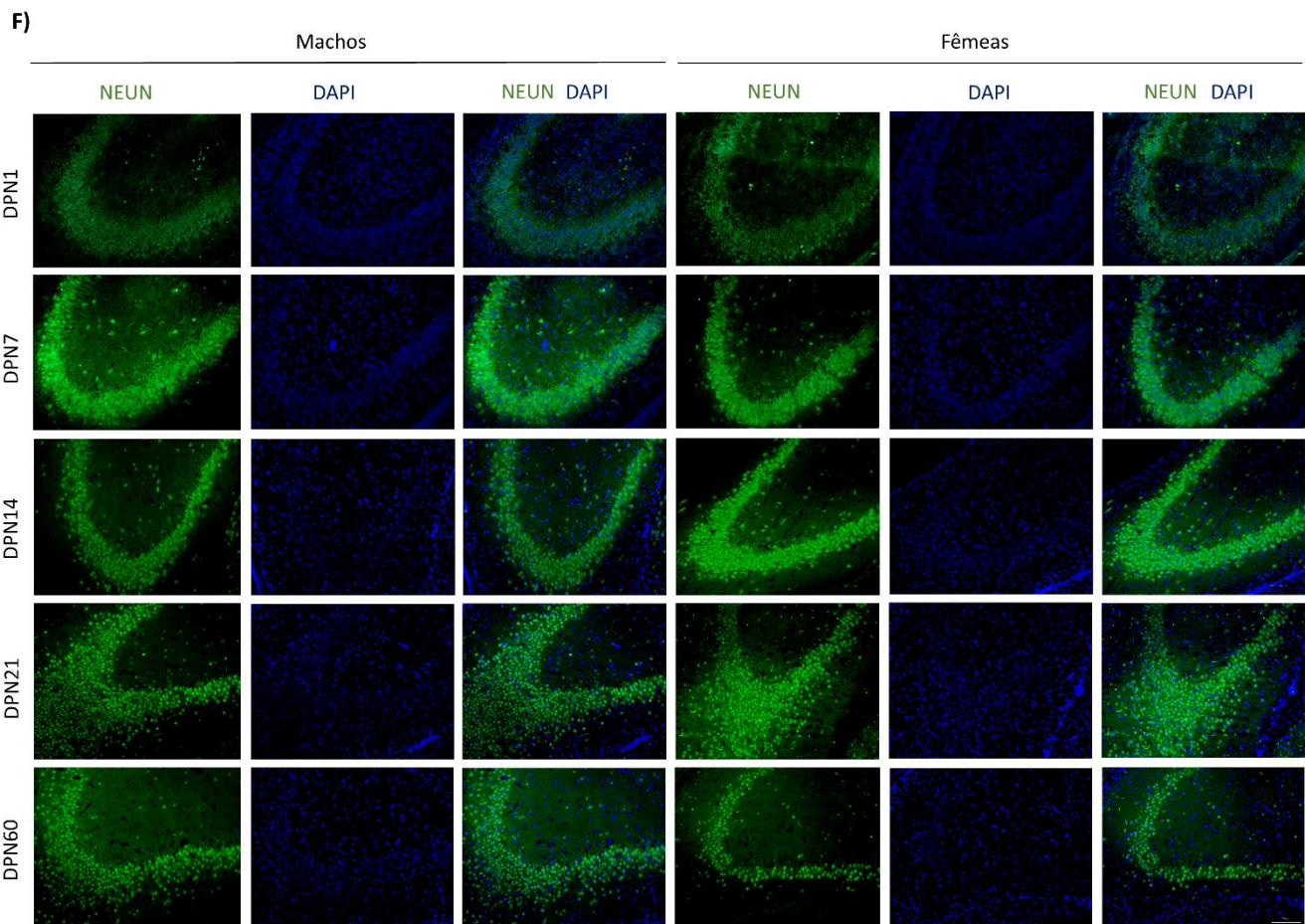
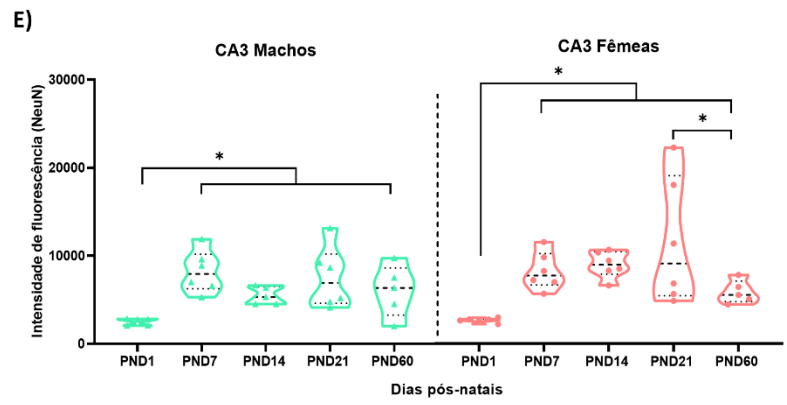
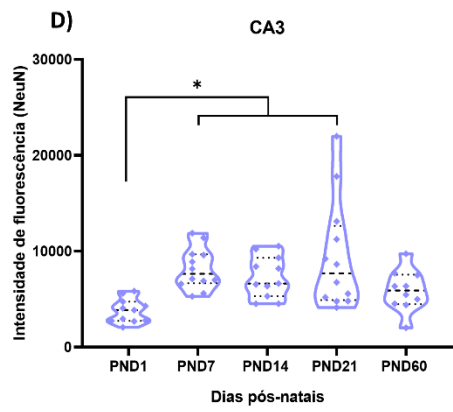
Figura 14: Quantificação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) nas regiões hipocâmpicas durante o neurodesenvolvimento. **A** intensidade de fluorescência na região CA1 considerando todos os animais do experimento. **B** intensidade de GFAP em CA1 nos animais machos e fêmeas. **C** imagens representativas do GFAP na região CA1. **D** intensidade de GFAP na região CA3 mediante o número total de animais. **E** intensidade de GFAP na região do CA3 em ambos os sexos.

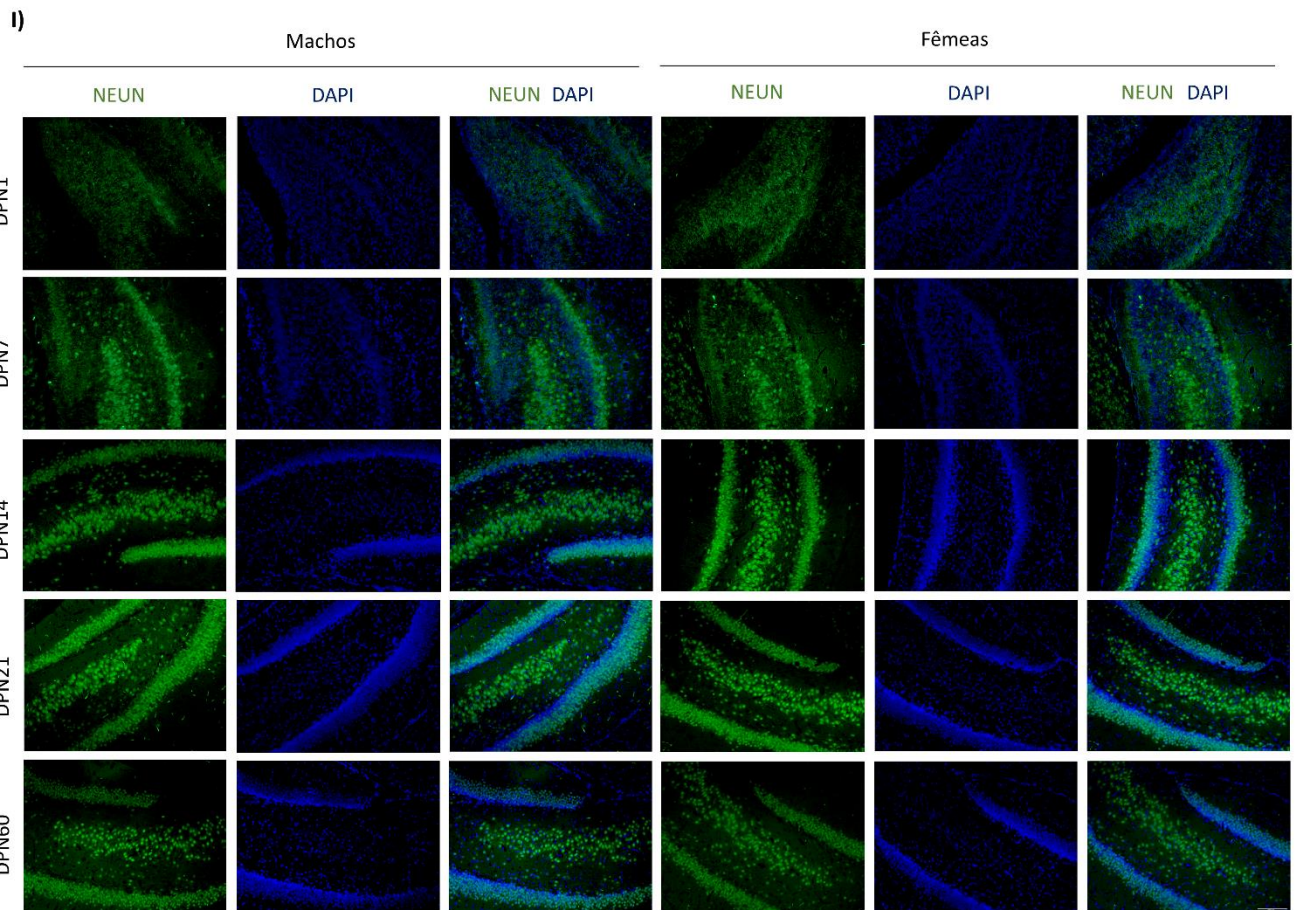
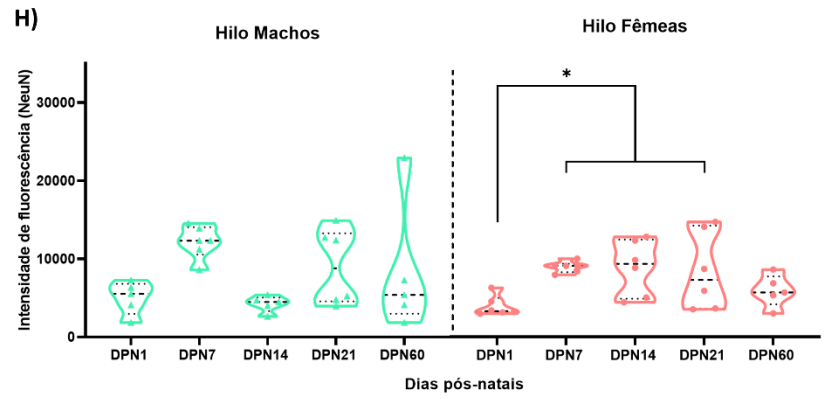
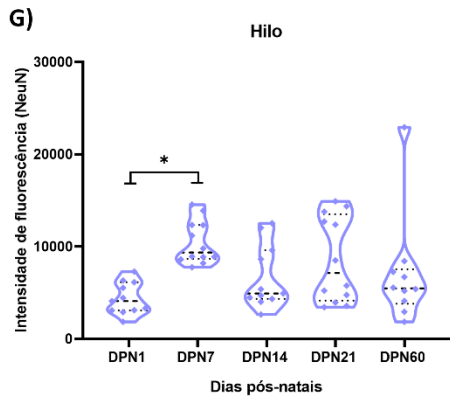
F imagens representativas do GFAP na região CA3. **G** intensidade de GFAP na região do hilo mediante o número total de animais. **H** intensidade de GFAP na região do hilo em machos e fêmeas. **I** imagens representativas do GFAP na região do hilo. **J** Intensidade de GFAP no giro denteado considerando o número total de animais. **K** Intensidade de GFAP no giro denteado em machos e fêmeas. **L** imagens representativas do GFAP na região do hilo. **A-D-G-J** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. **B-E-H-K** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). * Diferenças entre os as idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por cada janela temporal e sexo). Barra de calibração em 100 μ m.

4.11 Em DPN1 e em adultos a intensidade neuronal é menor do que nos outros períodos avaliados

A quantificação do NeuN no hipocampo demonstrou que na região CA1 e CA3 os animais DPN1 apresentaram menor quantidade neuronal quando comparado com os roedores DPN7, DPN14 e DPN21, ($H_{(4)}=23,140$ e $H_{(4)}=21,607$, respectivamente, $p=0,0001$; Figura 15A,D). No hilo e giro denteado, os animais DPN1 apresentaram menor intensidade de fluorescência em comparação com o DPN7 ($H_{(4)}=17,701$, $H_{(4)}=13,285$, $p=0,001$ e $p=0,01$, respectivamente; Figura 15G,J). Ao analisar individualmente cada sexo, apenas na região CA3, os roedores machos DPN1 tiveram menor intensidade do marcador em comparação com os outros períodos estudados, sem diferenças significativas nas outras áreas do hipocampo ($H_{(4)}=28,660$, $p=0,0001$; Figura 15B,D,F,H e Figura 20C,F,I,L). Nas fêmeas DPN1, a intensidade das células neuronais também foi menor quando comparadas às outras idades nas regiões CA1 e CA3, 3, enquanto no hilo essa diferença foi observada desde o DPN7 até o DPN21, e no giro denteado foi menor entre DPN14 e DPN21. Adicionalmente, os animais DPN60 apresentaram níveis reduzidos em relação ao DPN21 nas regiões de CA1 e CA3 ($H_{(4)}=67,135$ CA1; $H_{(4)}=80,814$; $H_{(4)}=60,627$ Hilo e $H_{(4)}=22,826$ Giro denteado, $p=0,0001$; Figura 15B,D,F,H e Figura 20 C,F,I,L; Tabela 1)







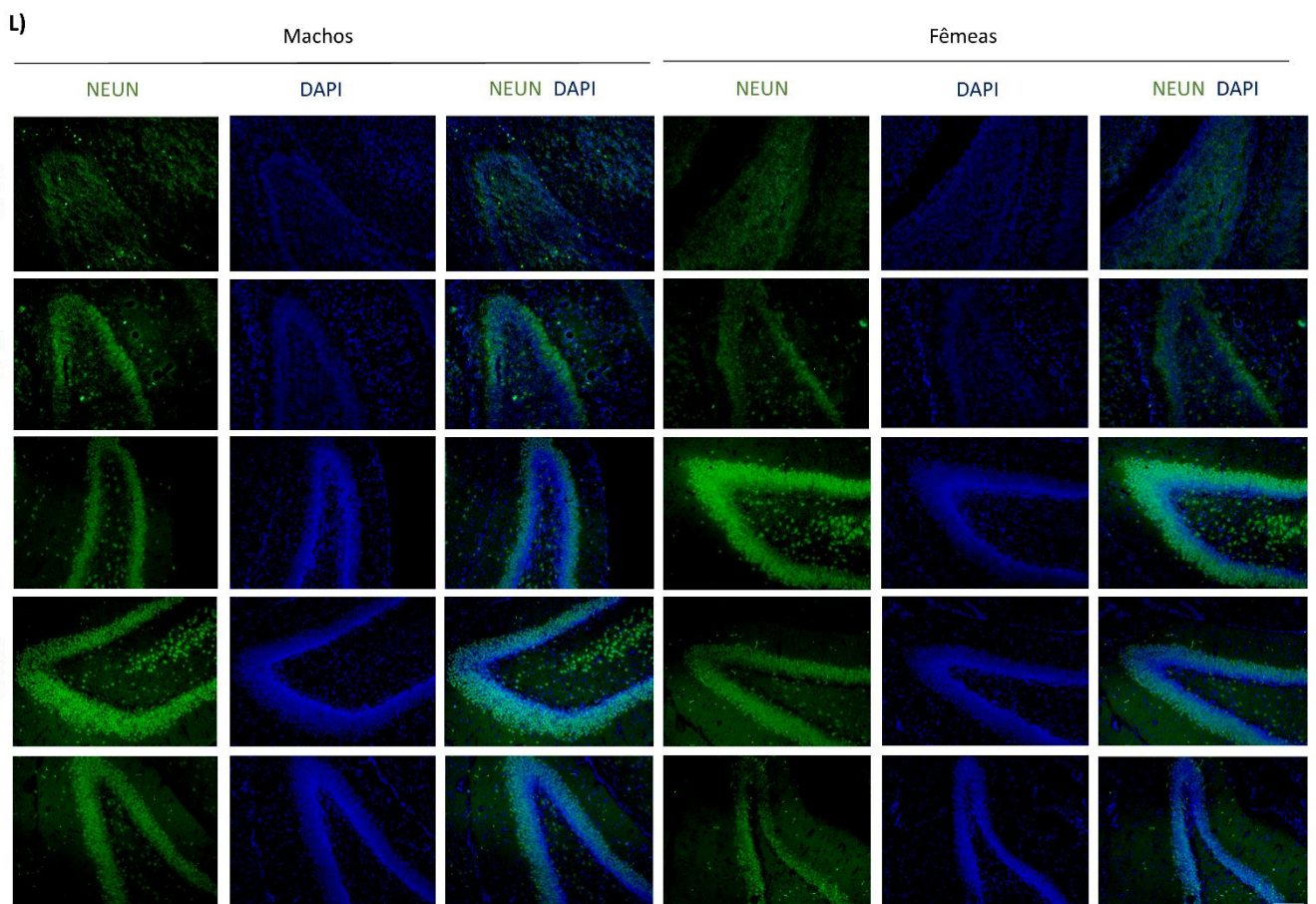
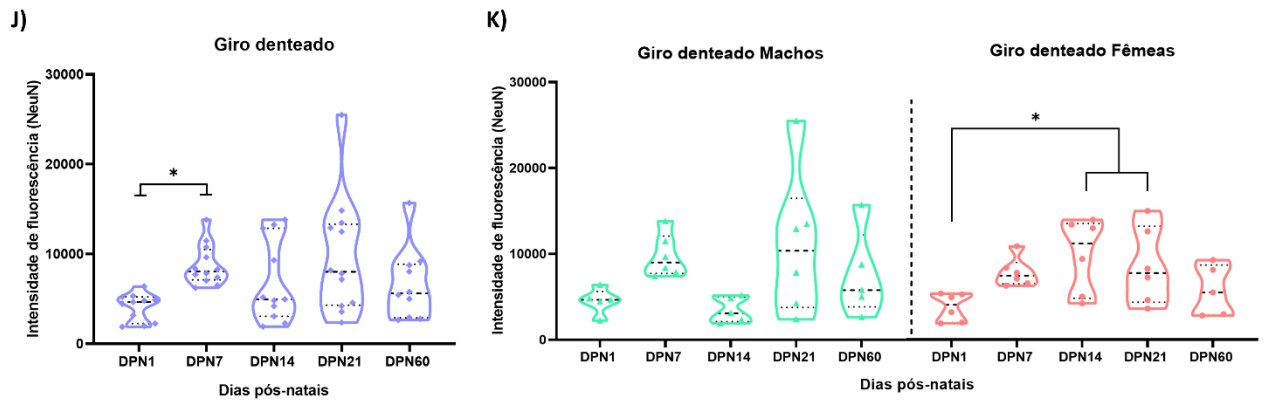


Figura 15: Quantificação do antígeno nuclear neuronal (NeuN) nas regiões hipocâmpais durante o neurodesenvolvimento. **A** intensidade de fluorescência do NeuN na região CA1 considerando todos os animais do experimento. **B** intensidade de fluorescência do NeuN em CA1 nos animais machos e fêmeas. **C** imagens representativas da região CA1. **D** quantificação do NeuN na região CA3

mediante o número total de animais. **E** intensidade de fluorescência de NeuN na região do CA3 em ambos os sexos. **F** imagens representativas da região CA3. **G** Intensidade de NeuN na região do hilo mediante o número total de animais. **H** Intensidade de NeuN na região do hilo em machos e fêmeas. **I** imagens representativas da região do hilo. **J** intensidade de NeuN no giro denteado considerando o número total de animais. **K** intensidade de NeuN no giro denteado em machos e fêmeas. **L** imagens representativas da região do giro denteado. **A-D-G-J** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. **B-E-H-K** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). Barra de calibração em 100 μ m. * Diferenças entre os as idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por cada janela temporal e sexo).

4.12 Os níveis de MCT1 não foram alterados significativamente durante o desenvolvimento cerebral no corpo caloso

A análise do MCT1 não constatou diferenças significativas no corpo caloso entre as idades avaliadas (região superior: $H_{(4)}=10,310$ e região inferior: $H_{(4)}=6,107$, $p > 0,05$, Figura 16A,C). Do mesmo modo, não foi evidenciada uma interação entre os fatores ($H_{(4)}=3,545$ e $H_{(4)}=2,836$, $p > 0,05$), nem um efeito isolado do sexo ($H_{(1)}=0,220$ e $H_{(1)}=0,084$, $p > 0,05$) ou idade ($H_{(4)}=7,524$ e $H_{(4)}=8,163$, $p > 0,05$, Figura 16B,D, 17 E,F; Tabela 1).

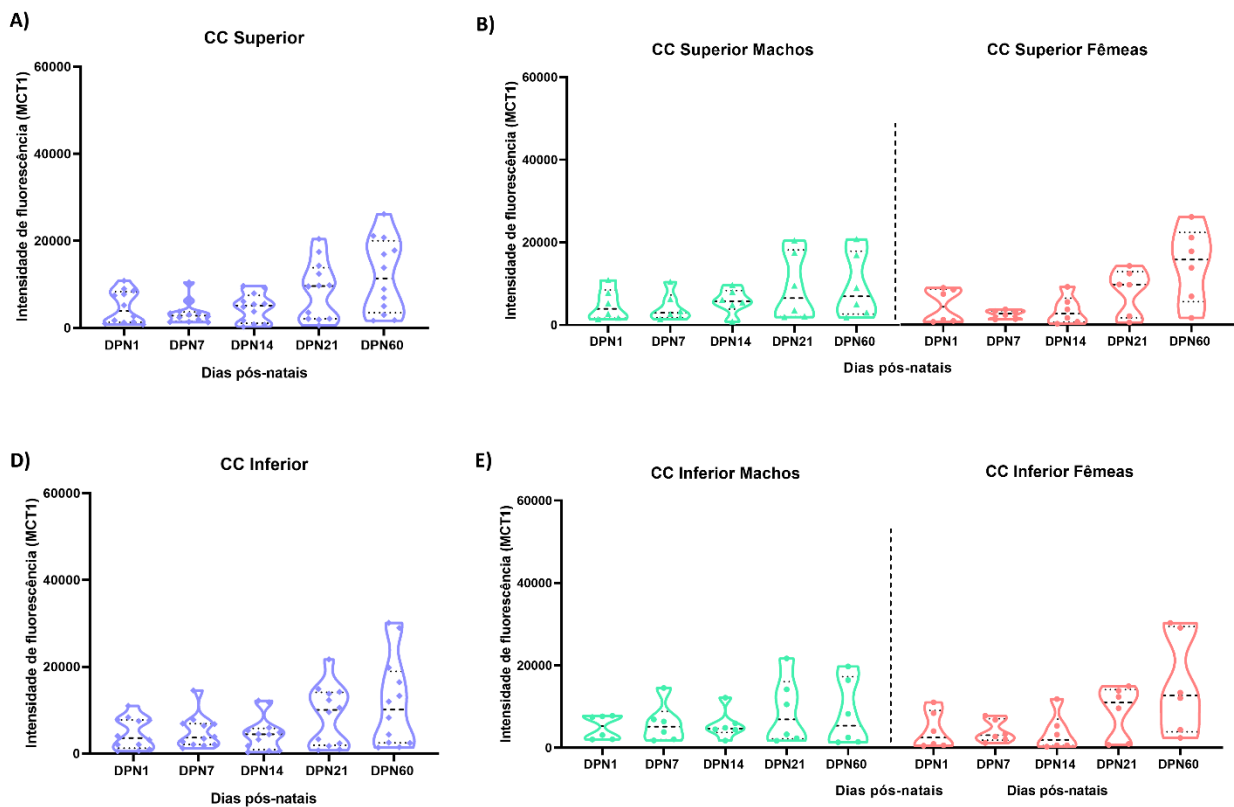
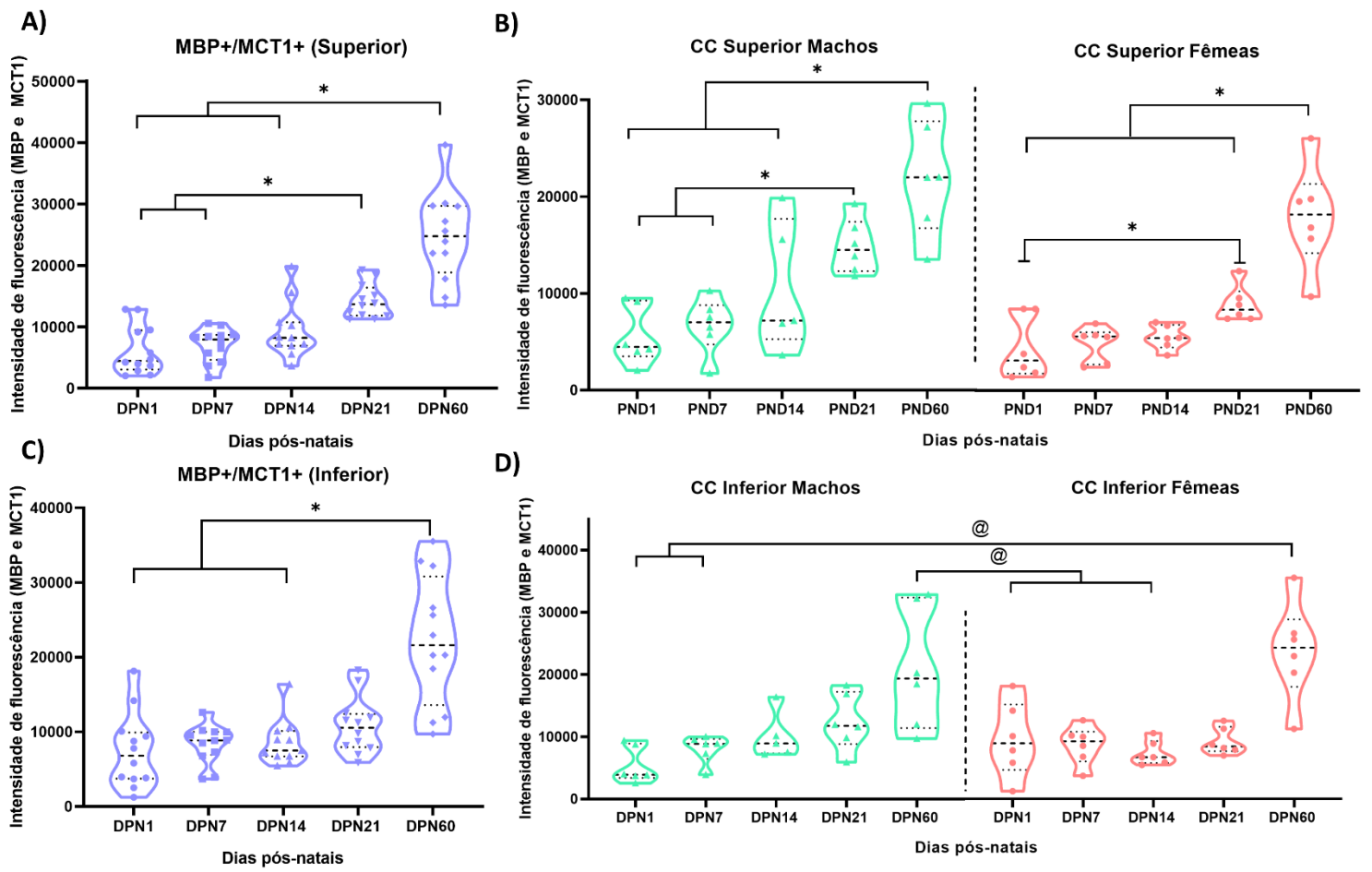


Figura 16: Quantificação do MCT1 no corpo caloso. **A** Intensidade de fluorescência do MCT1 na região superior do CC considerando todos os animais. **B** Intensidade de fluorescência do MCT1 na região superior do CC nos animais machos e fêmeas. **C** Intensidade de fluorescência do MCT1 na região inferior do CC considerando todos os animais. **D** Intensidade de fluorescência do MCT1 na região inferior do CC nos animais machos e fêmeas. **A-C** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. **B-D** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). Não houve diferenças significativas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 ($n=6$ por cada janela temporal e sexo).

4.13 A colocalização de MBP e MCT1 aumentou durante a maturação cerebral

A avaliação de colocalização entre MBP e MCT1 demonstrou aumento nos animais DPN60 em relação aos neonatos DPN1, DPN7 e DPN14 em ambas as regiões do corpo caloso, do mesmo modo que os animais DPN21 em comparação aos DPN1 e DPN7 (Região superior: $H_{(4)}=39,590$, $H_{(4)}=24,488$, $p=0,001$; Figura 17A,C). A análise GLZM referente à intensidade de células duplamente positivas para MBP e MCT1 evidenciou uma interação entre os fatores (idade e sexo) na região inferior do corpo caloso, apresentando a colocalização aumentada nos animais machos e fêmeas DPN60 quando comparados com o DPN1 e DPN7, mas também os DPN60 machos em relação as ratas fêmeas DPN14 ($H_{(4)}=9,613$, $p=0,047$; Figura 17D,F). A análise independente em cada sexo demonstrou que os animais machos DPN60 apresentaram maior colocalização entre os marcadores quando comparado aos indivíduos DPN1, DPN7 em ambas as regiões avaliadas, mas também em relação a DPN14 na região superior do corpo caloso (Região superior: $H_{(4)}=42,298$; Figura 17B,D,E,F). Além disso, os machos DPN21 também exibiram um aumento na dupla marcação quando comparados aos DPN1 e DPN7 na região superior. Em adição, as ratas fêmeas PND60 tiveram maior colocalização que os outros períodos avaliados ($H_{(4)}=53,102$, Região superior; $H_{(4)}=29,309$; Figura 17B,D,E,F; Tabela 1).



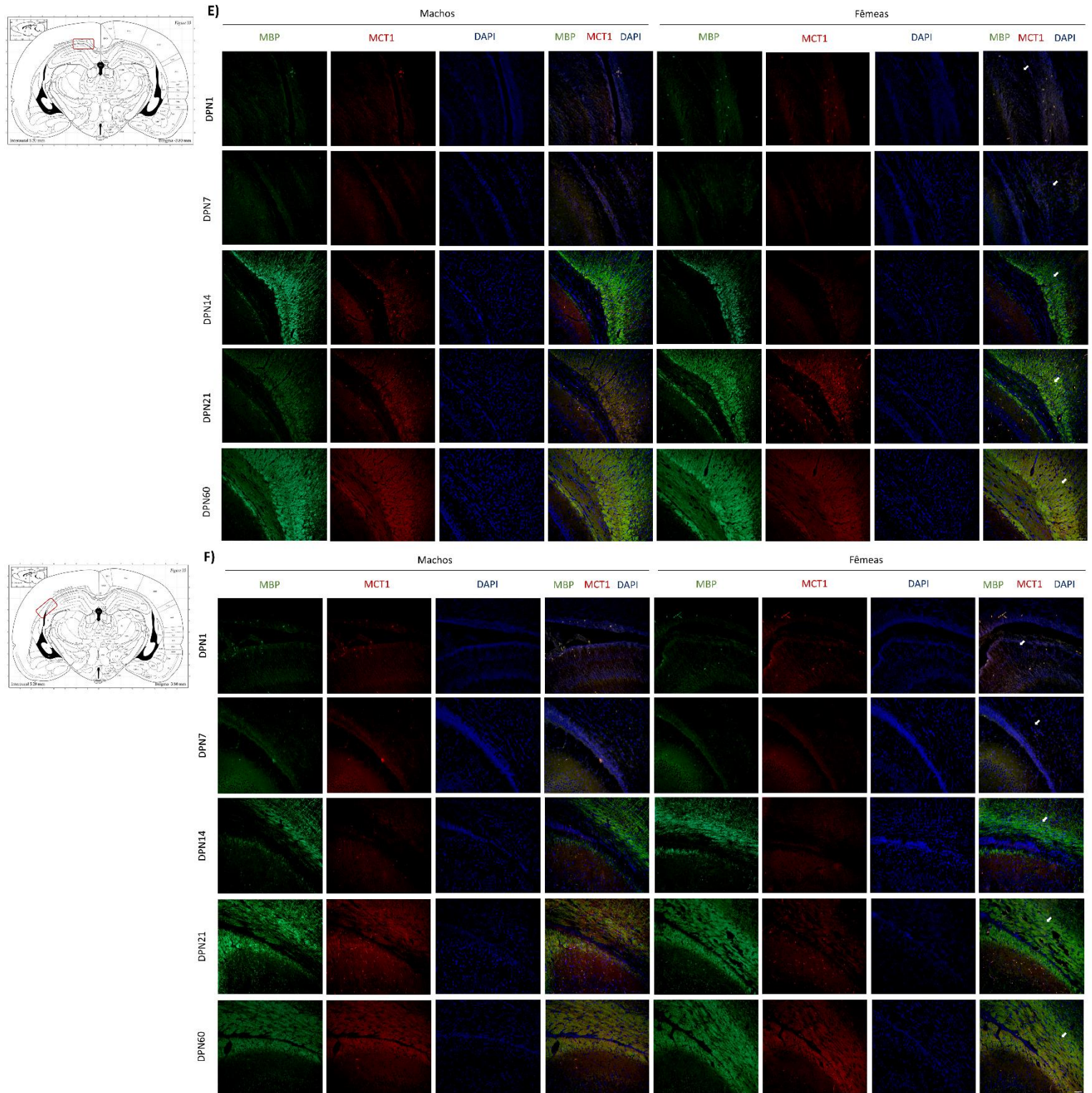


Figura 17: Imunomarcaco MBP e MCT1. **A** intensidade da colocalizao positiva na regio superior do corpo caloso considerando todos os animais do estudo. **B** intensidade da colocalizao positiva na regio superior do corpo caloso, nos animais machos e fêmeas. **C** intensidade da colocalizao positiva na regio inferior do corpo caloso considerando todos os animais do estudo. **D** intensidade da colocalizao positiva na regio inferior do corpo caloso, em ambos os sexos

ao longo da maturação cerebral. **E** imagens representativas dos marcadores na região superior do corpo caloso. **F** Imagens representativas dos marcadores na região inferior do corpo caloso. **A-B** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM), cujo resultados constituíram em mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=6 por grupo). Barra de calibração em 100µm. Seta branca: Indicam a colocação positiva. *Diferenças entre as idades. @Interação entre os fatores (sexo e idade). A diferença significativa aceita foi $p < 0,05$.

4.14 Os níveis do MCT4 permanecem relativamente estáveis ao longo da maturação cerebral

A análise dos dados não evidenciou diferenças entre os períodos pós-natais nas regiões CA1, CA3 e Hilo (CA1: $H_{(4)}=4,927$; CA3: $H_{(4)}=0,441$; Hilo: $H_{(4)}=0,857$, $p > 0,05$; Figura 18A,C,E). Entretanto, na região do giro denteado, os animais DPN1 tiveram maiores níveis quando comparado com DPN21 ($H_{(4)}=8,674$, $p=0,049$; Figura 18G). Ao considerar possíveis diferenças sexo específicas, o modelo GZLM não mostrou interação entre os fatores idade e sexo nas regiões avaliadas na pesquisa (CA1: $H_{(4)}=1,704$; CA3: $H_{(4)}=2,996$; Hilo: $H_{(4)}=7,772$ e Giro denteado: $H_{(4)}=6,729$, $p > 0,05$; Figura 18B,C,D,E,F,H,I,K,L e 19C,F,I,L). Similarmente, não houve diferenças significativa entre sexos (CA1: $H_{(1)}=0,720$; CA3: $H_{(1)}=0,746$; Hilo: $H_{(1)}=1,264$, Giro denteado: $H_{(1)}=1,870$, $p > 0,05$), nem entre as idades (CA1: $H_{(4)}=14,631$; CA3: $H_{(4)}=1,498$; Hilo: $H_{(4)}=1,203$ e Giro denteado: $H_{(4)}=14,276$), $p > 0,05$; Figura 18B,C,D,E,F,H,I,K,L e 19C,F,I,L; Tabela 1)

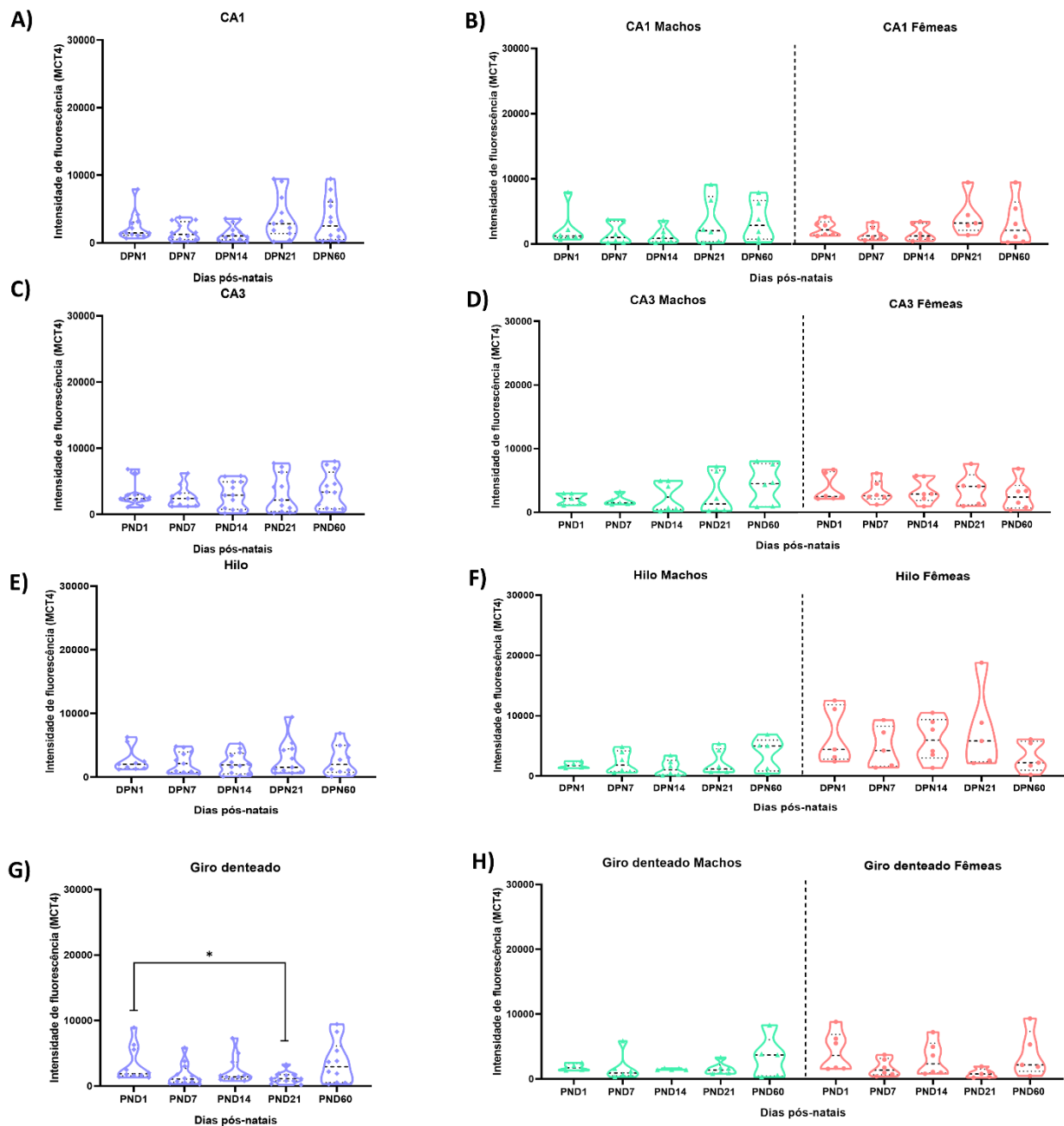
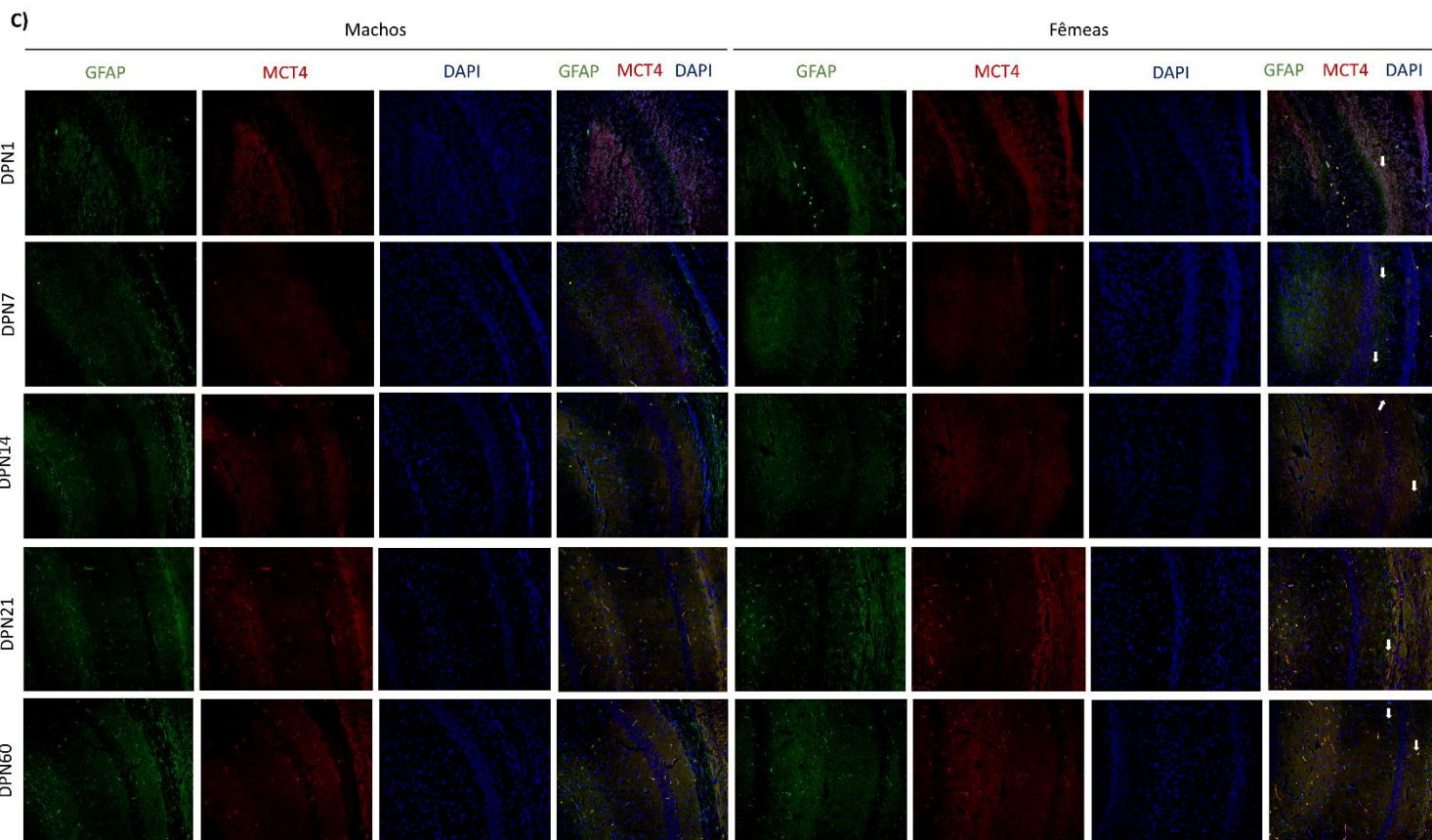
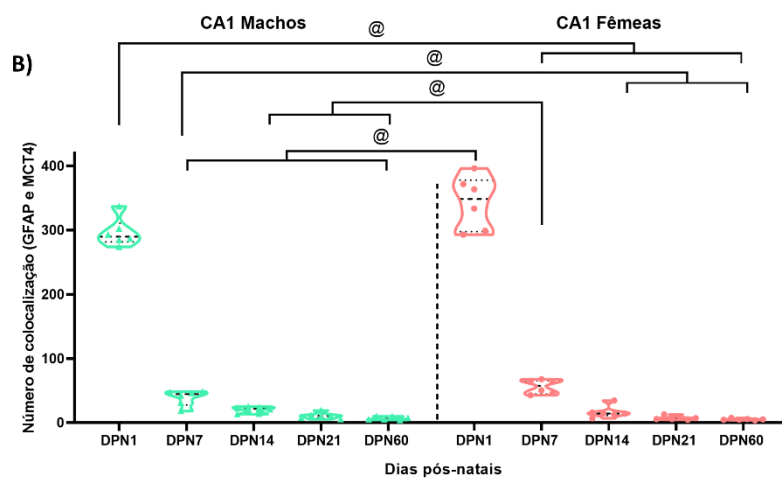
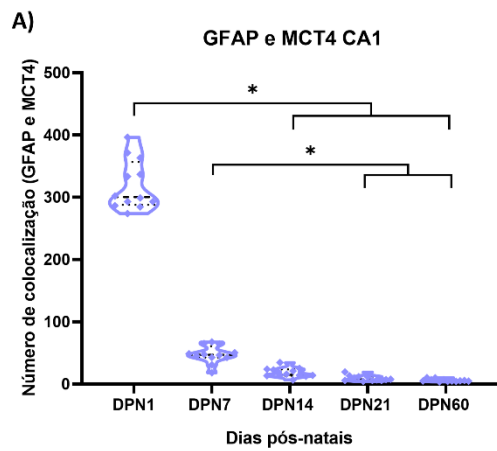


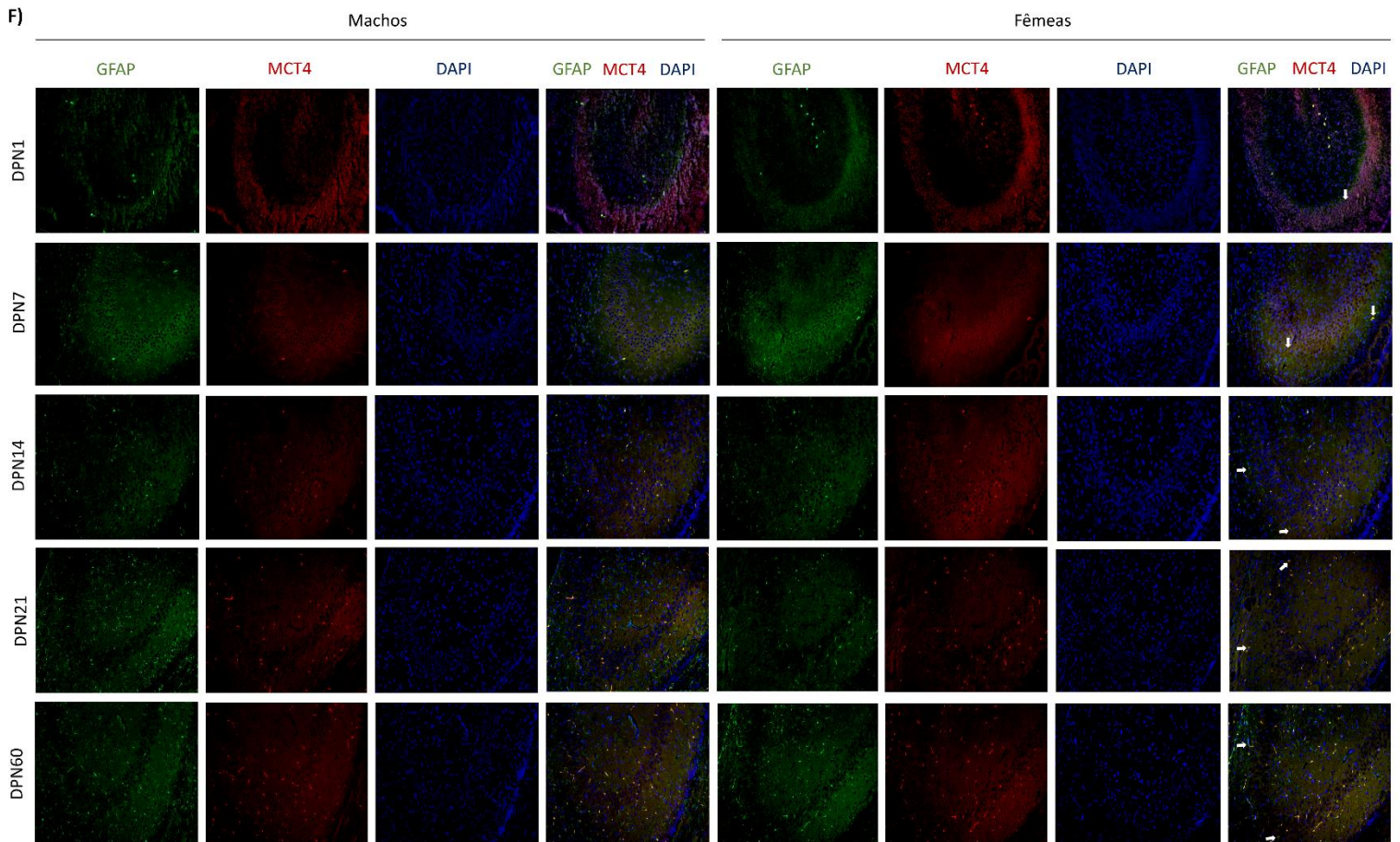
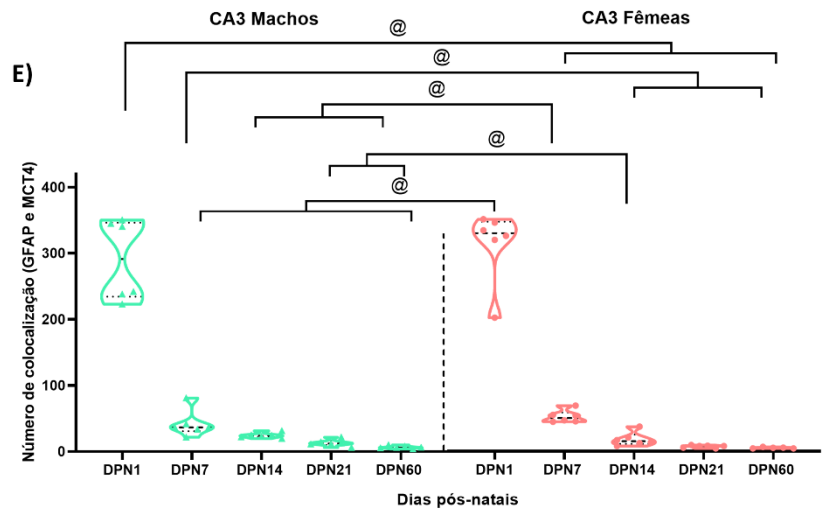
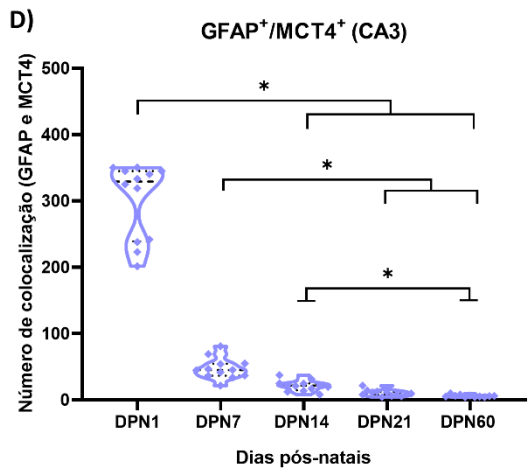
Figura 18: Imunofluorescência MCT4 nas regiões hipocâmpais. **A** Quantificação de MCT4 na região CA1 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **B** Análise da quantidade de MCT4 nos animais machos e fêmeas na região CA1. **C** Quantificação de MCT4, na região CA3 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **D** Análise da quantidade de MCT4 nos animais machos e fêmeas na região CA3. **E** Quantificação de MCT4, na região do hilo considerando o número total de animais usados no estudo. **F** Análise da quantidade de MCT4 nos animais machos e fêmeas na região do hilo. **G** Quantificação de MCT4, na região do giro denteado, de acordo com o número

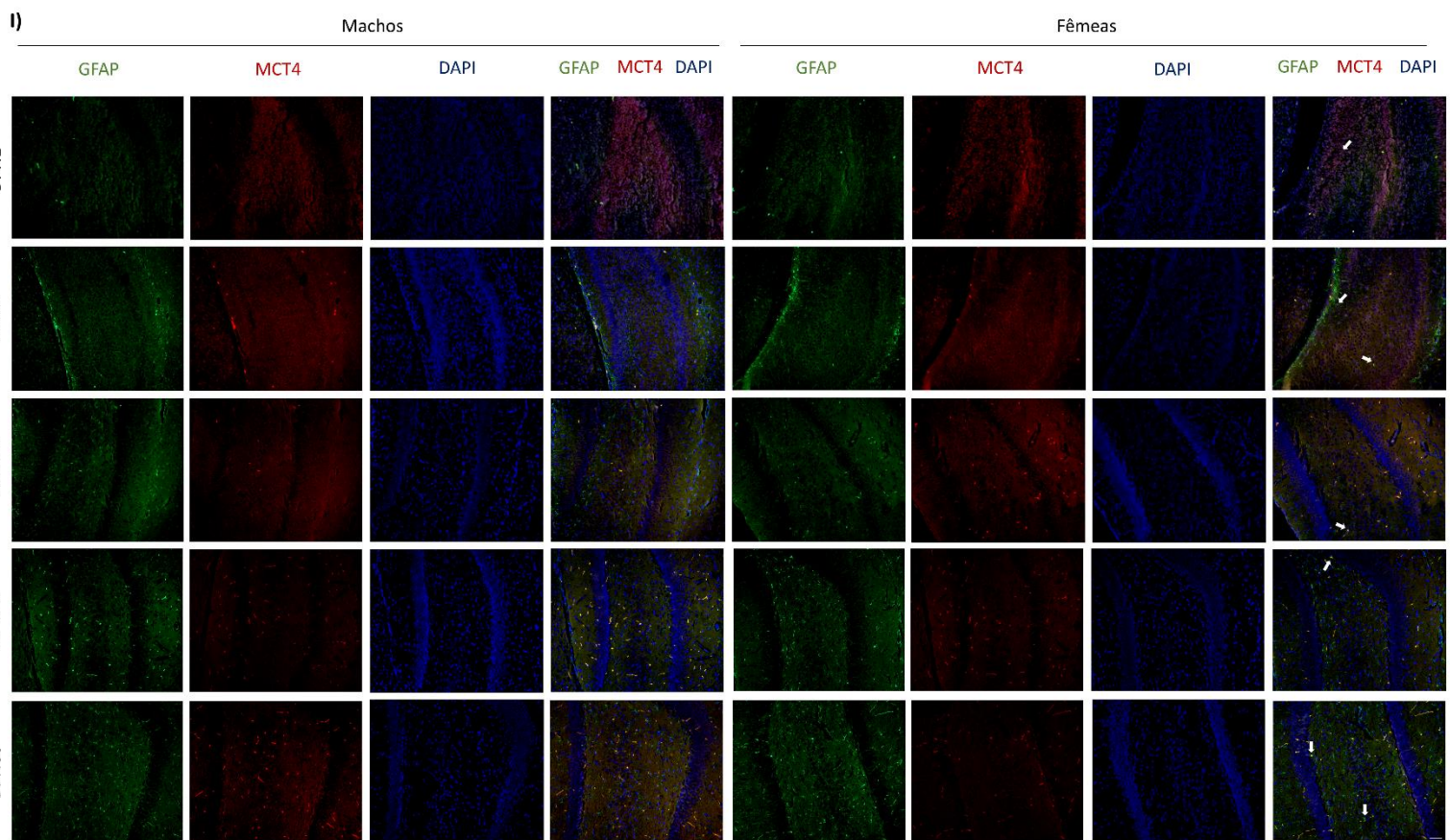
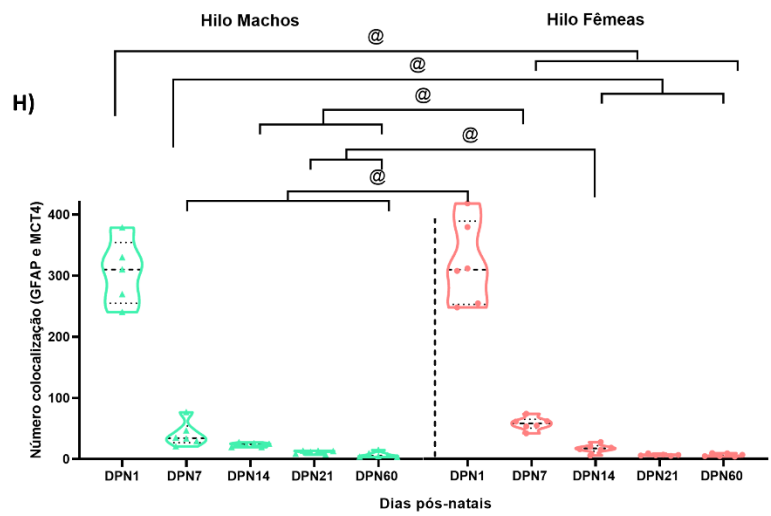
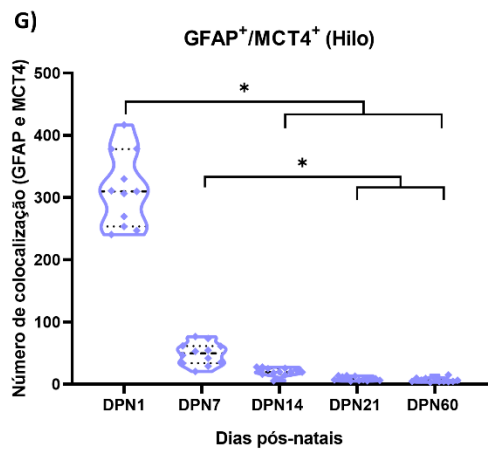
total de animais usados no experimento. **H** Análise da quantidade de MCT4 nos animais machos e fêmeas na região do giro denteado. **A-C-E-G** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparação múltipla. **B-D-F-H** Níveis de MCT4 nos machos e fêmeas ao longo do neurodesenvolvimento. As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GLZM). Barra de calibração em 100 μ m. * Diferenças entre os idades avaliadas. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por cada janela temporal e sexo).

4.15 A colocalização de GFAP e MCT4 diminuiu acentuadamente a partir do desmame

A análise de colocalização entre GFAP e MCT4 demonstraram que os animais DPN1 tiveram um maior número de células com dupla marcação positiva em comparação com os roedores DPN14, DPN21 e DPN60, em todas as regiões hipocâmpais, bem como os animais DPN7 em relação aos DPN21 e DPN60. Entretanto, nas regiões CA3 e giro denteado, os animais DPN14 apresentaram um aumento no número de colocalizações que DPN21 (CA1: $H_{(4)}=52,117$, CA3: $H_{(4)}=51,723$, Hilo: $H_{(4)}=50,957$, Giro denteado: $H_{(4)}=51,095$, $p=0,0001$, Figura 19 A,D,G,J). A análise pelo modelo GLZM demonstrou uma interação significativa entre idade e sexo. Tanto os machos quanto as fêmeas DPN1 tiveram maior colocalização que todas as outras idades avaliadas. As fêmeas DPN7 mostraram dupla marcação positiva aumentada quando comparadas aos machos DPN14, DPN21 e DPN60, do mesmo modo que as ratas fêmeas DPN14 em relação aos machos DPN21 e DPN60 (CA1: $H_{(4)}= 14,799$; CA3: $H_{(4)}= 15,921$; Hilo: $H_{(4)}= 14,930$; Giro denteado: $H_{(4)}= 20,399$, $p=0,0001$; Figura 19A-L; Tabela 1).







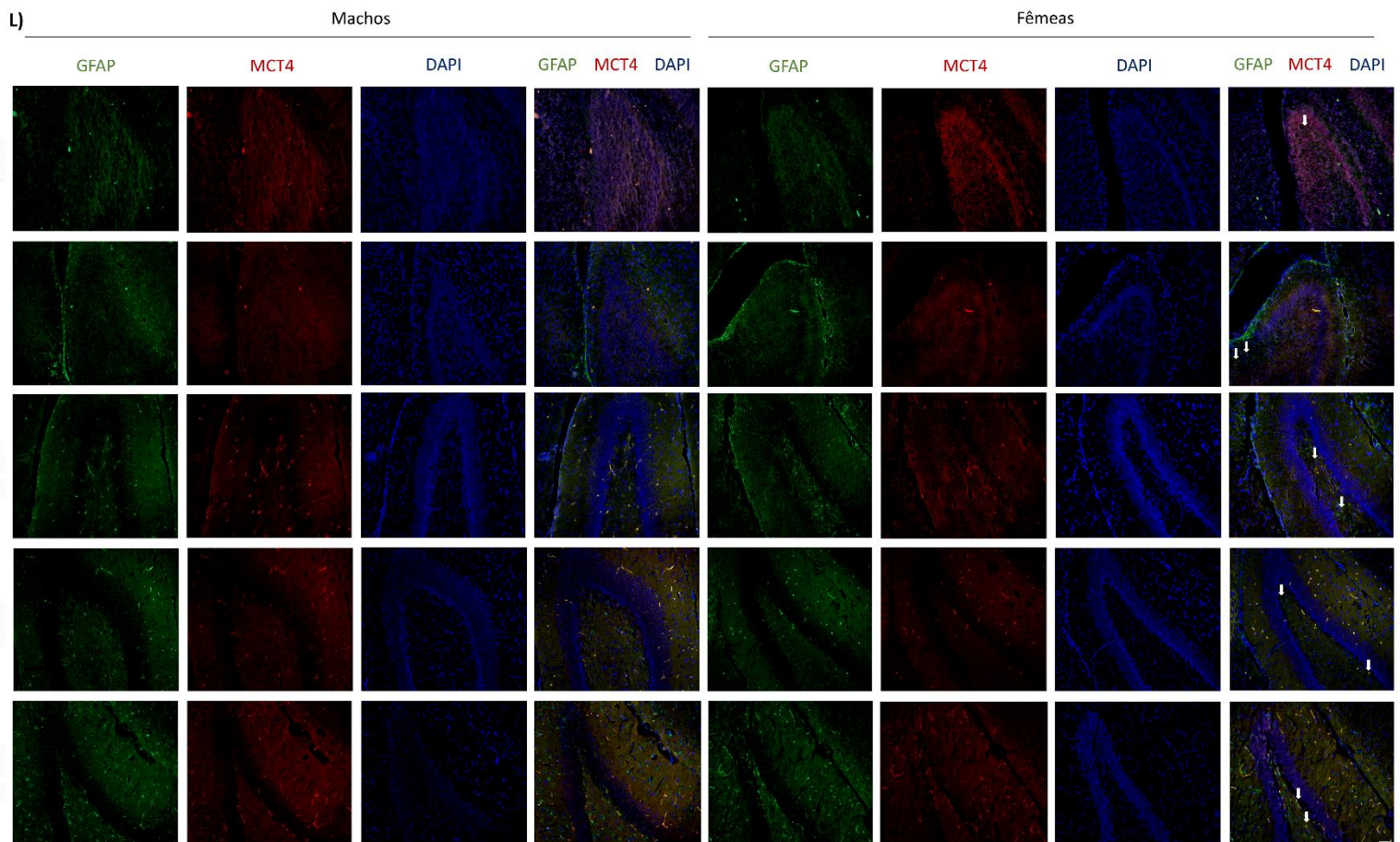
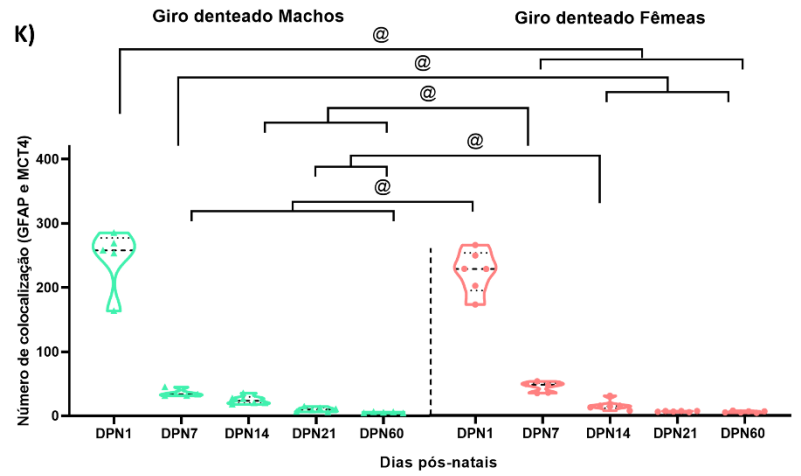
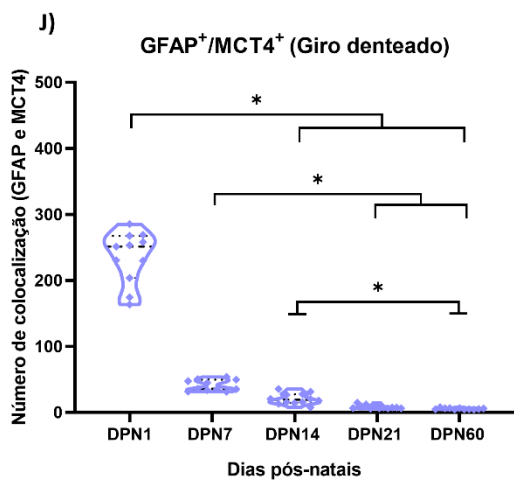


Figura 19: Colocalização GFAP e MCT4. **A** Colocalização positiva na região CA1 considerando todos os animais do estudo. **B** Colocalização positiva na região CA1 nos animais machos e fêmeas. **C** Imagens representativas dos marcadores na

região CA1 do hipocampo. **D** Colocalização positiva na região CA3 considerando todos os animais do estudo. **E** Colocalização positiva na região CA3 nos animais machos e fêmeas. **F** Imagens representativas dos marcadores na região CA3. **G** Colocalização positiva na região do Hilo considerando todos os animais do estudo. **H** Colocalização positiva na região CA3 nos animais machos e fêmeas. **I** Imagens representativas dos marcadores na região Hilo. **J** Colocalização positiva na região do giro denteado considerando todos os animais do estudo. **K** Colocalização positiva na região do giro denteado. **L** Imagens representativas dos marcadores na região do giro denteado. **A-D-G-J** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparação múltipla. **B-E-H-K** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM), cujo resultados constituíram em mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=6 por grupo). Barra de calibração em 100µm. Setas Branca: Indicam colocalização positiva. *Diferenças entre as idades. @Interação entre os fatores sexo e idade. A diferença significativa aceita foi $p < 0,05$.

4.16 A intensidade do MCT2 diminuiu consideravelmente a partir da segunda semana de vida dos neonatos

As análises evidenciaram que nas regiões CA1 e CA3 os animais DPN60 apresentaram menor quantidade do transportador quando comparado com os e DPN7, DPN14, mas também, em relação ao DPN1 no hilo e giro denteado. De modo semelhante, os animais DPN21 demonstraram uma menor intensidade de fluorescência do que os roedores DPN14 nas regiões CA1, CA3 e hilo, além de serem mais baixo em relação ao DPN1 no giro denteado (CA1: $H_{(4)}=22,829$; CA3: $H_{(4)}=25,161$; Hilo: $H_{(4)}=25,855$; Giro denteado: $H_{(4)}=30,232$, $p=0,0001$; Figura 20 A-C-E-G). O modelo GZLM não constatou interação entre sexo e idade ($H_{(4)}= 1,667$ CA1; $H_{(4)}=5,486$ CA3; $H_{(4)}=8,951$ Hilo; $H_{(4)}=6,599$ giro denteado, $p > 0,05$), mas interessante houve diferença entre os sexos apenas no giro denteado, com os machos possuindo maior quantidade do transportador do que as fêmeas ($H_{(1)}=4,763$, $p=0,029$; Figura 20B,D,F,H). Em contrapartida, os animais machos DPN60 exibiram valores menores de MCT2 em comparação com os neonatos DPN1 e DPN7 na região CA1, porém, entre DPN7 e DPN14 nas outras regiões hipocampais. De maneira semelhante,

os níveis do transportador estavam diminuídos nos ratos machos DPN21 em relação ao DPN7 em CA1 e DPN14 no hilo (CA1: $H_{(4)}=29,268$; CA3: 25,645; Hilo: $H_{(4)}=36,002$; Giro denteado: $H_{(4)}=24,111$, $p=0,0001$; Figuras 20B,D,F,H e 21C,F,I,L; Tabela 1). As fêmeas DPN1 e DPN7, por sua vez, possuem maior intensidade que os animais DPN60 nas regiões CA1 e giro denteado, enquanto que na região CA3, os animais DPN60 apresentaram níveis mais baixos em comparação aos DPN7 e DPN14. As ratas DPN21 apresentaram menor intensidade que as roedoras DPN1 nas regiões do hilo e giro denteado, mas também em relação aos DPN7 no giro denteado (CA1: $H_{(4)}=20,010$; CA3: $H_{(4)}=14,596$; Hilo: $H_{(4)}=22,846$; Giro denteado: $H_{(4)}=39,937$, $p=0,0001$; Figuras 20B,D,F,H e 21C,F,I,L; Tabela 1)

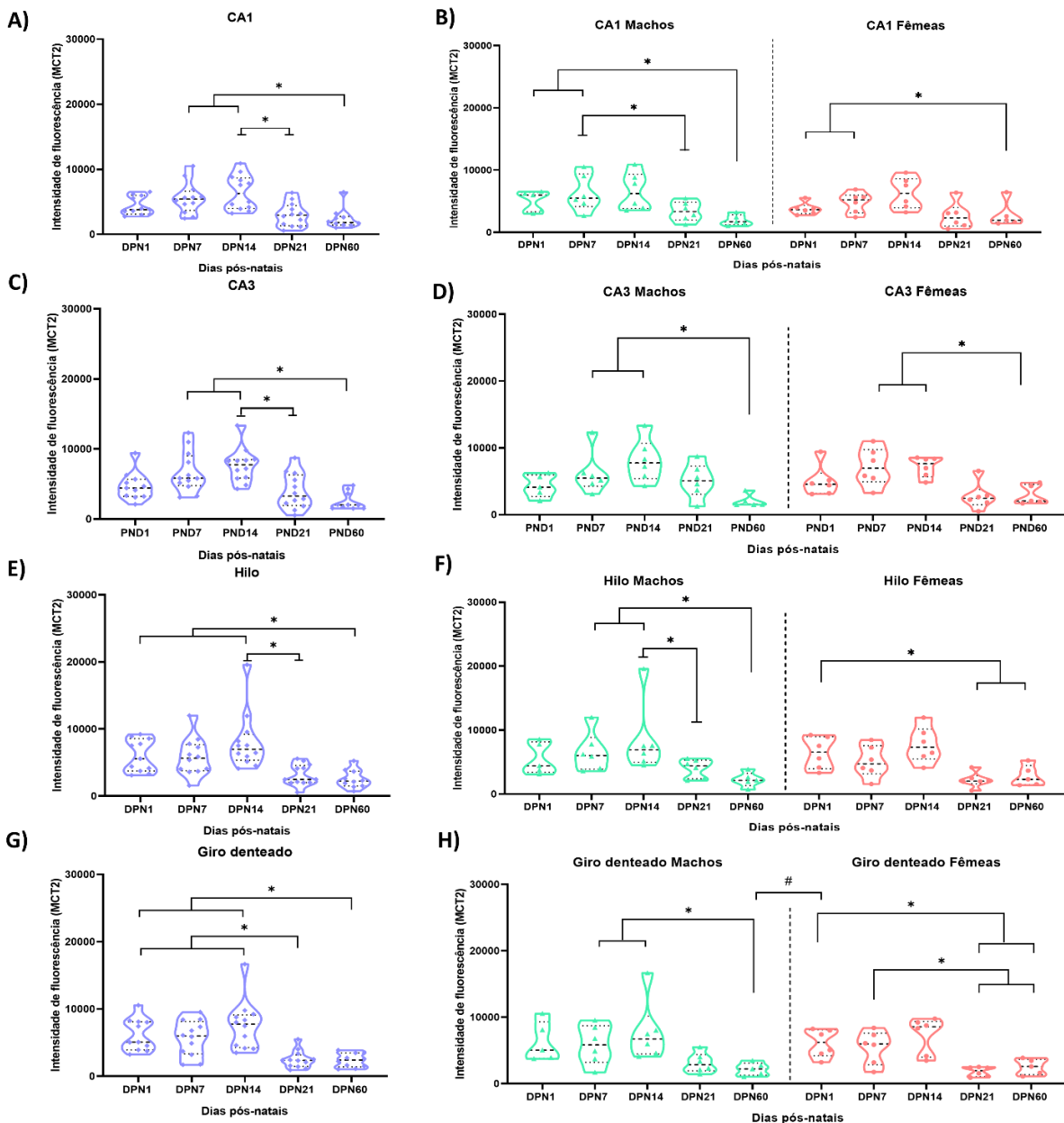
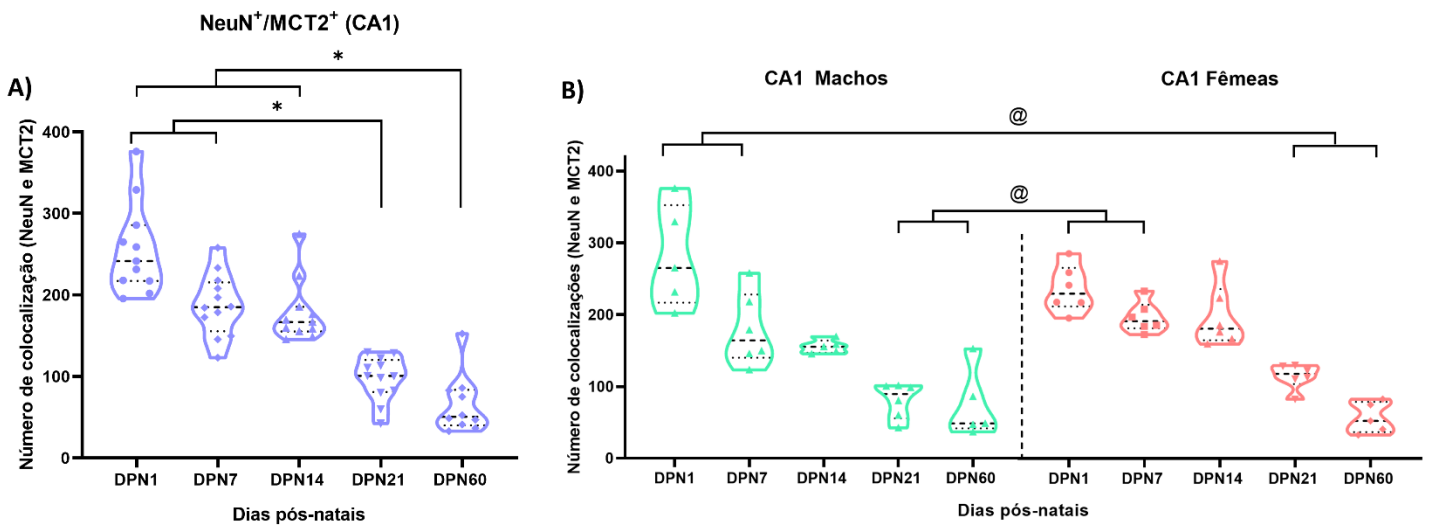


Figura 20: Imunofluorescência MCT2 no hipocampo. **A** Quantificação na região CA1 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **B** Análise da quantidade de MCT2 nos animais machos e fêmeas na região CA1. **C** Quantificação na região CA3 considerando o número total de animais usados no experimento **D** Análise dos roedores machos e fêmeas na região CA3. **E** Quantificação na região do Hilo levando em conta o número total de animais usados no experimento. **F** Análise dos ratos machos e fêmeas na região do Hilo. **G** Quantificação na região do giro denteado considerando o número total de animais usados no experimento. **H** Quantificação do transportador no giro denteado em ambos os sexos. **A-C-E-G** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparação múltipla. **B-D-F-H** Níveis de MCT4 nos machos e fêmeas ao longo do neurodesenvolvimento. As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). * Diferenças entre os as idades avaliadas. #Diferença entre os sexos. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por cada janela temporal e sexo)

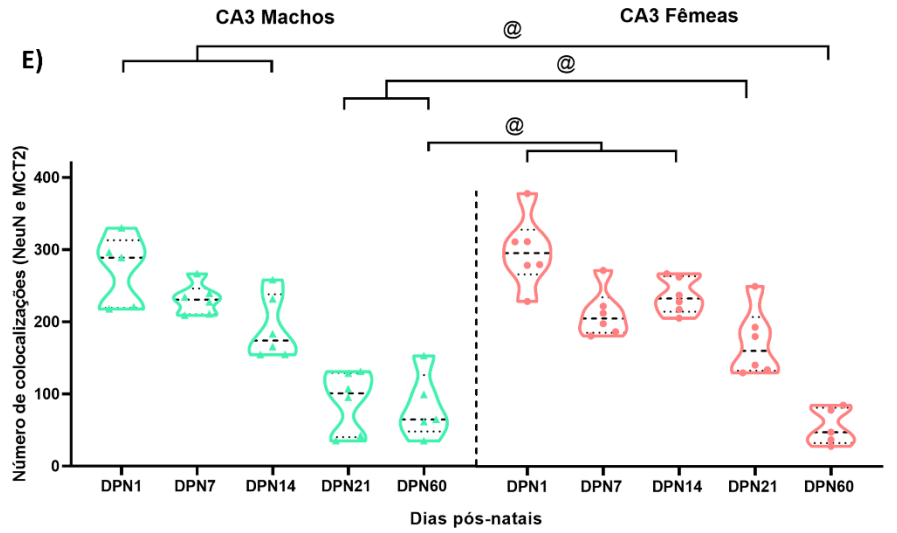
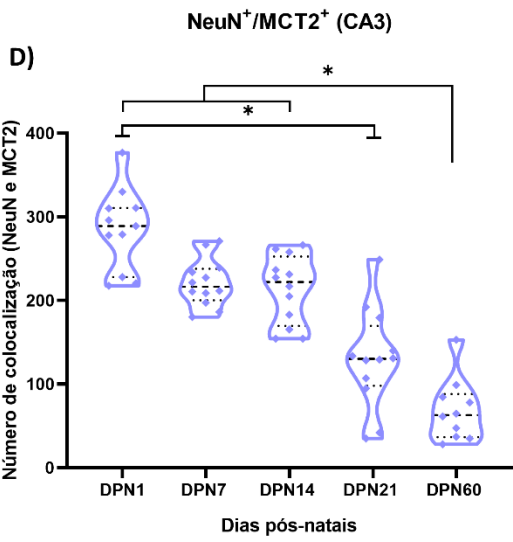
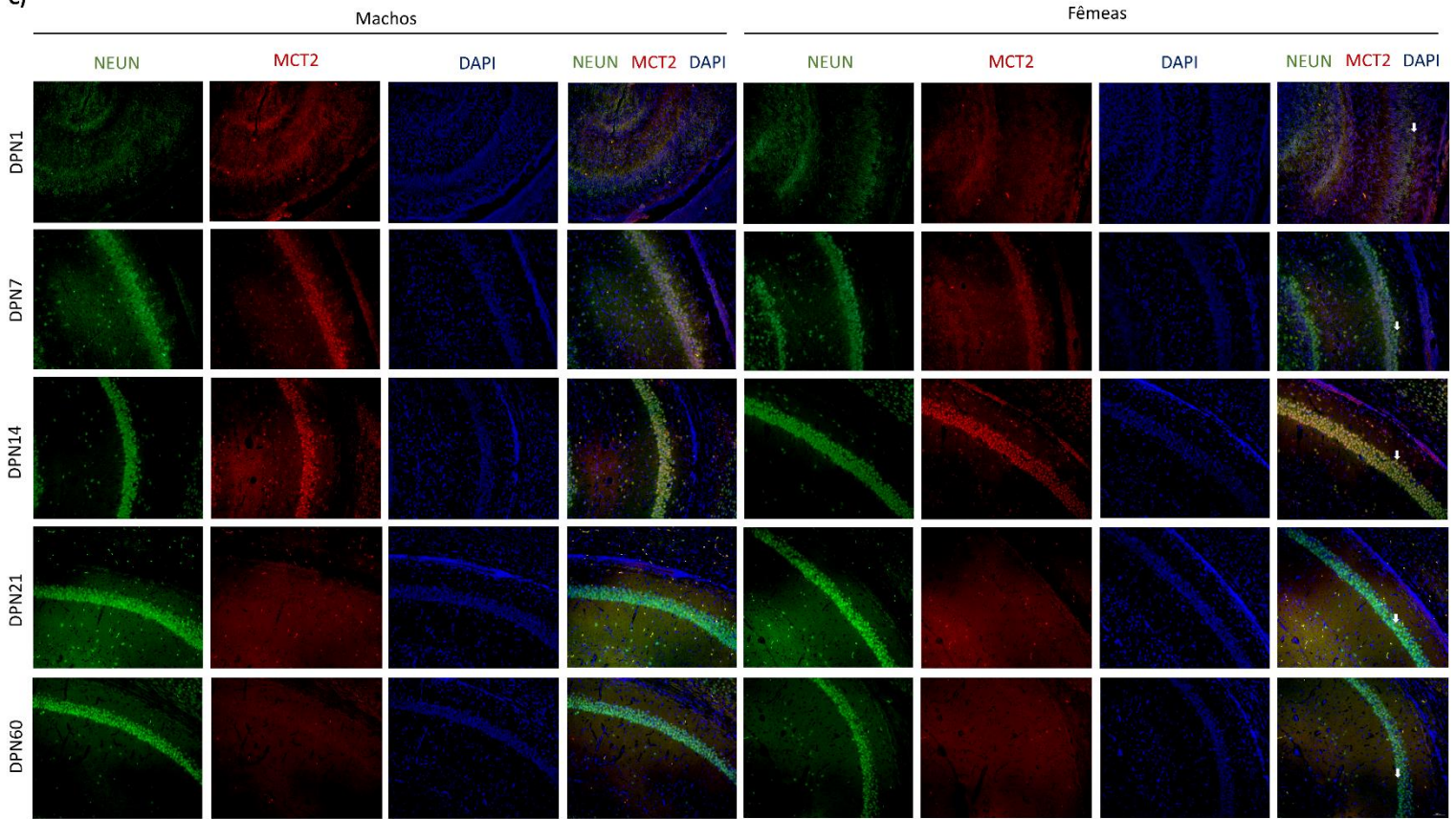
4.17 Houve diminuição acentuada da colocalização entre NeuN e MCT2 a partir do desmame

Os animais DPN60 apresentaram uma redução significativa na dupla marcação em comparação com os neonatos DPN1, DPN7 e DPN14 em todas as regiões hipocâmpais avaliadas, do mesmo modo que os animais DPN21 em relação aos DPN1 e DPN7 nas regiões CA1 e hilo, bem como em relação com os animais DPN1 no giro denteado e CA3 (CA1: $H_{(4)}=43,856$; CA3: $H_{(4)}=40,801$; Hilo: $H_{(4)}=32,850$ e Giro denteado: $H_{(4)}=28,313$, $p=0,0001$, Figura 21A,D,G,J). As análises GLZM não evidenciaram diferenças entre os sexos em nenhuma das regiões, mas demonstrou interação entre os fatores (sexo e idade). Os animais DPN60 machos e fêmeas apresentaram menor colocalização que os DPN1 e DPN7 em todas as regiões avaliadas. Ademais, nas regiões CA3, hilo e giro denteado, os animais adultos, de ambos os sexos também demonstraram o número de colocalização diminuído em relação aos animais DPN14.

Apenas nas regiões do hilo e giro denteado, as fêmeas DPN60 mostraram menor dupla marcação que os machos DPN21 e DPN60. Em contrapartida, as fêmeas DPN21 tiveram a colocalização aumentada quando comparadas aos animais machos DPN60 e DPN21 na região CA3, enquanto que as ratas fêmeas DPN7 e DPN14 também se apresentaram aumentadas em comparação aos machos DPN21 e DPN60 (CA1: $H_{(4)}=11,561$, $p=0,021$; CA3: $H_{(4)}=20,835$, $p=0,0001$; Hilo: $H_{(4)}=37,828$, $p=0,0001$ e Giro denteado: $H_{(4)}=48,342$, $p=0,0001$; Figura 21B,C,E,F,H,I,K,L).



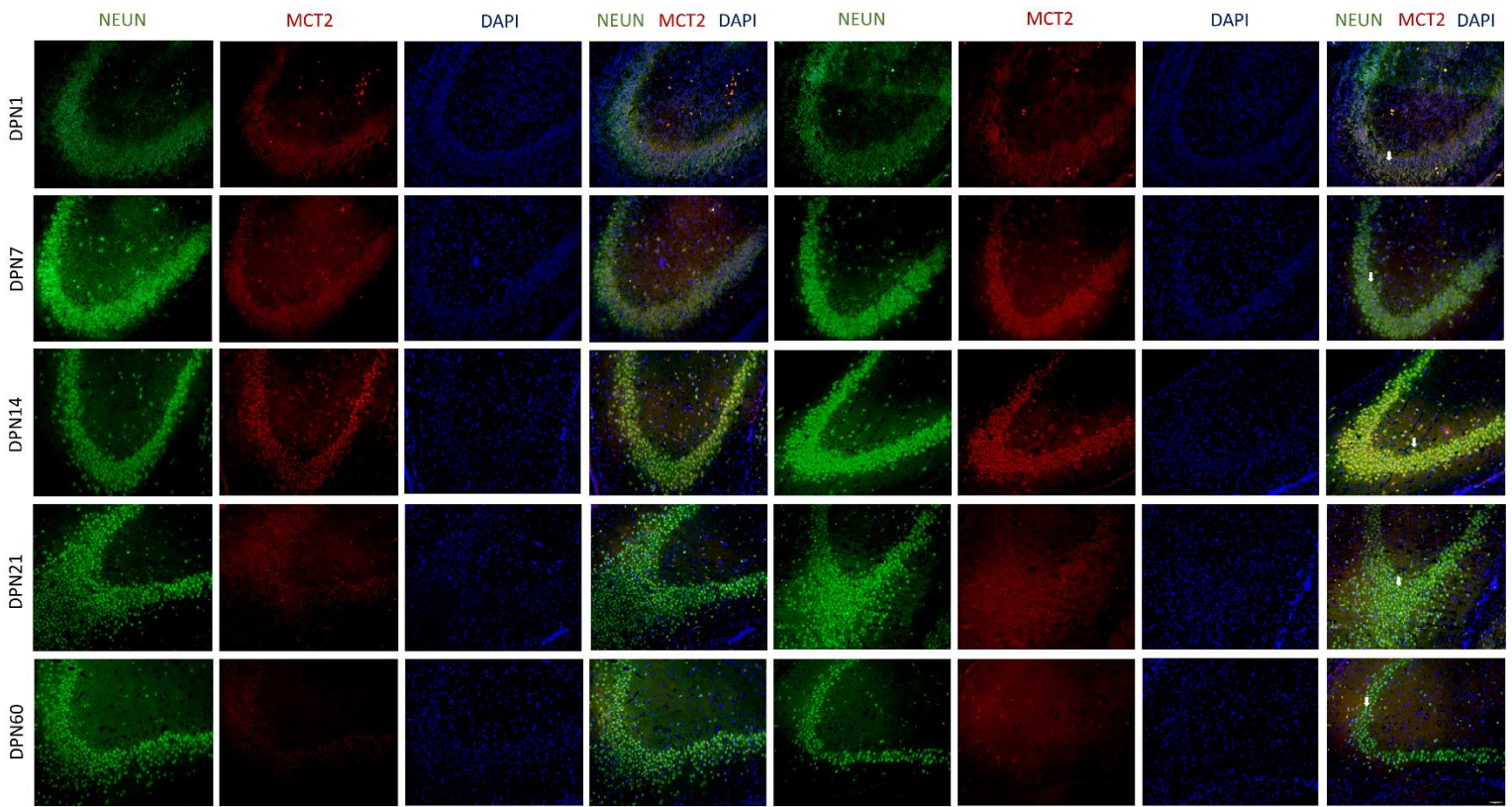
C)



F)

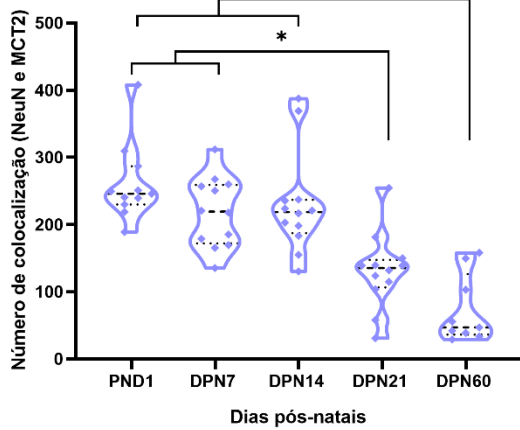
Machos

Fêmeas



G)

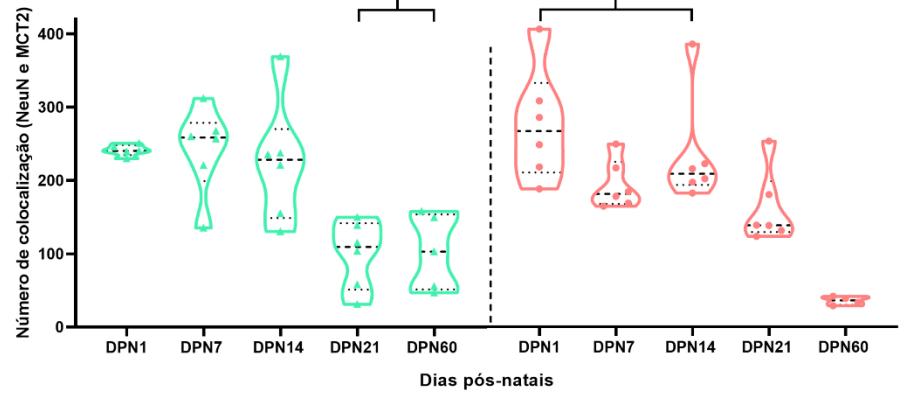
NeuN⁺/MCT2⁺ (Hilo)



H)

Hilo Machos

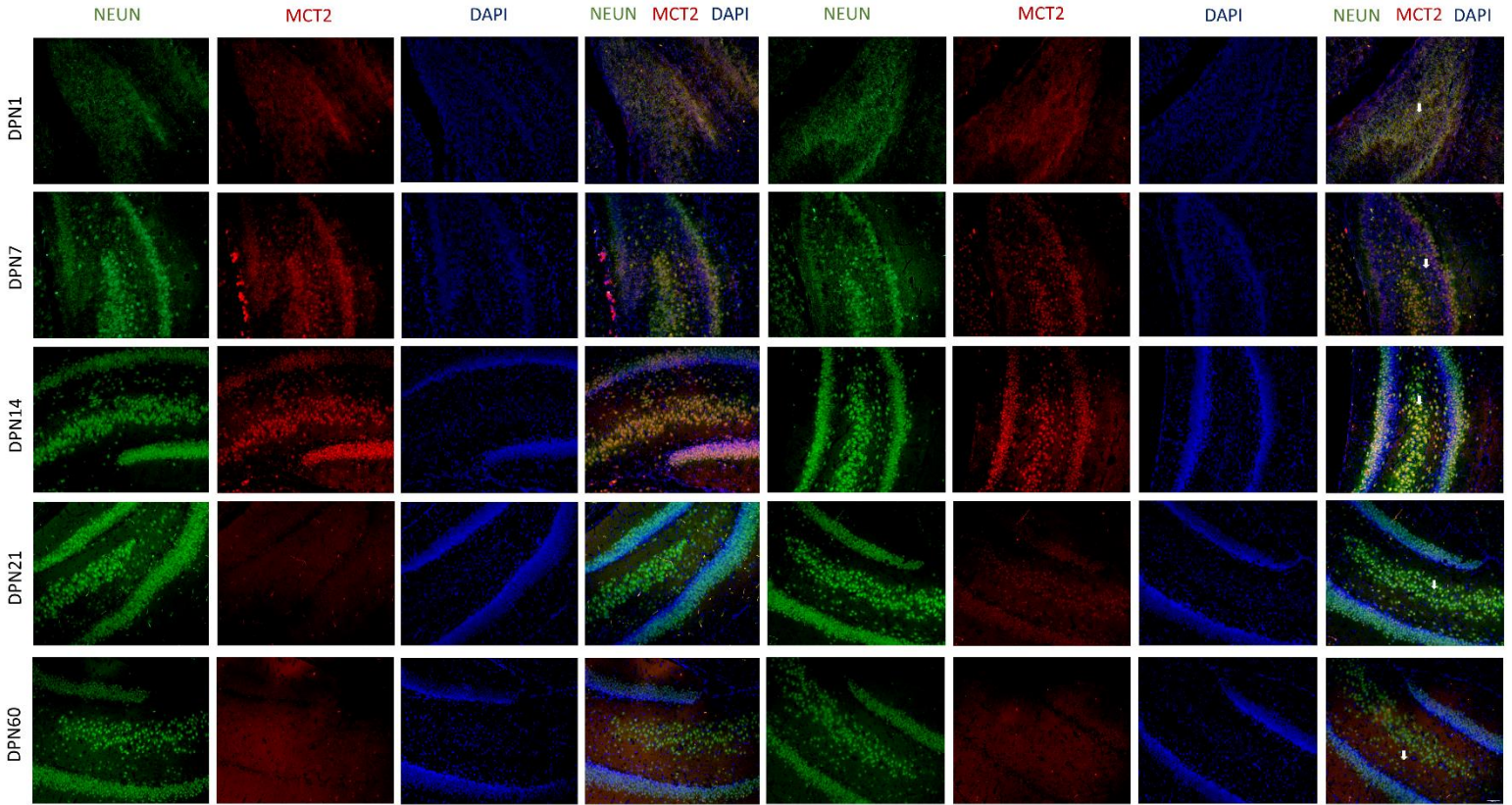
Hilo Fêmeas



i)

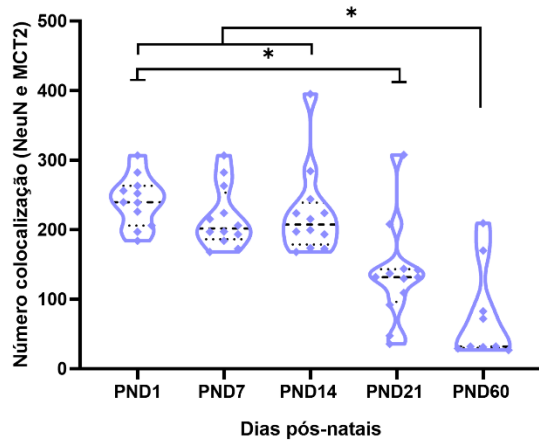
Machos

Fêmeas



J)

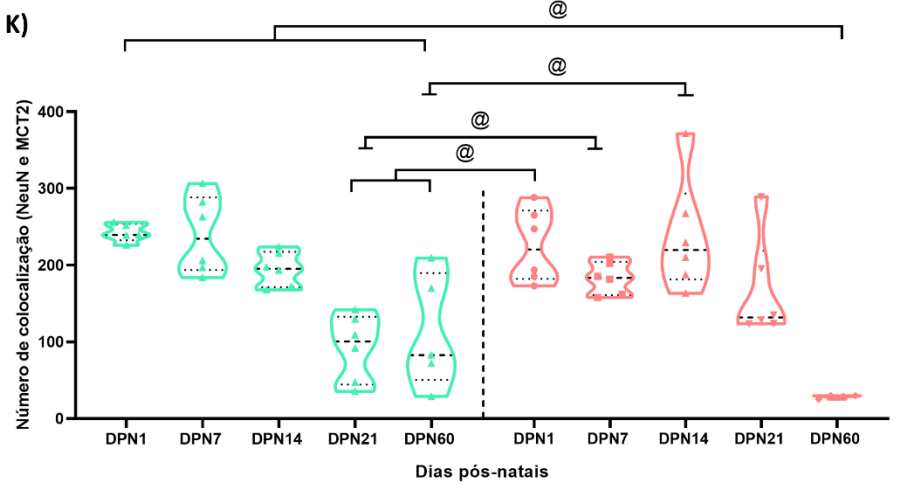
NeuN⁺/MCT2⁺ (Giro denteado)



K)

Giro denteado Machos

Giro denteado Fêmeas



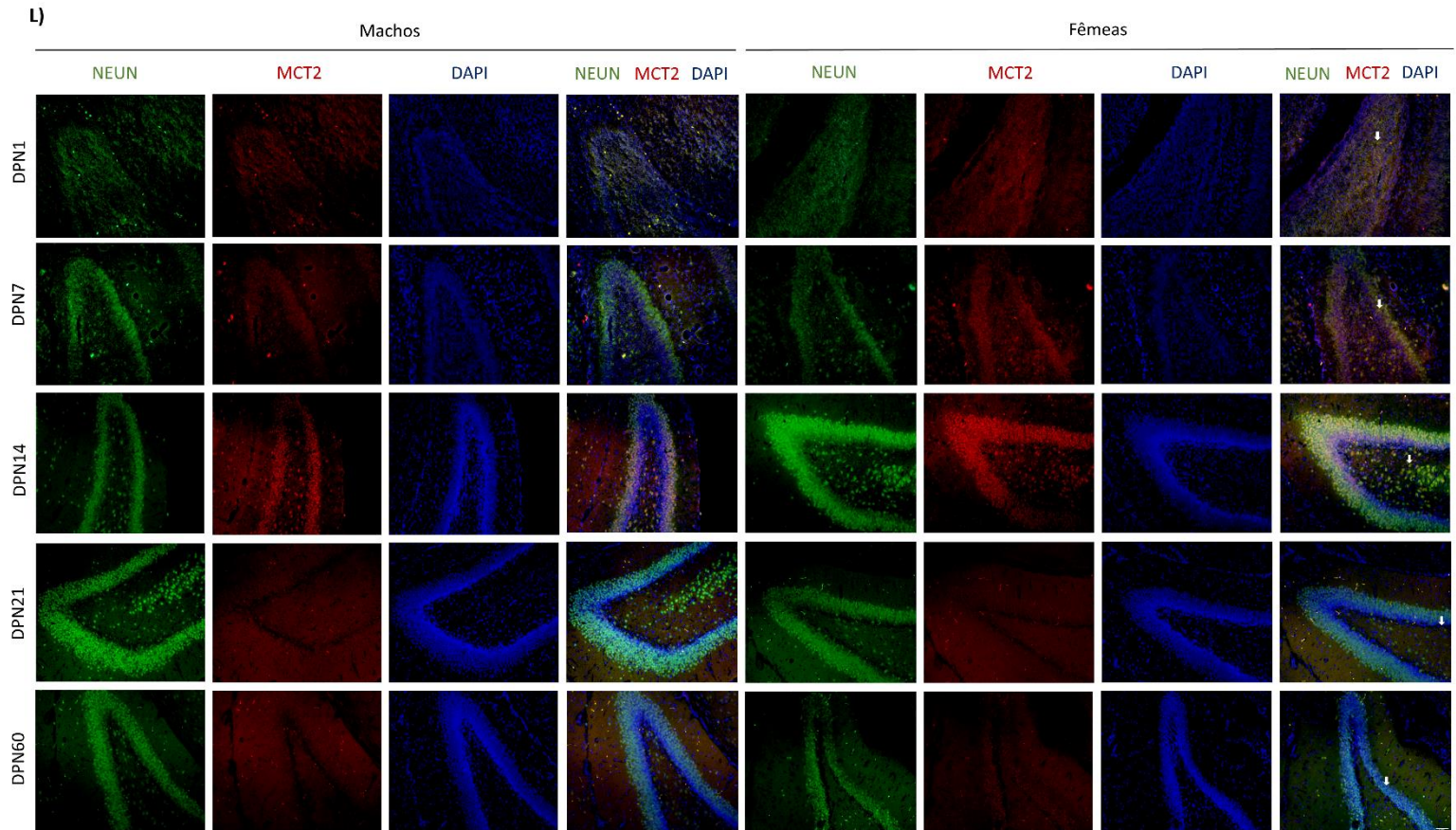


Figura 21: Colocalização de NeuN e MCT2 no hipocampo. **A** Contagem de colocalização na região CA1 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **B** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região CA1. **C** Imagens representativas dos marcadores na região CA1. **D** Contagem de colocalização entre os marcadores na região CA3 considerando o número total de animais usados no experimento **E** Contagem de colocalização entre os marcadores na região CA3 em machos e fêmeas. **F** Imagens representativas dos marcadores na região CA3. **G** Contagem de colocalização na região do hilo considerando o número total de animais usados no experimento. **H** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região do hilo. **I** Imagens representativas dos marcadores na região do hilo. **J** Contagem de colocalização na região do giro denteado considerando o número total de animais usados no experimento. **K** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região do giro denteado. **L** Imagens representativas dos marcadores na região do giro denteado. **A-D-G-J** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparação múltipla. **B-E-H-K** Níveis de

MCT4 nos machos e fêmeas ao longo do neurodesenvolvimento. As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). Barra de calibração em 100 μ m. * Diferenças entre os as idades avaliadas. #Diferença entre os sexos. @ Interação entre os fatores sexo e idade. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por cada janela temporal e sexo)

4.18 O GLUT1 aumentou principalmente após o desmame, no corpo caloso, sem alteração no hipocampo

As análises constataram um crescente aumento do GLUT1 ao longo da maturação cerebral, tendo os animais DPN60 maior quantidade que os animais DPN1, DPN7 e DPN14 em ambas as regiões do corpo caloso, do mesmo modo que os animais DPN21 em comparação ao DPN7, mas também em relação aos DPN1 na região mais superior do corpo caloso. Não foi evidenciado interação entre o sexo e a idade dos animais ($H_{(4)}=4,719$ e $H_{(4)}=5,572$, $p > 0,05$) nem mesmo divergências significativas entre os sexos, ($H_{(1)}=0,057$ e $H_{(1)}=0,012$, $p > 0,05$; Figura 22 C,D). As análises específicas em cada sexo evidenciaram que os animais machos DPN60 e DPN21 obtiveram maior número do transportador em comparação com as idades previas ao desmame (do DPN1 ao DPN14) na região superior, e nos animais DPN60, em relação à região inferior. Além disso, os animais DPN21 apresentaram níveis aumentado de GLUT1 em comparação aos DPN7 na região inferior do corpo caloso ($H_{(4)}=74,340$ e $H_{(4)}=39,759$, $p=0,0001$; Figuras 22B,D e 23E,F; Tabela1). As fêmeas DPN60 demonstraram maiores níveis de GLUT1 em comparação com os outros períodos avaliados em ambas as regiões do corpo caloso. De maneira similar as fêmeas DPN21 exibiram níveis elevados em relação às ratas DPN7 na região superior, mas também em relação aos DPN1, DPN7 e DPN14 na região inferior (Região superior: $H_{(4)}=77,675$, Região inferior: $H_{(4)}=70,634$, $p=0,0001$; Figuras 22 B,D e 23 E,F; Tabela 1).

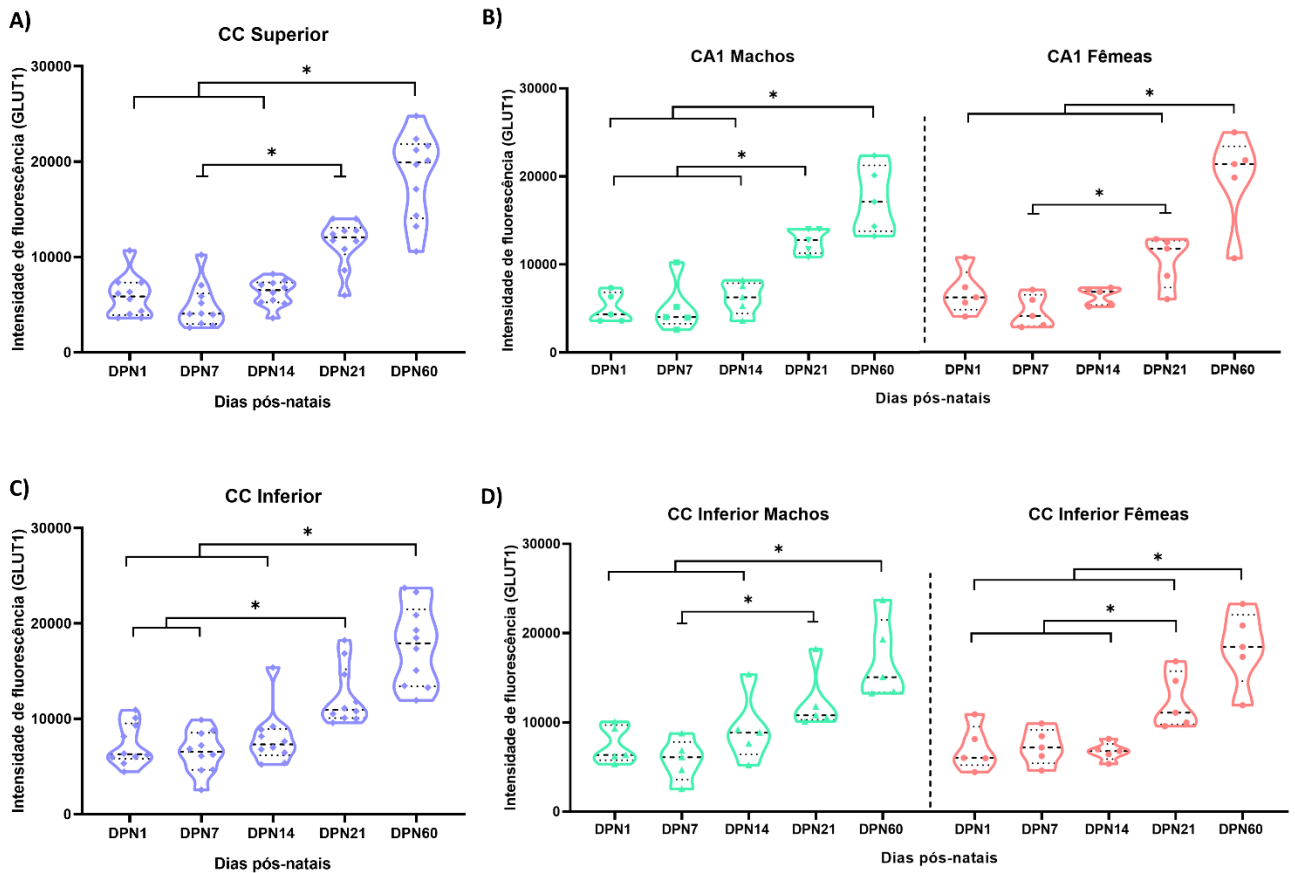
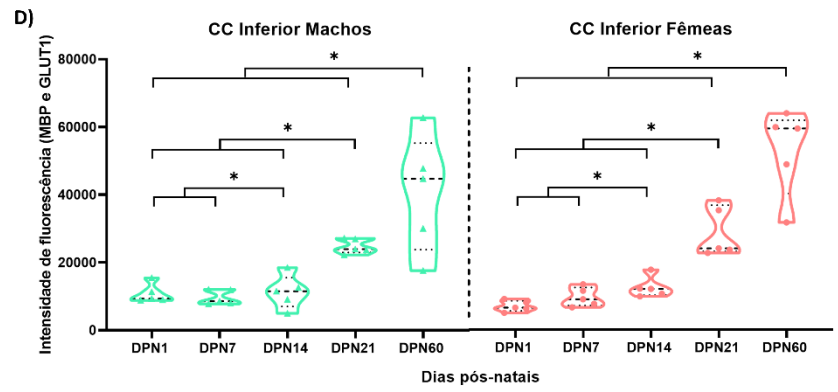
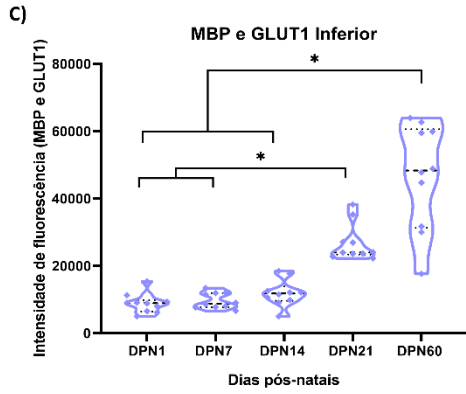
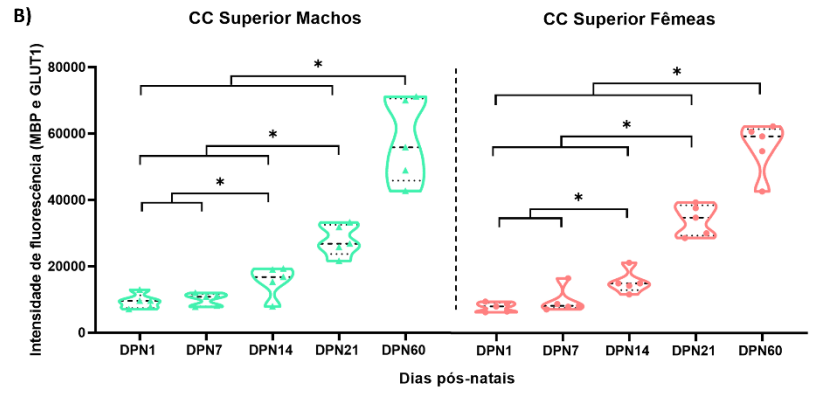
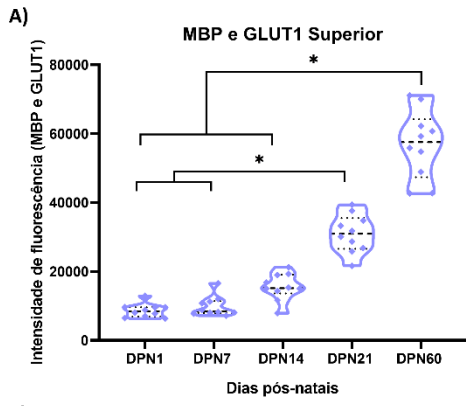


Figura 22: Imunomarcção GLUT1 no hipocampo durante o neurodesenvolvimento. **A** intensidade da colocalização positiva na região superior do corpo caloso considerando todos os animais do estudo. **B** intensidade da colocalização positiva na região superior do corpo caloso, nos animais machos e fêmeas. **C** intensidade da colocalização positiva na região inferior do corpo caloso considerando todos os animais do estudo. **D** intensidade da colocalização positiva na região inferior do corpo caloso, em ambos os sexos ao longo da maturação cerebral. **C** imagens representativas dos marcadores na região superior do corpo caloso. **D** Imagens representativas dos marcadores na região inferior do corpo caloso. **A-B** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM), cujo resultados constituíram em mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=6 por grupo). *Diferenças entre as idades. A diferença significativa aceita foi $p < 0,05$.

4.19 Maior colocalização pelos entre os oligodendrócitos e o GLUT1 após o desmame

Em ambas as regiões do corpo caloso, os animais DPN60 mostraram maior colocalização entre MBP e GLUT1 que os neonatos DPN1, DPN7 e DPN14, enquanto que na região superior, os animais DPN21 apresentaram um maior número de células duplamente marcadas em relação ao DPN7, e ao DPN1, na região inferior (Região superior: $H_{(4)}=42,279$, Região inferior: $H_{(4)}=37,870$, $p=0,0001$, Figura 23A e C). A análise da colocalização do MBP e GLUT1 nas regiões do corpo caloso não evidenciou interação entre os fatores (sexo e idade) (Região superior: $H_{(4)}=4,354$; Região inferior: $H_{(4)}=4,445$, $p>0,05$; Figura 23 B,D). Por outro lado, as análises por sexo demonstraram que em ambas as regiões os roedores machos DPN60 obtiveram dupla marcação positiva aumentada quando comparado às outras idades usadas no estudo, bem como os ratos DPN21 em relação aos neonatos entre DPN1 e DPN21, e os roedores DPN14 em comparação com o DPN1 (Região superior: $H_{(4)}= 252,778$; Região inferior: $H_{(4)}=424,699$, $p=0,0001$; Figura 23 B,D,E,F Tabela 1). Similarmente, as roedoras adultas demonstraram, em ambas as regiões do corpo caloso, um número elevado de células duplamente marcadas em comparação aos outros períodos avaliados. Os animais DPN21 apresentaram valores maiores que as outras idades neonatais, assim como os animais DPN14 em comparação aos DPN17 e DPN7 ($H_{(4)}=354,669$ Superior; $H_{(4)}=264,906$ Inferior, $p=0,0001$, Figura 23 B,D,E,F, Tabela 1).



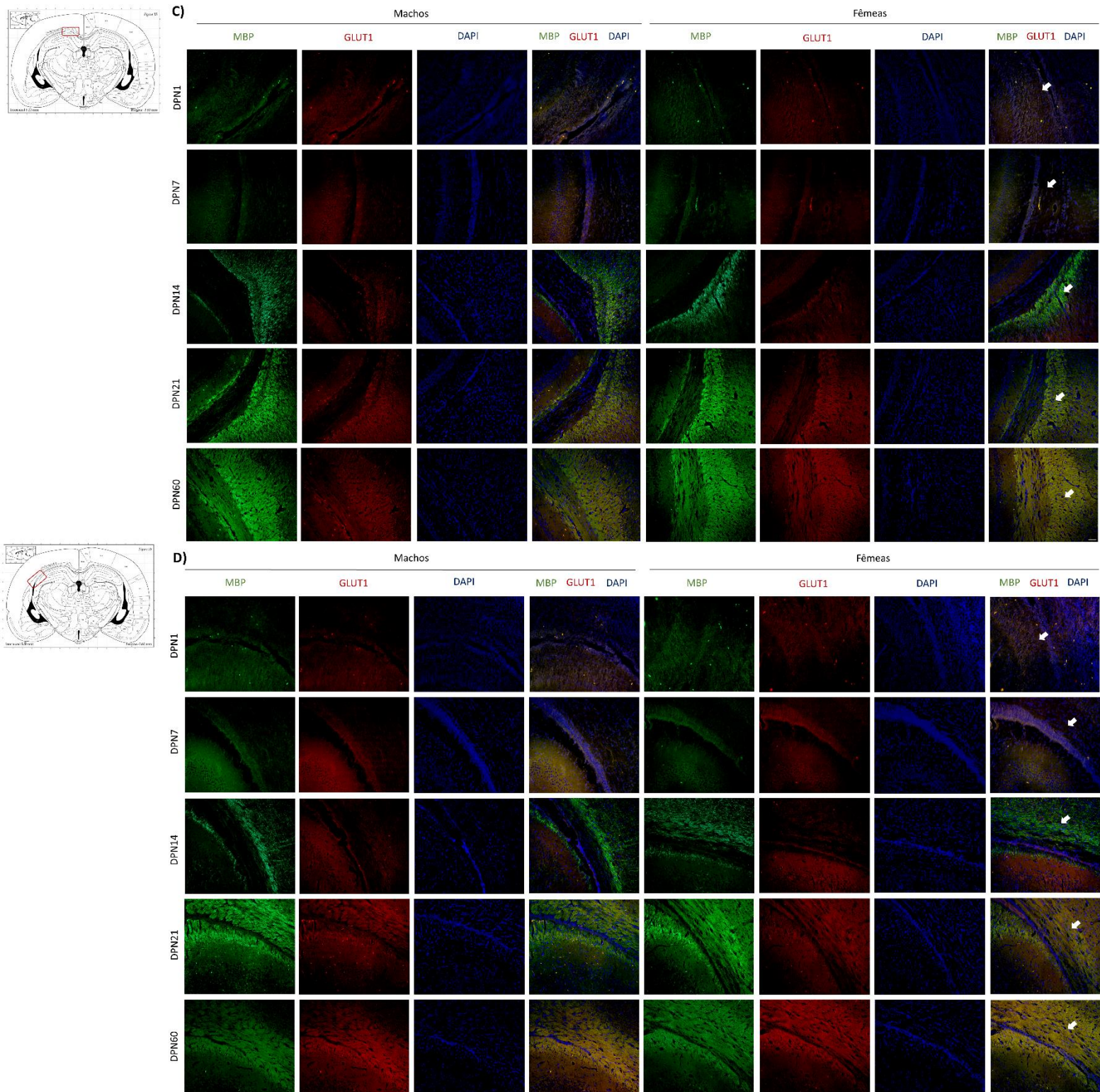


Figura 23: Colocalização do MBP e GLUT1 no hipocampo durante o neurodesenvolvimento. **A** Quantificação na região CA1 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **B** Análise da quantidade de GLUT1 nos animais machos e fêmeas na região CA1. **C** Quantificação na região CA3

considerando o número total de animais usados no experimento **D** Análise dos roedores machos e fêmeas na região CA3. **E** Quantificação na região do Hilo levando em conta o número total de animais usados no experimento. **F** Análise dos ratos machos e fêmeas na região do Hilo. **G** Quantificação na região do giro denteado considerando o número total de animais usados no experimento. **H** Análise da quantidade do transportador no giro denteado em ambos os sexos. **A-C-E-G** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas. **B-D-F-H** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM), cujo resultados constituíram em mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por grupo). Barra de calibração em 100µm. *Diferenças entre as idades. A diferença significativa aceita foi $p < 0,05$.

4.20 A quantidade do GLUT1 astrocitário permaneceu constante ao longo do neurodesenvolvimento

As análises do transportador GLUT1 presente nos astrócitos não demonstraram diferenças no decorrer da maturação cerebral nas regiões hipocámpais usadas no estudo (CA1: $H_{(4)}=7,389$; CA3: $H_{(4)}=8,004$; Hilo: $H_{(4)}=3,214$; Giro denteado: $H_{(4)}=4,354$, $p > 0,05$; Figura 24 A,C,E,G). As análises feitas mediante o modelo GZLM não apresentaram interação entre sexo e idade nas regiões do hipocampo ($H_{(4)}=2,033$ CA1; $H_{(4)}=1,839$ CA3; $H_{(4)}=1,075$ Hilo e $H_{(4)}=0,329$ Giro denteado, $p > 0,05$) nem diferença entre os sexos (CA1: $H_{(1)}=0,348$; CA3: $H_{(1)}=0,409$; Hilo : $H_{(1)}=0,720$ e Giro denteado: $H_{(1)}=0,121$, $p > 0,05$), ou as idades (CA1: $H_{(4)}=7,906$; CA3: $H_{(4)}=8,786$; Hilo: $H_{(4)}=5,996$ Giro denteado: $H_{(4)}=9,383$, $p > 0,05$; Figura 24B,D,F,H e 25C,F,I,L).

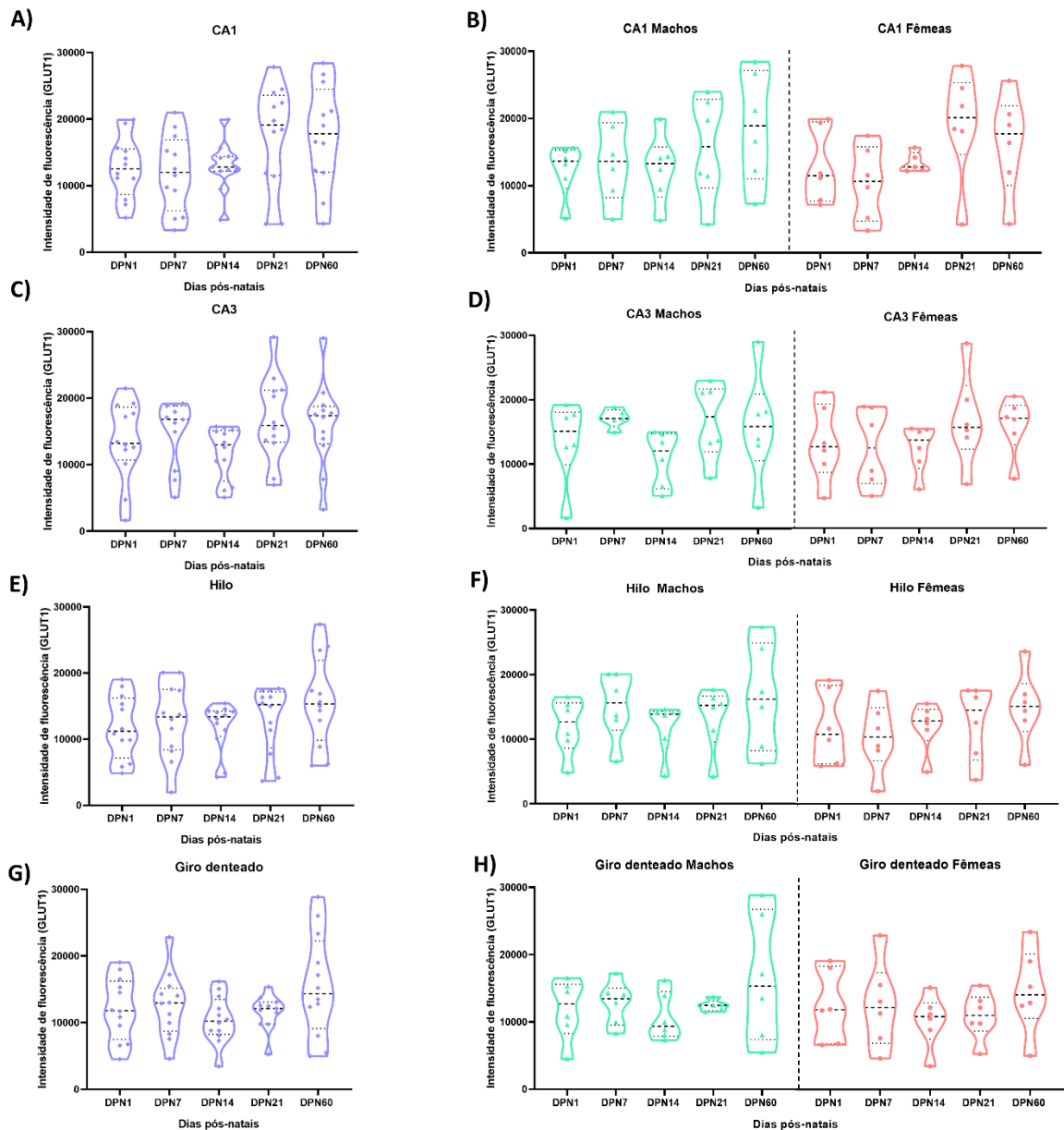
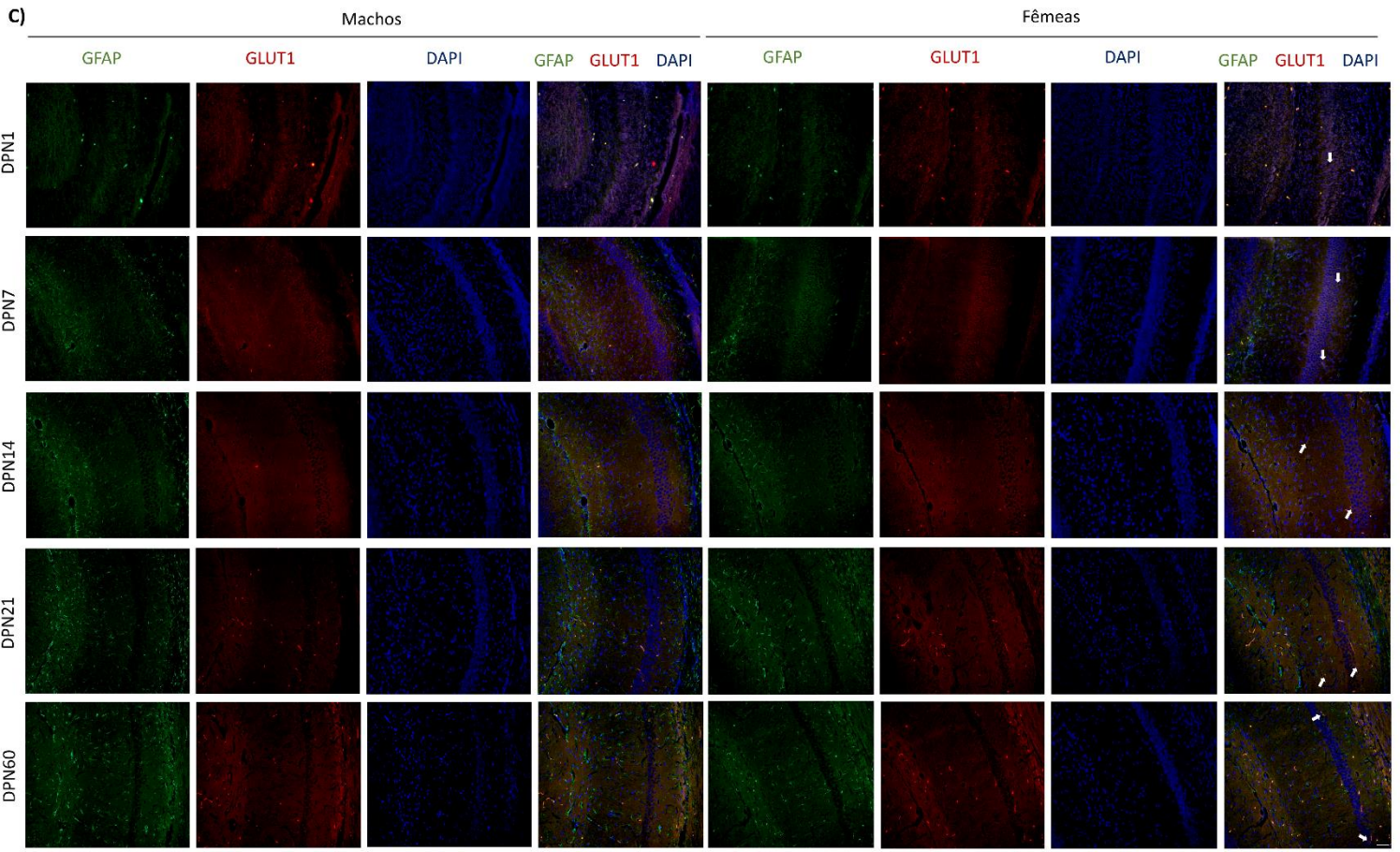
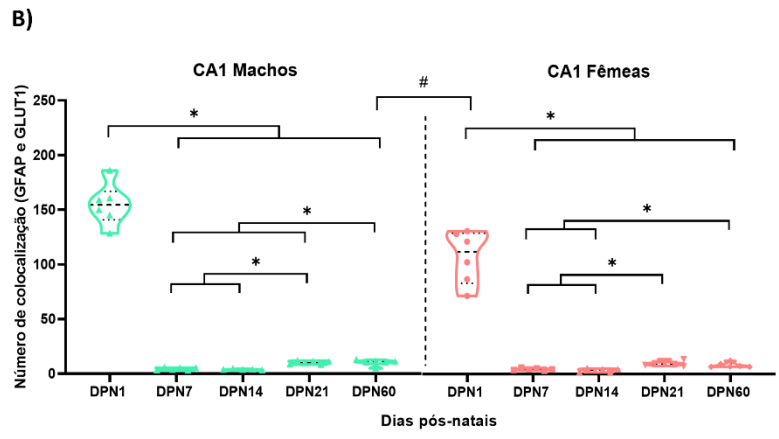
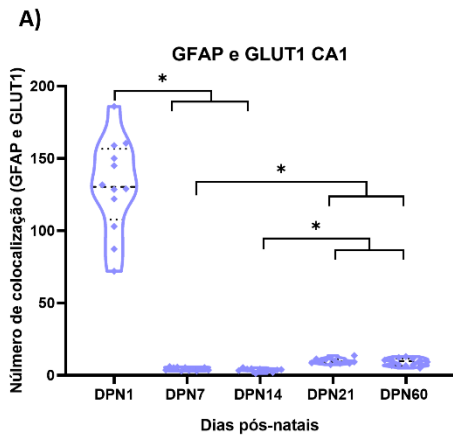


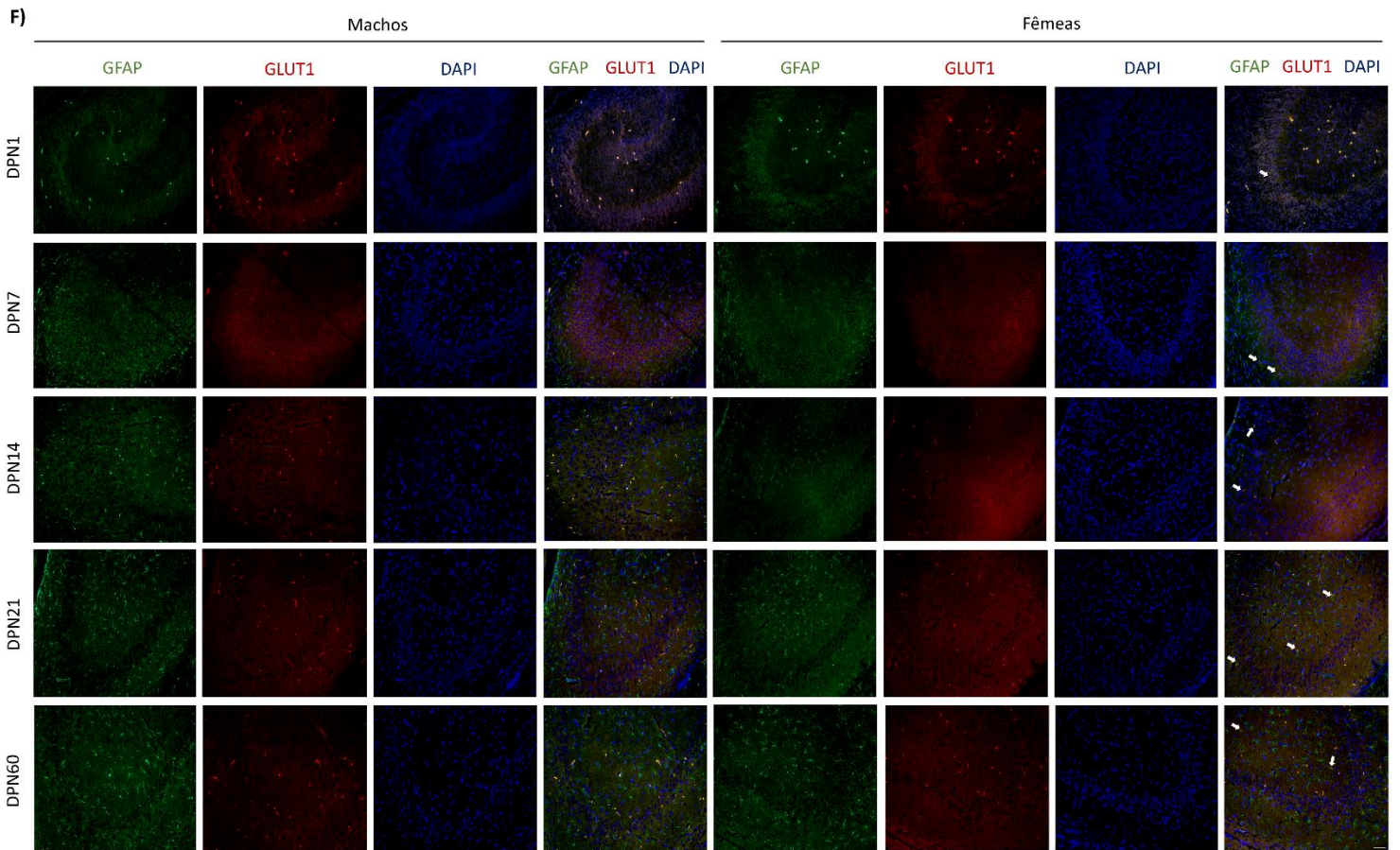
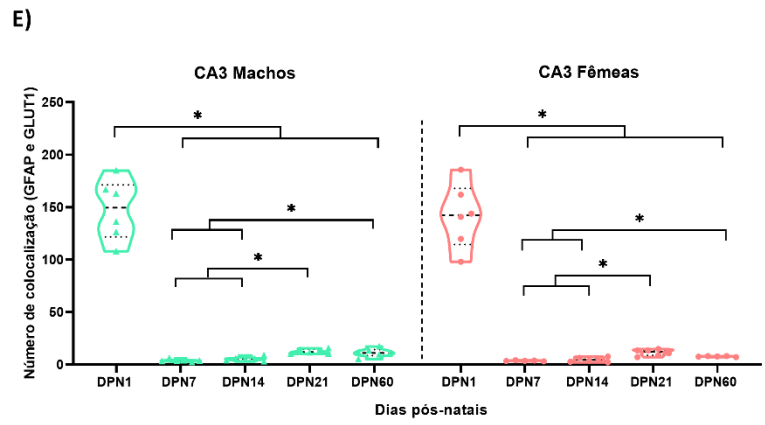
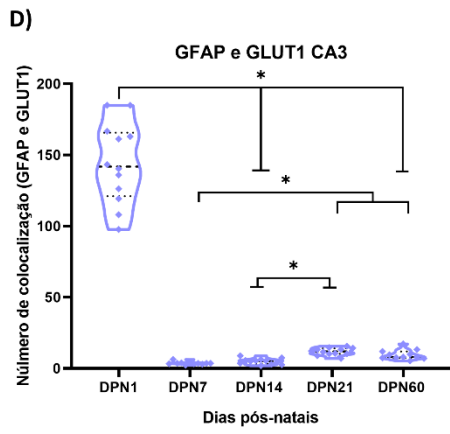
Figura 24: Imunofluorescência GLUT1 no hipocampo durante o neurodesenvolvimento. **A** Quantificação na região CA1 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **B** Análise da quantidade de GLUT1 nos animais machos e fêmeas na região CA1. **C** Quantificação na região CA3 considerando o número total de animais usados no experimento. **D** Análise dos roedores machos e fêmeas na região CA3. **E** Quantificação na região do Hilo levando em conta o número total de animais usados no experimento. **F** Análise dos ratos machos e fêmeas na região do Hilo. **G** Quantificação na região do giro denteado considerando o número total de animais usados no experimento. **H** Análise da quantidade do transportador no giro denteado em ambos os sexos. **A-C-E-G** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido

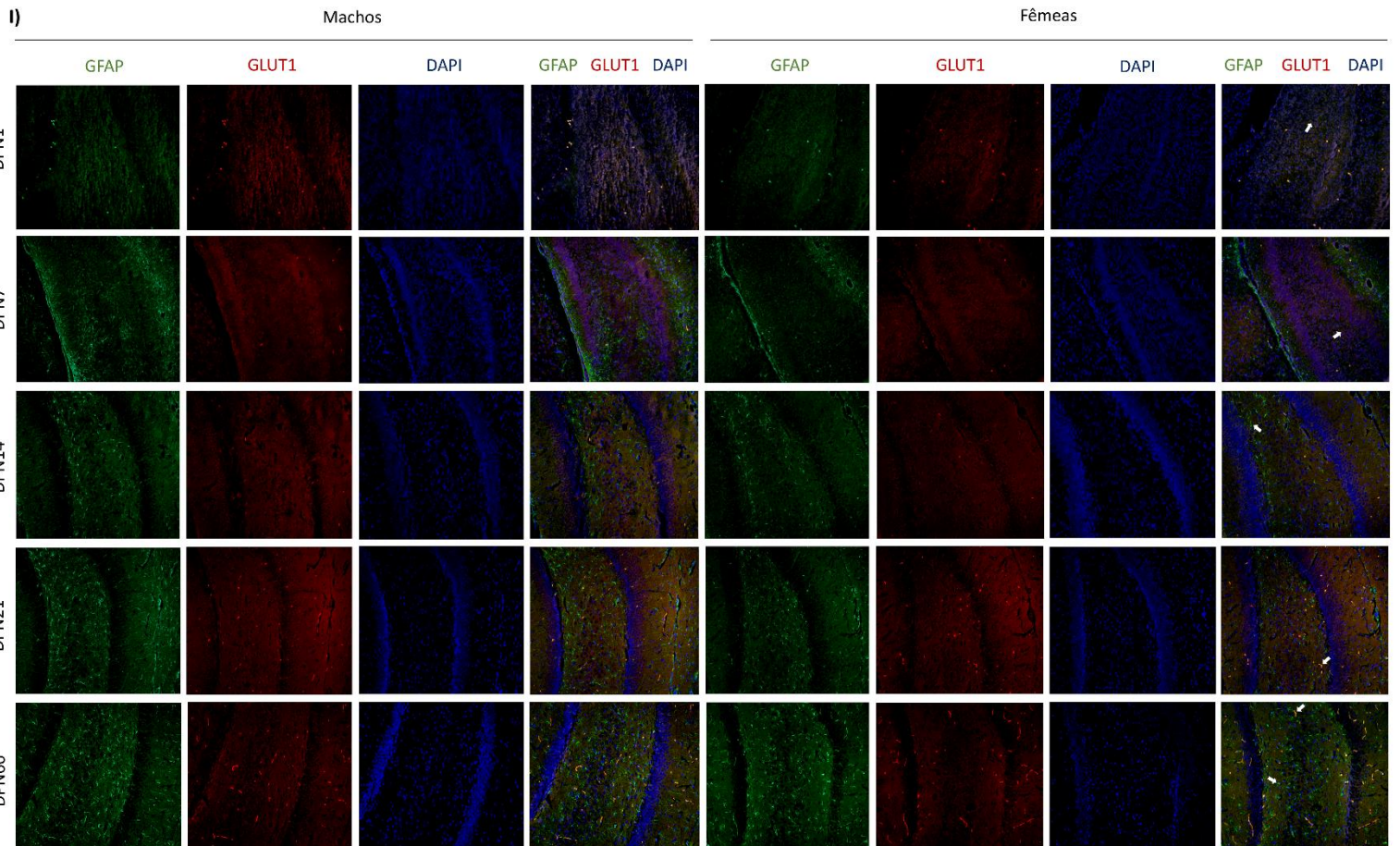
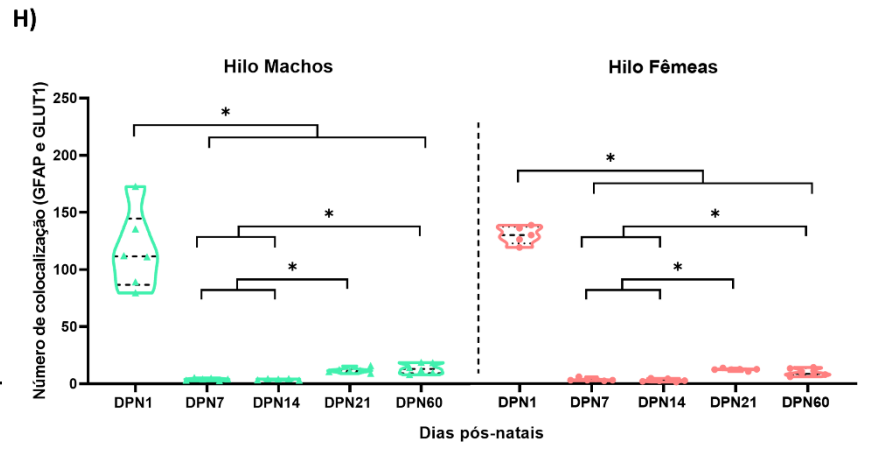
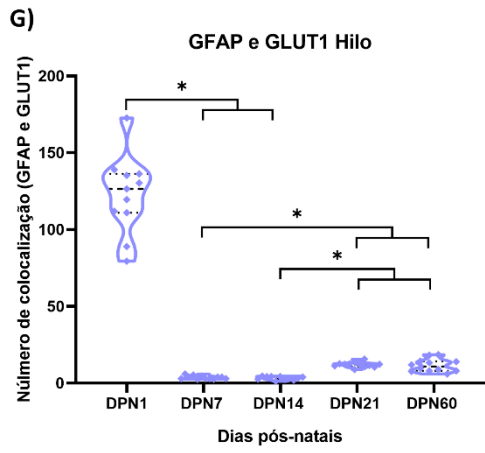
do teste de Dunn de comparações múltiplas. **B-D-F-H** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM), cujo resultados constituíram em mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por grupo). Não foram encontradas diferenças significativas. A diferença significativa aceita foi $p < 0,05$.

4.21 Apesar da maior quantidade de GLUT1 após o desmame, os filhotes do DPN1 apresentaram maior colocalização

A colocalização do GFAP e GLUT1, não evidenciou interação entre os fatores (idade e sexo) em nenhuma das regiões hipocâmpais avaliadas (CA1: $H_{(4)}=4,590$; CA3: $H_{(4)}=2,971$; Hilo: $H_{(4)}=6,397$, Giro denteado: $H_{(4)}=0,987$, $p > 0,05$), porém na região CA1, foi constatada uma diferença entre os sexos. Assim, os machos apresentaram um maior número de células duplamente positivas quando comparado com as fêmeas na região CA1 ($H_{(1)}=5,332$, $p=0,021$; Figura 25B). Avaliando individualmente cada sexo (Tabela 1), os animais machos DPN1 obtiveram maior colocalização entre os marcadores em comparação às outras idades avaliadas, similar aos animais DPN21 e DPN60 que mostraram maior colocalização que os neonatos DPN7 e DPN14 (CA1: $H_{(4)}=1343,514$; CA3: $H_{(4)}=647,771$; Hilo: $H_{(4)}=832,866$ e Giro denteado: $H_{(4)}=551,982$, $p=0,0001$, Figura 25B,C,E,F,H,I,K,L). Mantendo um perfil similar ao previamente descrito, as fêmeas DPN1 apresentaram um maior número de células duplamente marcadas em comparação com as outras idades. Além disso, os animais DPN21 e DPN60 exibiram maiores valores que as fêmeas DPN7 e DPN14 (CA1: $H_{(4)}=566,257$; CA3: $H_{(4)}=748,787$; Hilo: $H_{(4)}=639,592$, Giro denteado: $H_{(4)}=657,837$, $p=0,0001$, Figura 25 B,C,E,F,H,I,K,L).







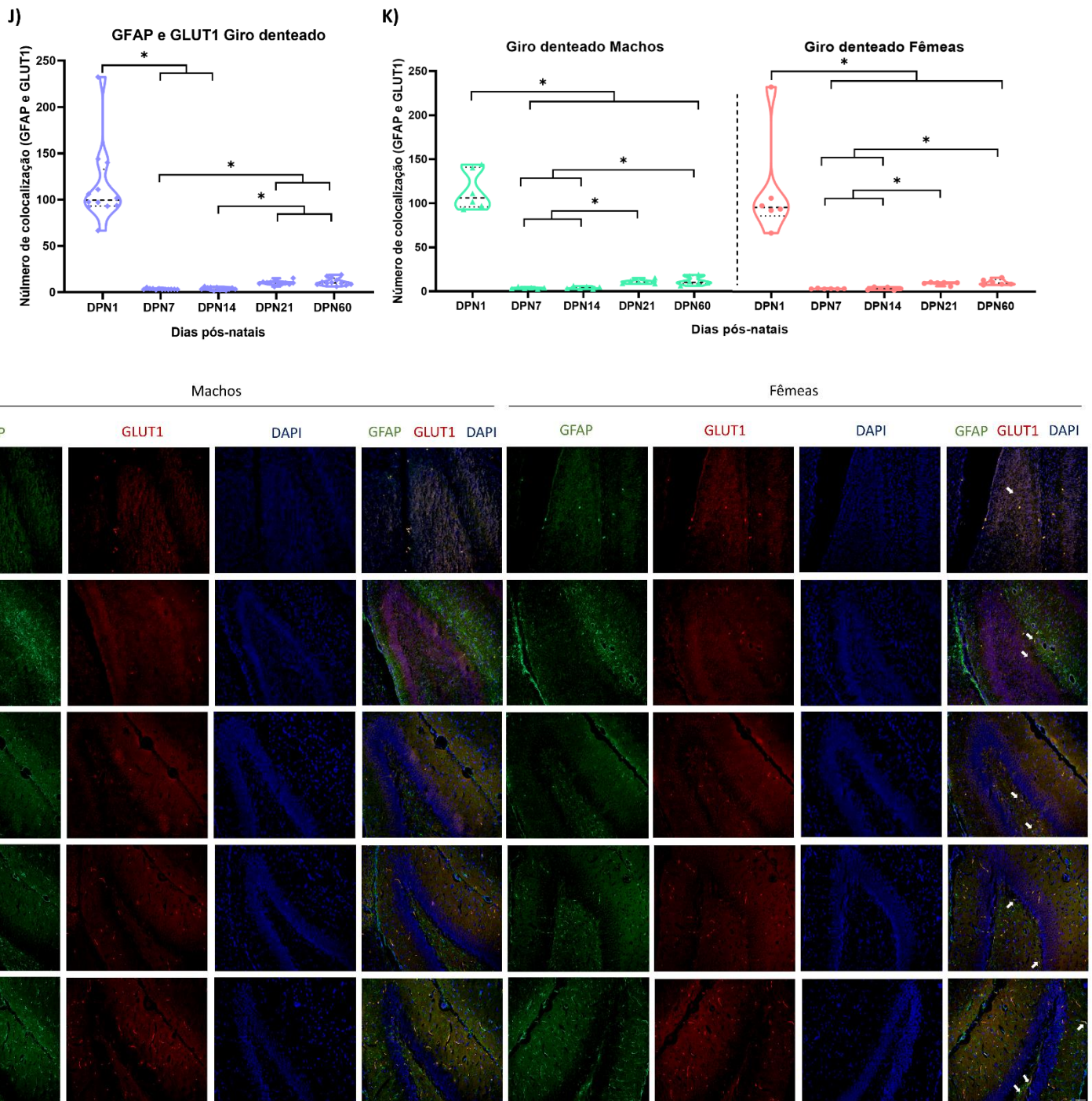


Figura 25: Colocalização de GFAP e GLUT1 no hipocampo. **A** Contagem de colocalização na região CA1 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **B** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região CA1. **C** Imagens representativas dos marcadores na

região CA1. **D** Contagem de colocalização entre os marcadores na região CA3 considerando o número total de animais usados no experimento **E** Contagem de colocalização entre os marcadores na região CA3 em machos e fêmeas. **F** Imagens representativas dos marcadores na região CA3. **G** Contagem de colocalização na região do hilo considerando o número total de animais usados no experimento. **H** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região do hilo. **I** Imagens representativas dos marcadores na região do hilo. **J** Contagem de colocalização na região do giro denteado considerando o número total de animais usados no experimento. **K** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região do giro denteado. **L** Imagens representativas dos marcadores na região do giro denteado. **A-D-G-J** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparação múltipla. **B-E-H-K** Níveis de MCT4 nos machos e fêmeas ao longo do neurodesenvolvimento. As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). Barra de calibração em 100 μ m. * Diferenças entre os as idades avaliadas. #Diferença entre os sexos. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por cada janela temporal e sexo).

4.22 Maior presença de GLUT3 na primeira semana pós-natal

Com exceção da região CA1, os animais DPN7 apresentaram maior intensidade de GLUT3 que os roedores DPN21, mas também em comparação aos DPN60 nas regiões do hilo e giro denteado ($H_{(4)} = 18,719$ e $H_{(4)} = 15,630$, $p = 0,001$ e $p = 0,004$, respectivamente; Figura 25 A,C,E,G). Interessantemente, as avaliações realizadas pelo modelo GLZM mostraram que na região do Hilo, os animais machos obtiveram maior quantidade do que as fêmeas ($H_{(1)} = 4,014$, $p < 0,05$, Figura 26F). Ademais, foi demonstrada interação entre os fatores (sexo e idade) na região do hilo. As fêmeas DPN60 apresentaram menor intensidade de fluorescência que os machos DPN1, DPN7, DPN14 e DPN60, além das ratas DPN21 também demonstrar a intensidade reduzida em relação aos machos DPN7 ($H_{(4)} = 21,836$, $p = 0,0001$, Figura 26F). Ademais, a análise individual em cada sexo evidenciou que, como representado na Tabela 1, os animais machos DPN7

e DPN60 apresentaram maior intensidade quando comparados aos DPN21 na região CA3 e giro denteado (CA3: $H_{(4)}=19,223$; Hilo: $H_{(4)}=17,316$; Giro Denteado: $H_{(4)}=15,806$, $p=0,0001$; Figura 26 B,D,F,H e 27 C,F,I,L). Na região CA1, as fêmeas DPN7 apresentaram maior valor em relação aos animais DPN21 e DPN60 nas regiões CA1 e giro denteado, mas também em relação aos DPN1 e DPN14 no giro denteado (CA1: $H_{(4)}=8,439$; Hilo: $H_{(4)}=70,023$, Giro denteado: $H_{(4)}=26,526$, $p=0,0001$; Figura 26B,C,E,F,H,I,K,L e 27 C,F,I,L)

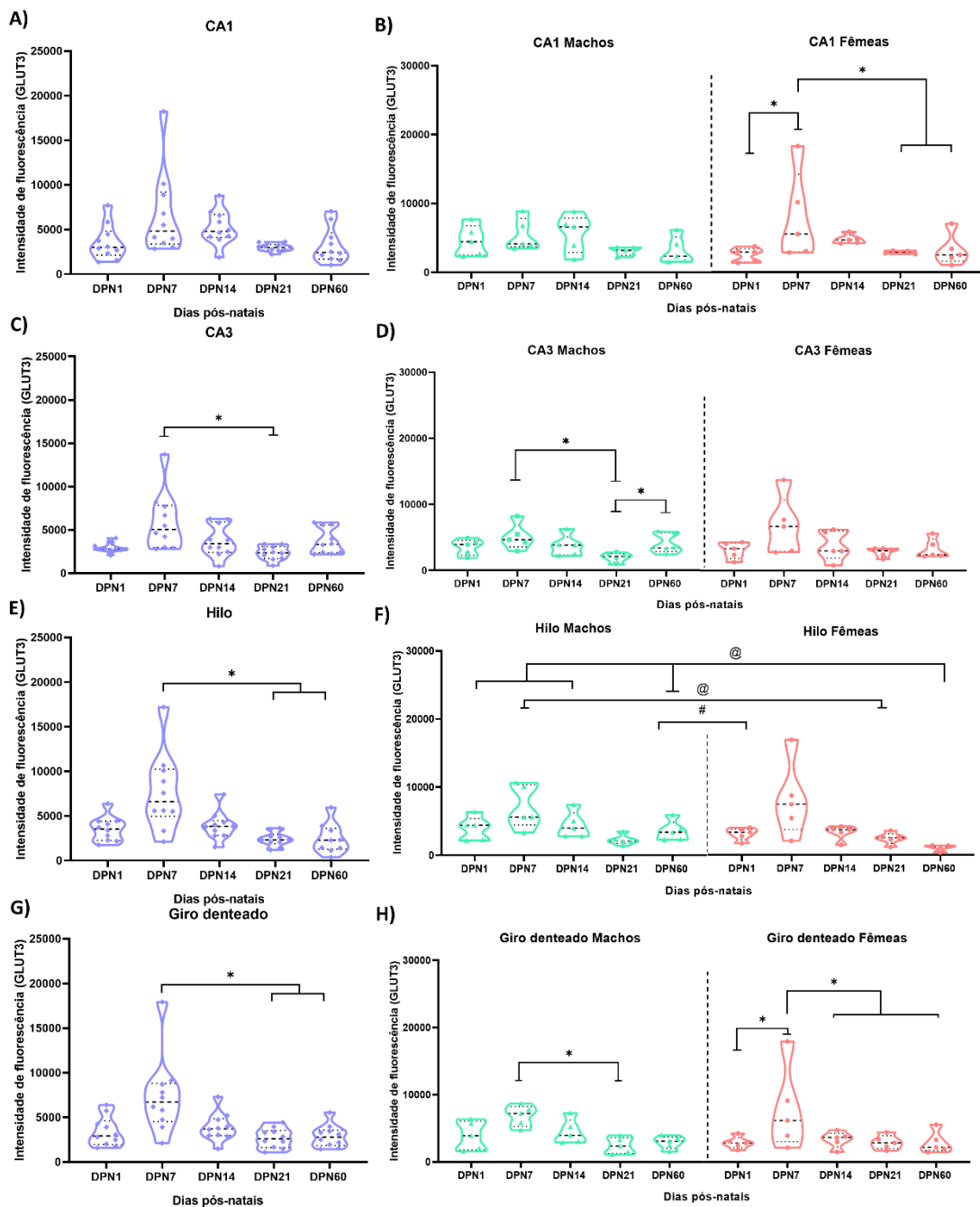
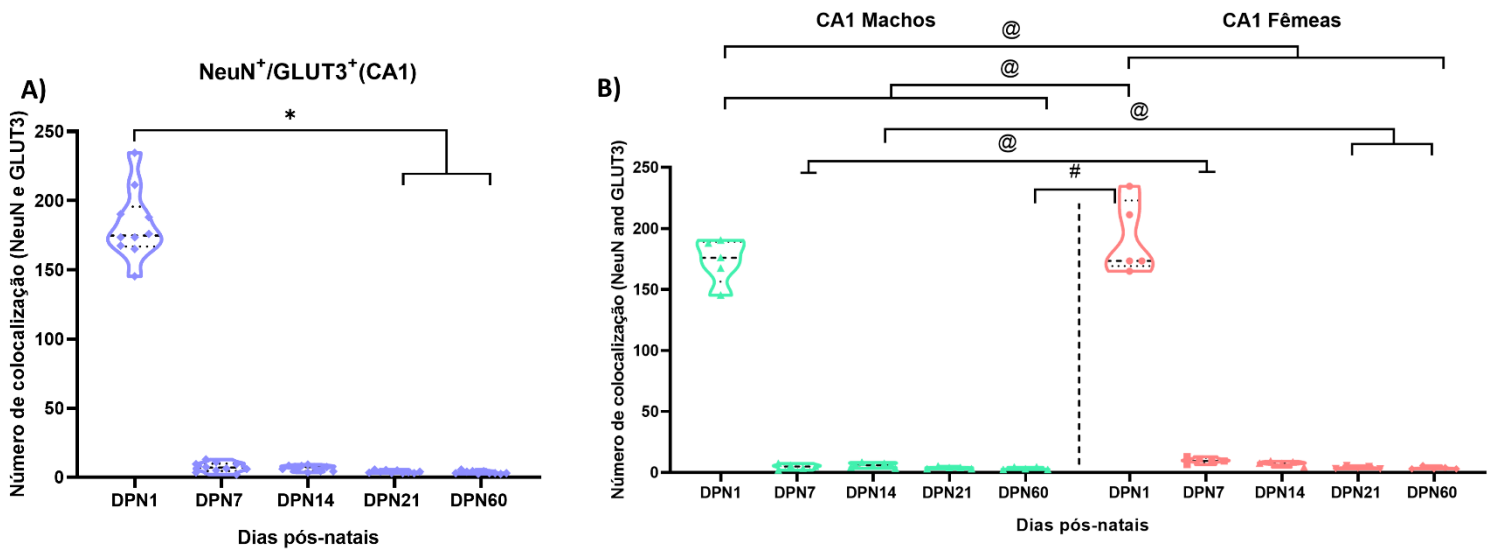


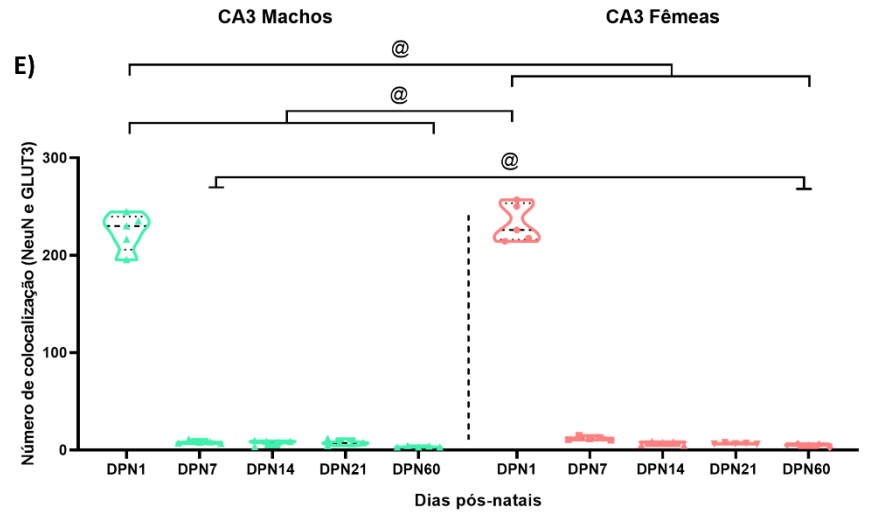
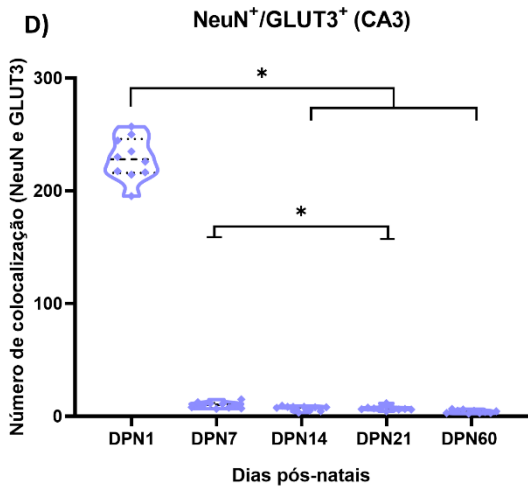
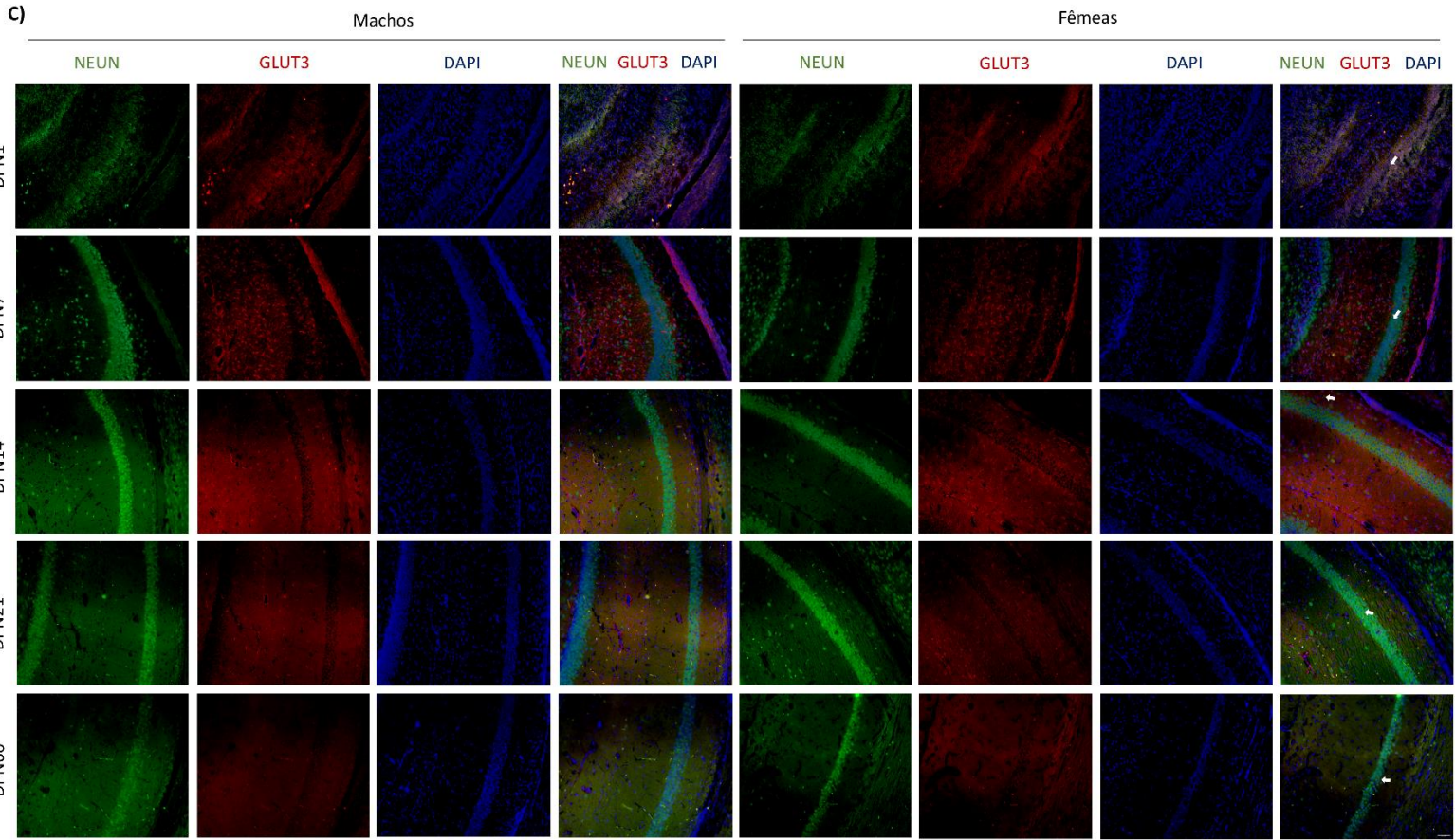
Figura 26: Intensidade do transportador GLUT3 no hipocampo. **A** Intensidade de GLUT3 na região CA1 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **B** Análise da intensidade de GLUT3 nos animais machos e fêmeas na região CA1. **C** Intensidade de GLUT3 na região CA3 considerando o número total de animais usados no experimento **D** Análise da intensidade de GLUT3 nos roedores machos e fêmeas na região CA3. **E** Intensidade de GLUT3 na região do Hilo levando em conta o número total de animais usados no experimento. **F** Intensidade de GLUT3 nos ratos machos e fêmeas na região do Hilo. **G** Análise da intensidade de GLUT3 na região do giro denteado considerando o número total de animais usados no experimento. **H** Intensidade de GLUT3 no giro denteado em ambos os sexos. **A-C-E-G** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas. **B-D-F-H** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM), cujo resultados constituíram em mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por grupo).*Diferença entre as idades avaliadas @Interação entre sexo e idade. #Diferença entre os sexos. A diferença significativa aceita foi $p < 0,05$.

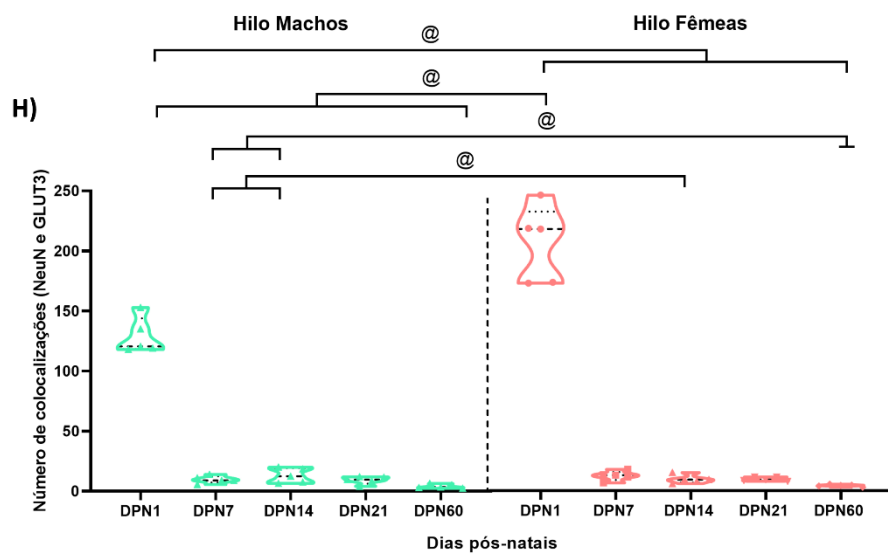
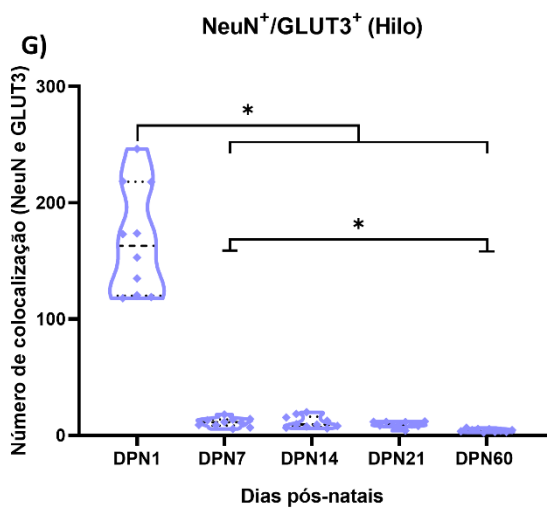
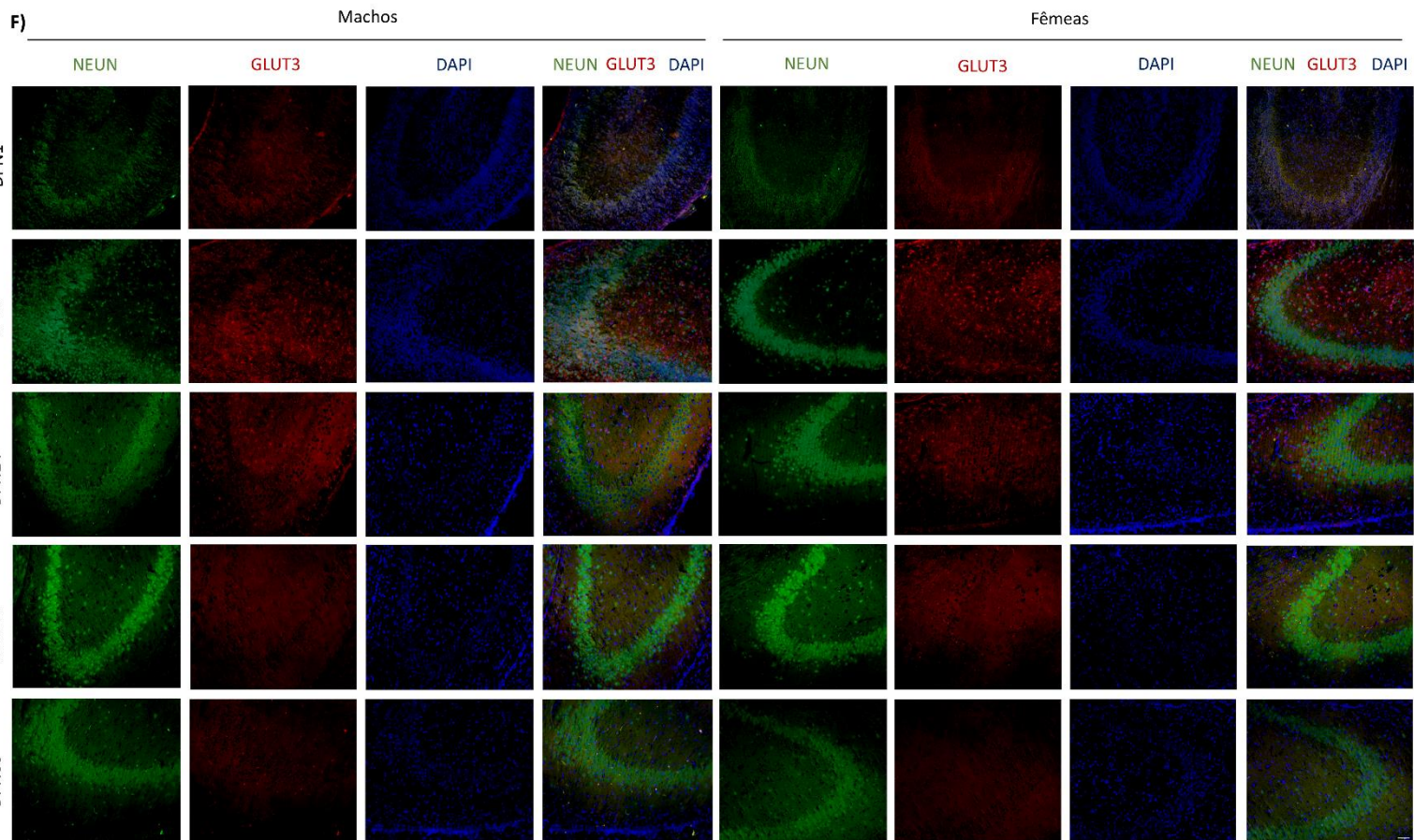
4. 23 Maior colocalização de NeuN e GLUT3 no primeiro dia pós-natal, seguido de uma queda após o desmame

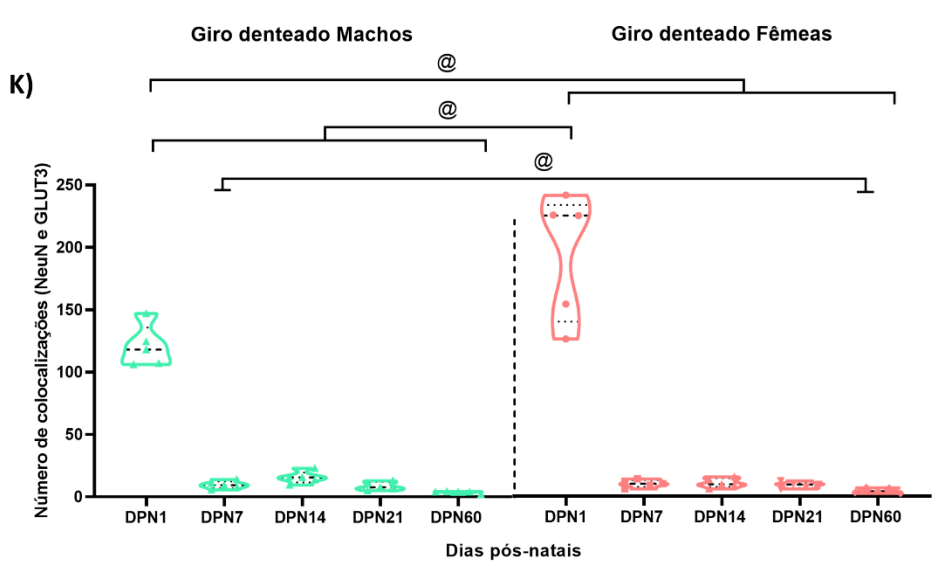
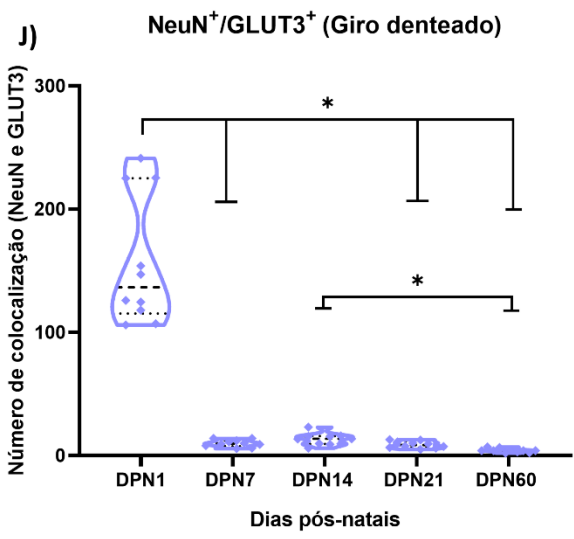
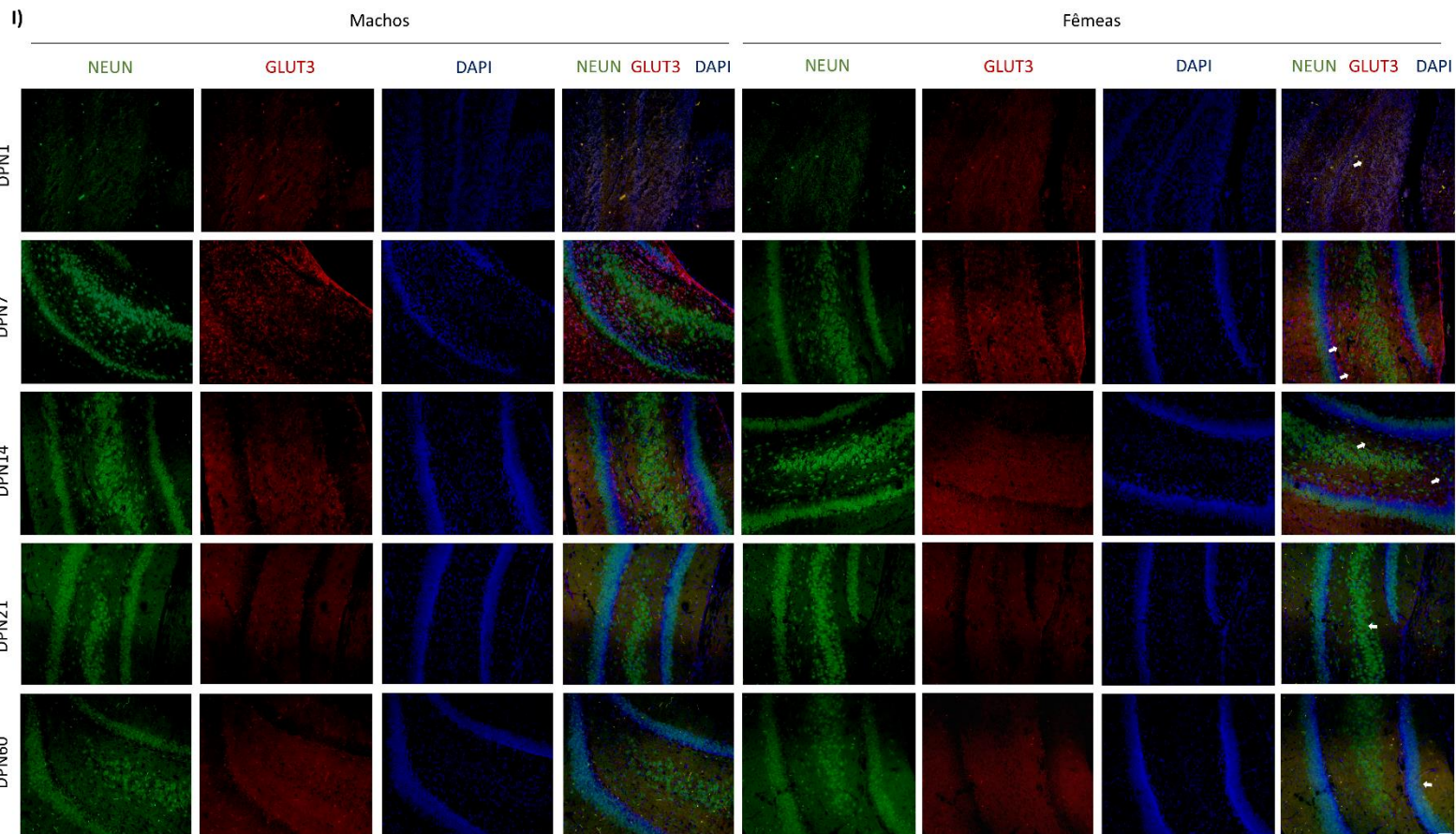
Os animais DPN1 apresentaram maior colocalização entre NeuN e GLUT3 que todas as outras idades avaliadas na região do hilo, mas também em comparação aos DPN21 e DPN60 nas regiões CA1, CA3 e giro denteado, assim como com o DPN14 na região de CA3 e ao DPN7 no giro denteado (CA1: $H_{(4)}=33,920$; CA3: $H_{(4)}=37,120$; Hilo: $H_{(4)}=36,406$; Giro denteado: $H_{(4)}=37,603$, $p=0,0001$, Figura 27 A,D,G,J). Como evidenciado na tabela 1, o modelo GZLM demonstrou diferença entre os sexos, com as fêmeas possuindo maior colocalização que os machos na região CA1 ($H_{(1)}=11,686$, $p=0,001$). Além disso, houve interação entre os fatores fixos (sexo e idade), no qual os animais machos e fêmeas DPN1 apresentaram maior dupla marcação positiva que as outras idades em todas as regiões avaliadas. Nas regiões do giro denteado e CA3, os animais adultos de ambos os sexos tiveram colocalização reduzida em comparação aos animais DPN7. Os animais DPN60 fêmeas também demonstraram menor colocalização que os ratos machos DPN7 e DPN14 na região do hilo,

contrário as ratas fêmeas DPN14 que obtiveram maior colocação que os machos DPN7 e DPN14. Ademais, unicamente na região CA1, os animais DPN7 fêmeas apresentaram dupla marcação positiva aumentada em comparação aos machos na mesma idade (CA1: $H_{(4)}=12,284$; CA3: $H_{(4)}=11,547$; Hilo: $H_{(4)}=9,516$; Giro denteado: $H_{(4)}=48,342$, $p=0,015$, $p=0,021$, $p=0,049$ e $p=0,018$, respectivamente; Figura 27 B,C,E,F,H,I,K,L).









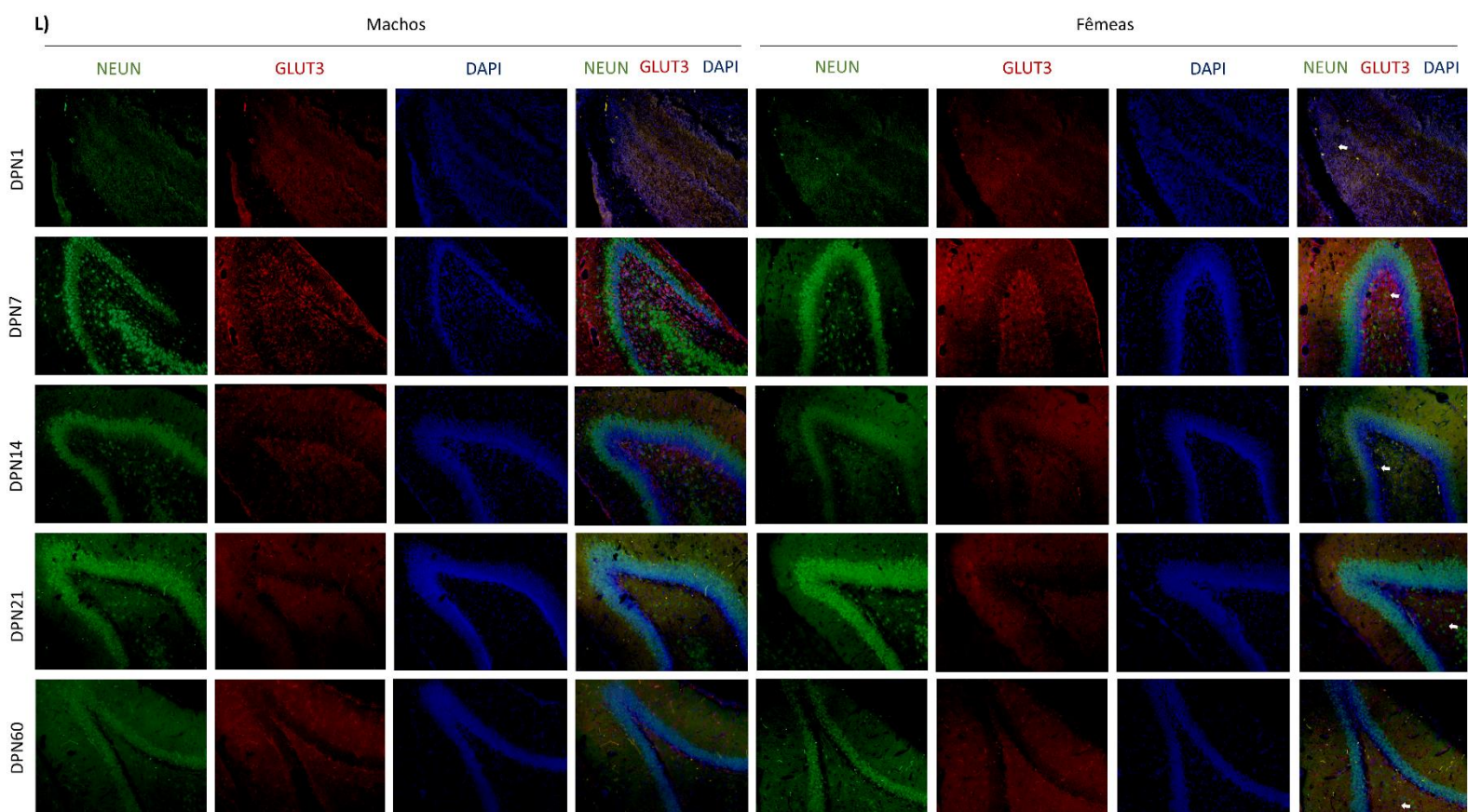


Figura 27: Colocalização de NeuN e GLUT3 no hipocampo. **A** Contagem de colocalização na região CA1 de acordo com o número total de animais usados no experimento. **B** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região CA1. **C** Imagens representativas dos marcadores na região CA1. **D** Contagem de colocalização entre os marcadores na região CA3 considerando o número total de animais usados no experimento **E** Contagem de colocalização entre os marcadores na região CA3 em machos e fêmeas. **F** Imagens representativas dos marcadores na região CA3. **G** Contagem de colocalização na região do hilo considerando o número total de animais usados no experimento. **H** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região do hilo. **I** Imagens representativas dos marcadores na região do hilo. **J** Contagem de colocalização na região do giro denteado considerando o número total de animais usados no experimento. **K** Contagem de colocalização entre os marcadores nos animais machos e fêmeas na região do giro denteado. **L** Imagens representativas dos marcadores na região do giro denteado. **A-D-G-J** As análises foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparação múltipla. **B-E-H-K** As avaliações foram executadas pelos Modelos lineares generalizados (GZLM). Barra de

calibração em 100 μ m. * Diferenças entre os as idades avaliadas. #Diferença entre os sexos. @ Interação entre os fatores sexo e idade. A diferença significativa foi aceita quando $p < 0,05$. Os dados são expressos como mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n=5-6 por cada janela temporal e sexo).

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos nos experimentos ao longo do mestrado

Variável	Machos					Fêmeas				
	PND60	PND1	PND7	PND14	PND21	PND60	PND1	PND7	PND14	PND21
MCT1 (WB)	▼	▼	=	▲	▲	▲	▼	▼	▲	▼
MCT2 (WB)	▲	▼	▼	▼	▲	▲	▼	▼	▼	▲
MCT4 (WB)	▲	▼	▼	▼	=	▼	▼	▼	▲	▲
GLUT1 (WB)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
GLUT3 (WB)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	=	▲	▲
S100B (ELISA)	▲	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▲	▲	▲
GFAP (ELISA)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
Capitação Glicose (H)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
Dosagem Glicose (S)	▲	▼	▼	▲	=	▲	▼	▼	▼	▼
Dosagem Lactato (CSF)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
Dosagem Lactato (S)	▼	▲	▼	▼	▼	▼	=	▼	▼	▼
Dosagem BOHB (CSF)	▼	▲	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▲	▲
Dosagem BOHB (S)	▼	▲	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▲	▲
Atividade BHD (HP)	▲	▼	▼	▼	▲	▲	▼	▼	▲	▲
Atividade BHD (F)	▲	▲	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
MBP (IF)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
GFAP(IF)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▲
NeuN (IF)	▼	▼	▲	▼	▲	▼	▼	▲	▲	▲
MCT1 (IF)	▲	▼	▼	=	▲	▲	▼	▼	▼	▼
MCT2 (IF)	▼	▲	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▲	▲
MCT4 (IF)	▲	▼	▼	▼	▼	▼	▲	▲	▲	▲
GLUT1 ⁺ /MBP ⁺ (IF)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
GLUT1 ⁺ /GFAP ⁺ (IF)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
GLUT3 (IF)	▼	▲	▲	▲	▼	▼	▲	▲	▲	▼
MBP ⁺ /MCT1 ⁺ (IF)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
MBP ⁺ /GLUT1 ⁺ (IF)	▲	▼	▼	▼	▼	▲	▼	▼	▼	▼
GFAP ⁺ /MCT4 ⁺ (IF)	▼	▲	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▲	▲
GFAP ⁺ /GLUT1 ⁺ (IF)	▼	▲	▼	▼	=	▼	▲	▼	▼	▲
NeuN ⁺ /MCT2 ⁺ (IF)	▼	▲	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▲	▲
NeuN ⁺ /GLUT3 ⁺ (IF)	▼	▲	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▲	▲

Resumo dos resultados obtidos em todo o estudo nos animais machos e fêmeas.

Para o desenvolvimento da tabela, os animais adultos foram utilizados como grupo padrão, sendo o comparativo para os outros períodos pós-natais. O tamanho das setas reflete a variação, para mais ou para menos, das análises em relação aos DPN60. WB: Western Blot; ELISA: Teste de ELISA; H: Hipocampo; S: Soro; CSF: Líquido cerebrospinal, F: Fígado; IF: Imunofluorescência.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar as alterações metabólicas durante o neurodesenvolvimento em ratos, com foco na utilização dos corpos cetônicos como substrato energético. Observamos aumentos significativos no imunocontéudo dos transportadores de monocarboxilatos e transportadores de glicose no hipocampo ao longo da maturação cerebral. Além disso, tanto a captação de glicose no hipocampo quanto a glicemia evidenciaram incrementos ao longo do desenvolvimento, especialmente após o desmame. Contrastando com isso, os níveis circulantes de lactato e beta-hidroxibutirato foram elevados no primeiro dia pós-natal evidenciando sua importância para sustentar o metabolismo basal em resposta a eventos hipoglicêmicos após o nascimento. A atividade hepática elevada da beta-hidroxibutirato desidrogenase no DPN1 foi corroborada pela alta concentração de BOHB na circulação sanguínea nesse período, destacando novamente sua função metabólica nesse estágio. A análise morfológica revelou padrões distintos de expressão de transportadores de monocarboxilato ao longo do desenvolvimento, como o MCT2, cuja expressão foi significativamente reduzida após o desmame. Esses achados confirmam a alternância metabólica durante o desenvolvimento neural e revelam uma resposta sexo-específica em parâmetros bioquímicos e morfológicos, podendo reforçar a maior vulnerabilidade dos animais machos a desafios metabólicos em períodos críticos do neurodesenvolvimento.

5.1 A disponibilidade e utilização dos substratos energéticos variam nos períodos pós natais ao longo do neurodesenvolvimento

A glicose é o principal metabólito usado para a produção de ATP e também atua como precursora de intermediários metabólicos como o NADPH, devido à sua oxidação na via das pentoses fosfato, além de ser essencial para a síntese de polímeros estruturais, neurotransmissores e neuromoduladores ^{58,112}. Nossos resultados evidenciaram um aumento progressivo do imunocontéudo dos transportadores de glicose (GLUT1,

presente em astrócitos e oligodendrócitos e GLUT3, presente em neurônios) ao longo do neurodesenvolvimento (Figuras 5A-D). Além disso, observamos aumento na captação de glicose no hipocampo (Figura 7A,B) e na glicemia (Figura 8A,B), especialmente nas idades próximas ao desmame (DPN21). Esses achados estão de acordo com a literatura, que correlaciona a mudança da dieta, do leite materno para alimentos sólidos, com a maior utilização de glicose como principal substrato energético^{4,113,114}.

Notavelmente, observamos que as fêmeas apresentaram maior captação de glicose e maior conteúdo de GLUT3 em comparação aos machos. Isso sugere que as fêmeas são mais eficientes nesse caso, em utilizar a glicose disponível, o que pode explicar a maior vulnerabilidade dos machos a certos insultos cerebrais^{27,108,115,116}.

Durante o desenvolvimento, há uma notável adaptação metabólica relacionada às mudanças na dieta do animal, com predominância do leite materno nos neonatos, seguida pela transição para alimentos sólidos após o desmame¹¹⁷⁻¹¹⁹. O leite materno, rico em gordura, fornece acetoacetato, beta-hidroxibutirato, ácidos graxos livres e glicerol^{117,118}, além de 12% de carboidratos^{120,121}. Devido ao período neonatal ser rico em ácidos graxos e baixa em glicose, o cérebro utiliza outros recursos energéticos para sustentar o metabolismo e prevenir disfunções na cadeia respiratória, estresse oxidativo e neuroinflamação, aspectos que caracterizam os eventos neurodegenerativos^{112,122}. Assim, nossos resultados mostraram que o beta-hidroxibutirato estava presente em maiores quantidades no líquido cefalorraquidiano durante o período neonatal, especialmente em DPN14, com queda acentuada nos animais adultos (Figura 10 C,D). O DPN14 é marcado pelo ápice da mielinização, pelo desenvolvimento das células gliais e por uma maior expressão de MCT1 e MCT2^{10,123}. Estudos indicam que os CC são usados preferencialmente na síntese de esfingolípídeos e fosfolípídios, essenciais para o processo de mielinização durante o neurodesenvolvimento^{10,124}. Assim, a maior concentração de beta-hidroxibutirato no líquido cefalorraquidiano no DPN14 sugere sua

importância nesses eventos críticos do neurodesenvolvimento. Como mencionado previamente, a composição do leite materno varia durante a lactação; sendo o primeiro leite ingerido pelo filhote, conhecido como “coloostro”, rico em ácidos graxos^{120,125,126}. A beta oxidação dessa grande quantidade de ácidos graxos no colostro pode explicar a alta concentração de beta-hidroxiacetato no soro no DPN1. Nas primeiras horas após o nascimento, o metabolismo neonatal sofre um evento hipoglicêmico transitório¹²⁷. Assim, o beta-hidroxiacetato no soro pode ser utilizado como substrato energético, culminando na manutenção da homeostase sistêmica¹²⁸.

A beta-hidroxiacetato desidrogenase desempenha um papel essencial na beta-oxidação. No fígado, ela converte acetoacetato em beta-hidroxiacetato mediante a oxidação do NADH em NAD⁺, e em outros tecidos faz a reação contrária, convertendo o beta-hidroxiacetato a acetoacetato, por intermédio da redução do NAD⁺ em NADH, possibilitando, assim, a sua utilização no metabolismo celular^{129,130}. Desse modo, avaliamos a atividade da enzima pela redução do NAD⁺ a NADH após a adição de BOHB, conforme descrito por Zhang¹³¹. No tecido hepático dos neonatos DPN7, DPN14 e DPN21, observou-se uma baixa taxa de redução de NAD⁺ (Figura 11A,B), indicando que a oxidação do NADH em NAD⁺ é predominante nessas idades. Isso sugere uma maior produção de BOHB pela beta-hidroxiacetato desidrogenase, disponibilizando-o para outros tecidos durante a lactação^{131–136}. Por outro lado, os neonatos DPN1 mostraram elevada atividade enzimática no ensaio *in vitro*, sugerindo que a beta-hidroxiacetato desidrogenase está utilizando beta-hidroxiacetato como substrato, refletido pela redução de NAD⁺ em NADH. Esses dados podem simular o que acontece *in vivo*, já que nossos resultados indicaram uma alta quantidade de beta-hidroxiacetato sérico nesse período pós-natal (Figura 10 A,B). Como o fígado não utiliza beta-hidroxiacetato como substrato energético por falta da enzima tioforase, pode-se sugerir que o beta-hidroxiacetato sistêmico é convertido em acetoacetato pela beta-hidroxiacetato desidrogenase e disponibilizado para uso como energia alternativa pelos tecidos, especialmente durante o

evento hipoglicêmico após o nascimento¹³⁷. No entanto, a técnica *in vitro* apresenta limitações, evidenciadas pela alta atividade enzimática no DPN60 (Figura 11A,B), fato que pode não estar refletindo o que ocorre *in vivo*, dado que foi observada uma baixa quantidade de beta-hidroxibutirato sérico nesses animais (Figura 10A,B). Com a baixa disponibilidade sistêmica de beta-hidroxibutirato, não haveria substrato suficiente para a enzima apresentar uma alta atividade, entretanto, se houver substrato disponível, rapidamente o mesmo seria metabolizado, pois haveria capacidade enzimática para isso. Além disso, é bem estabelecido na literatura que animais adultos possuem baixa atividade da beta-hidroxibutirato desidrogenase no fígado e um metabolismo predominantemente glicolítico¹³⁸.

Como o enfoque do trabalho é o SNC, a avaliação da enzima no hipocampo evidenciou uma alta taxa de redução do NAD⁺, especialmente nos neonatos dos DPN14 e DPN21 (Figura 11C,D), em ambos os sexos. Isso poderia indicar que o beta-hidroxibutirato está sendo convertido em acetoacetato e utilizado como substrato energético nessas idades. A maior disponibilidade de BOHB no líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como a maior atividade enzimática no hipocampo durante o período neonatal, corroboram o uso dos corpos cetônicos como fonte energética predominante durante esse estágio do neurodesenvolvimento^{10,15,133}.

Em contrapartida, mesmo com baixa disponibilidade de beta-hidroxibutirato no LCR (Figura 10C,D), a atividade enzimática foi alta nos animais DPN60 (Figura 12C,D). Esse fato, assim como no fígado, pode ser explicado por limitações da técnica, uma vez a capacidade da enzima é elevada, porém, a falta de substrato impede sua atividade, além do metabolismo nos adultos serem predominantemente glicolítico^{2,4,138}.

O lactato pode servir como uma fonte potencial de energia durante todo o período perinatal, tanto para o cérebro quanto para os pulmões^{139,140}. Nos últimos dias da gestação, o feto acumula quantidades significativas de lactato no plasma sanguíneo, possivelmente devido à

glicólise na placenta, assim como tecidos fetais e maternos¹⁴¹⁻¹⁴³. Logo após o nascimento, o neonato não possui tecido adiposo branco¹⁴⁴. Conseqüentemente, o lactato presente na corrente sanguínea é utilizado como fonte de esqueleto de carbono durante metabolismo energético^{139,141}, confirmando o resultado em que os animais DPN1 apresentaram maiores níveis de lactato sistêmico quando comparado com as outras idades pós-natais (Figura 9A,B). Com o início da amamentação, especialmente com a ingestão do colostro, há um aumento no fornecimento de ácidos graxos não esterificados para o neonato, permitindo a iniciação da beta oxidação no fígado. Assim, o beta-hidroxibutirato também se torna um substrato crucial para manter o metabolismo celular^{39,40}.

Como amplamente documentado na literatura, a glicose desempenha um papel fundamental como fonte primária de energia para a manutenção do metabolismo das células neurais em adultos. Ela está envolvida em processos como neurotransmissão, neuromodulação, defesa contra o estresse oxidativo e biossíntese de aminoácidos, monossacarídeos e carboidratos mais complexos^{112,145}. A produção de energia ocorre principalmente através da glicólise, que resulta na formação de piruvato, e do metabolismo oxidativo, onde o piruvato é convertido em CO₂ via TCA e cadeia de transporte de elétrons^{146,147}.

Para a máxima produção de ATP a partir do piruvato, a presença de coenzimas redutoras como o NADH é essencial. Contudo, o NADH formado durante a glicólise não pode atravessar a membrana mitocondrial. Para contornar essa limitação, a lactato desidrogenase (LDH) regenera o NAD⁺ no citoplasma, convertendo o piruvato em lactato¹⁴⁸. No entanto, para que a glicólise continue, o lactato deve ser liberado da célula, seguindo a lei de ação das massas¹⁴⁹. Estudos recentes descrevem a existência de uma lançadeira de lactato mitocondrial, em que o lactato seria transportado para a mitocôndria e seria reconvertido a piruvato na matriz intracelular, permitindo, do mesmo modo, o processo glicolítico¹⁵¹. Como os vasos sanguíneos e o LCR podem se comunicar, e os MCT1 e MCT2 são expressos em células endoteliais vasculares, o lactato liberado pelas

células do SNC pode ser transportado para o LCR e estar disponível para uso conforme necessário ^{25,44,150}. Esse fenômeno explica o porquê os animais adultos apresentarem níveis mais elevados de lactato no LCR em comparação com neonatos (Figura 9C,D), além de estarem captando maiores quantidades de glicose que as outras idades (Figura 7A-B).

5.2 Marcação das células neurais e seus respectivos transportadores ao longo do neurodesenvolvimento

A MBP, expressa especificamente por oligodendrócitos, desempenha um papel crucial na morfogênese durante os estágios finais da diferenciação celular¹⁵⁴. Nossos resultados mostraram um aumento progressivo na intensidade de MBP ao longo do neurodesenvolvimento (Figura 13A,B, 17E,F e 23E,F), em conformidade com dados prévios da literatura¹⁵². Além disso, o transportador de glicose presente nos oligodendrócitos (GLUT1) foi imunomarcado e apresentou aumento durante a maturação cerebral, especialmente após o desmame, conforme evidenciado pelas análises de colocalização dos marcadores (Figura 23E,F). Esses resultados estão alinhados com os níveis proteicos de GLUT1 (Figura 5A,B), e com a dosagem e captação de glicose no soro e hipocampo, respectivamente (Figura 8 A,B e 7 A,B). Isso reforça a ideia de que animais adultos utilizam a glicose como principal substrato metabólico ^{4,113,114}.

Além do GLUT1, o MCT1, um transportador de lactato e BOHB, foi marcado junto à MBP. Embora individualmente não tenha mostrado diferenças significativas (Figura 16 A-D), a colocalização dos marcadores revelou um aumento, principalmente em adultos de ambos os sexos (Figura 17 A-F). Estudos prévios têm descrito uma correlação estreita entre as densidades de MCT1 e GLUT1 em diversas regiões cerebrais dos animais adultos, incluindo o hipocampo. Assim, regiões com alta captação e utilização de glicose também conseguem transportar quantidades consideráveis de monocarboxilatos, proporcionalmente à disponibilidade dos substratos^{153,155}. Portanto, os oligodendrócitos podem utilizar tanto

corpos cetônicos quanto lactato, dependendo da disponibilidade desses substratos.

Os astrócitos, principais células gliais do cérebro, são indispensáveis para a integração, sobrevivência e manutenção neuronal durante o desenvolvimento e a vida adulta^{69,156,157}. Para avaliá-los analisamos o imunoconteúdo de S100B e GFAP. S100B, uma proteína de ligação de Ca²⁺ amplamente expressa em astrócitos e outras células gliais e neurônios, está diretamente envolvida na proliferação celular, migração, atividade enzimática, maturação glial e neuronal, e manutenção da forma celular¹⁵⁸. A sua relevância no sistema nervoso central pode explicar o alto imunoconteúdo de S100B no PND1 e PND60 (Figura 6C,D). Nos neonatos, há uma intensa proliferação e diferenciação celular, enquanto nos adultos, a S100B auxilia na manutenção da forma e estrutura das células neurais, bem como nas atividades enzimáticas^{2,46,65,107,156,157}.

O GFAP é essencial para a estrutura do citoesqueleto glial, manutenção da força mecânica das células gliais, suporte aos neurônios vizinhos e integridade da barreira hematoencefálica^{64,67}. Durante o neurodesenvolvimento, a maturação dos astrócitos é caracterizada pelo aumento em número e complexidade, e está associada ao aumento da expressão de GFAP nessas células^{104,159,160}. Esse aumento progressivo no imunoconteúdo de GFAP durante o desenvolvimento foi confirmado, onde os animais DPN60 exibiram níveis superiores em comparação com as outras idades avaliadas (Figura 6A,B, 14A-F, 19C,F e 25C,F).

As análises de colocalização realizadas com dupla marcação GFAP e MCT4 mostraram que os neonatos DPN1, DPN7 e DPN14 apresentaram maior quantidade em comparação aos animais adultos e DPN21 (Figura 19A-L). Devido à dieta rica em gordura e à capacidade dos astrócitos de produzir corpos cetônicos e lactato, é possível inferir que os animais lactantes possam transportar esses metabólitos de forma mais eficientemente para o meio extracelular, suprindo assim as demandas energéticas dos neurônios e de outras células gliais^{18,133,139,157,161}.

Em adição, a colocalização entre GFAP e GLUT1 revelou que os animais DPN21 e DPN60 apresentaram valores superiores aos DPN7 e DPN14 (Figura 25A-L), reforçando a ideia de que, após o desmame, a atividade metabólica seja predominantemente glicolítica, conforme bem documentado na literatura^{58,117,157}. De forma interessante, na dupla marcação de GFAP e MCT4 os animais DPN1 mostraram um alto nível de colocalização, maior do que todos os outros períodos estudados, provavelmente para exportar lactato para os neurônios, e assim, manter o metabolismo energético (Figura 21A-L). As características do período neonatal, logo após o nascimento sugerem que os astrócitos desempenham um papel crucial na manutenção da função neuronal e glial durante esse período. Por outro lado, o feto acumula glicogênio no fígado durante os últimos cinco dias de gestação para manter um nível basal de glicose nos tecidos durante o pós-parto imediato¹⁶². A expressiva colocalização observada entre GFAP e GLUT1 no DPN1 sugere que os astrócitos captam a máxima quantidade de glicose basal disponibilizada pela degradação do glicogênio hepático, sustentando, seu metabolismo e o das outras células neurais. Além disso, eles convertem glicose em lactato, fornecendo-o aos componentes do sistema nervoso central, prevenindo disfunções metabólicas^{146,157}.

Os neurônios exibem variações metabólicas durante o desenvolvimento^{83,112,124,163}. Como bem compreendido, a dieta do animal e a disponibilidade de substratos afetam diretamente o metabolismo celular^{112,120,133,164}. Análises de imunofluorescência de NeuN (marcador neuronal) e MCT2 (exclusivo dos neurônios) no hipocampo mostraram que as intensidades de fluorescência de NeuN e MCT2 eram maiores nos períodos neonatais em aos adultos, com uma queda acentuada de MCT2 após o desmame. Esse padrão também foi observado nas colocalizações dos marcadores (Figura 15A-F, 20A-H, 21A-L). Esses resultados sugerem que os neurônios de animais neonatos de ambos os sexos utilizam tanto lactato quanto beta-hidroxibutirato como substratos energéticos. Isso é evidenciado pela maior quantidade de MCT2, que facilita a captação dos

monocarboxilatos (Figura 20A-H), e pela disponibilidade de lactato e beta-hidroxibutirato, especialmente nas primeiras horas de vida, presentes no LCR até o DPN14 (Figuras 9C,D, 10C,D,). Além disso, a captação de glicose é menor nos neonatos em comparação aos adultos (Figura 7 A,B), e a taxa de redução de NAD⁺ no hipocampo aumentou (Figura 11C,D). Isso sugere que o BOHB está sendo convertido em acetoacetato e utilizado como fonte metabólica pelas células cerebrais, incluindo os neurônios, nesse período.

Durante a fase final da gestação, os animais acumulam glicogênio no fígado e nas células gliais como proteção contra a hipoglicemia pós-parto^{146,157}. Estudos mostram que a diminuição do glicogênio começa em DPN1 e perdura até DPN7, com a beta-oxidação se tornando mais eficiente a partir desse período^{7,149,165,166}. Esses fatores podem explicar a maior intensidade de GLUT3 (transportador de glicose presente em neurônios) nas idades pós-natais observada nas regiões hipocampais, bem como as análises de colocalização, que foram maiores no DPN1 em comparação às outras idades, especialmente em relação ao DPN21 e DPN60 (Figura 26A-H, 27A-L). Isso sugere que a degradação do glicogênio nas células gliais e no fígado disponibiliza glicose para as células neuronais, permitindo que capturem eficientemente a mínima glicose presente.

5.3 Alternância metabólica durante a maturação cerebral

Nas primeiras horas pós-parto, ocorre uma acentuada queda glicêmica, levando os animais do DPN1 a utilizarem outros substratos para suprir o metabolismo energético. Esses substratos são acumulados nos últimos dias gestacionais ou provêm do colostro materno^{112,120}. A alta quantidade de beta-hidroxibutirato e lactato sistêmico (Figura 9A,B, 10A,B), a elevada atividade enzimática da beta-hidroxibutirato desidrogenase no fígado e hipocampo (Figura 11A-D), e a baixa captação de glicose no hipocampo (Figura 7A,B), juntamente com a alta colocalização dos marcadores NeuN com MCT2 e GFAP com MCT4 (Figura 21A-L, Figura 19A-L), sugerem que esses filhotes utilizam outras fontes metabólicas para

compensar o déficit energético. Isso é essencial, pois as células cerebrais estão em intensa proliferação e desenvolvimento, como demonstrado pelo alto imunocontéudo de S100B^{42,157,167,168}. O fígado acumula glicogênio durante o período gestacional tardio¹⁶⁵. Assim, os animais podem direcionar a glicose disponível para utilização no ciclo das pentoses fosfato, enquanto que o beta-hidroxibutirato e o lactato são utilizados para a produção de energia^{41,112,166}. Portanto, o metabolismo adequado durante esse período é crucial para o desenvolvimento cognitivo dos animais, sustentado por vários substratos energéticos.

Nos animais DPN7, observou-se maior imunomarcagem de MCT2 e colocalização entre NeuN e MCT2 (Figura 20A-H e Figura 21A-L) no hipocampo em comparação com DPN21 e DPN60, em ambos os sexos. No entanto, tanto a concentração de lactato e beta-hidroxibutirato no soro quanto no LCR foram baixas (Figura 9A-D, 10A-D), assim como a atividade enzimática da beta-hidroxibutirato desidrogenase (Figura 11A-D). Apesar disso, a captação de glicose foi superior às outras idades neonatais (Figura 7A,B), e a intensidade de fluorescência do GLUT3 (Figura 26A-H), assim como sua colocalização com NeuN nas regiões hipocampais, foi maior que nos animais DPN21 e DPN60 (Figura 27A-L). Estudos indicam maior degradação de glicogênio no fígado e células gliais durante a primeira semana de vida¹⁶⁵, sugerindo que os neurônios podem utilizar a glicose hepática como substrato energético, além do lactato proveniente da degradação do glicogênio glial, mesmo em menor quantidade.

O DPN14 é um período crítico no neurodesenvolvimento, caracterizado pelo desenvolvimento de células gliais, poda sináptica, sinaptogênese e intensa mielinização^{16,25,58}. Ademais, estudos que evidenciam a preferência pelo beta-hidroxibutirato como substrato para a síntese de fosfolipídios e esfingolipídios, mediante o crescimento e a mielinização cerebral¹⁰. Contudo, como nossos resultados sugerem que durante a segunda semana pós-natal o metabolismo cerebral dos neonatos é predominantemente cetogênico, pode-se sugerir que o beta-hidroxibutirato cumpre um papel indispensável nos eventos do

neurodesenvolvimento, suprindo eficientemente o metabolismo das células neurais e prevenindo insultos metabólicos no sistema nervoso central.

Na literatura é amplamente reconhecido que o DPN21 marca o período de desmame nos roedores, equivalente a cerca de 2 anos de idade nos humanos^{166,169}. O desmame é caracterizado por uma mudança drástica na dieta, deixando de ser predominantemente cetogênico para um metabolismo glicolítico¹⁷⁰. Nossos resultados demonstram justamente a transição metabólica durante esse período, que apesar de se apresentar mais glicolítico, ainda assim possui disponibilidade de lactato e beta-hidroxibutirato para serem utilizados como substratos energéticos quando necessário. Mesmo que previamente os filhotes começam a mordiscar a ração disponibilizada para a mãe¹⁷¹, o que explicaria o metabolismo já glicolítico, a disponibilidade de substratos alternativos pode ser uma forma de proteção contra possíveis instabilidades metabólicas devido mudança na dieta, o que poderia acarretar em déficits cerebrais.

Ao se tratar dos animais DPN60, nossos dados bioquímicos e morfológicos sugerem o predomínio do metabolismo glicolítico, tanto nas células gliais quanto nas células neurais, corroborando com dados já definidos na literatura, metabolismo esse diretamente relacionado com a dieta do animal^{117,133,172}.

5.4 Diferenças sexo-específicas no aproveitamento dos substratos energéticos pelas células neurais no hipocampo

Diversos estudos têm explorado o dimorfismo sexual no sistema nervoso central, com particular ênfase no hipocampo. Este interesse é motivado pelo papel crítico do hipocampo na formação e consolidação da memória, bem como pela presença de neurônios que acumulam esteroides gonadais^{91,173}. Nos neurônios masculinos predomina-se o metabolismo oxidativo, sendo mais suscetíveis à insultos cerebrais, além de dados prévios demonstraram que os astrócitos hipocampais das fêmeas são mais resistentes a eventos de privação de oxigênio e glicose¹⁷⁴. Estudos também

revelam que no hipocampo feminino, tanto os neurônios quanto os astrócitos favorecem predominantemente a glicólise. As fêmeas apresentam maior abundância de enzimas relacionadas à glicólise e à via das pentoses fosfato em comparação com os machos¹⁷⁵. Além disso, astrócitos femininos exibem níveis elevados de lactato desidrogenase, aumentando a disponibilidade de lactato para o uso energético neuronal^{176,177}. Nossas análises focadas em respostas sexo-específicas mostraram que as ratas fêmeas apresentavam maior captação de glicose no hipocampo, com maior imunocontéudo de MCT2 e GLUT3 em comparação com os animais machos (Figuras 4D, 5D, 7B). Combinando essas descobertas com pesquisas anteriores, sugerimos que neurônios femininos possuem maior capacidade de captar glicose diretamente e de utilizar lactato produzido pelos astrócitos^{23,98}. Essa flexibilidade metabólica e possivelmente melhor capacidade de utilização dos substratos, pode ser o que confere vantagens às fêmeas na mitigação de desafios metabólicos, potencialmente reduzindo a vulnerabilidade a insultos cerebrais específicos em comparação aos machos^{96,108}.

Pesquisas adicionais indicam que os animais machos tendem a ter maior abundância de astrócitos, neurônios maduros e em proliferação no hipocampo, com neurogênese predominante na área do giro dentado em adultos⁹². Nossos resultados morfológicos sugerem maior expressão de MCT2 e GLUT3 nas regiões do giro denteado e do hilo, bem como de GLUT1 na região CA1 em machos (Figuras 21A-L, 25A-L e 27A-L), correlacionando-se possivelmente com a maior população astrocitária e neuronal nestas áreas específicas do hipocampo. Entretanto, embora os machos apresentem uma maior quantidade de transportadores, isso não se traduz necessariamente em uma melhor utilização dos substratos energéticos. Além disso, a predominância do metabolismo oxidativo neuronal nos machos e a maior eficiência das fêmeas em captar e utilizar metabólitos sustenta o fato dos machos serem mais vulneráveis a insultos cerebrais^{98,108,174,178,179}.

As divergências entre os nossos resultados em relação aos

transportadores neuronais (MCT2 e GLUT3)segundo o sexo podem ser atribuídas a aspectos técnicos, dado que a imunofluorescência permite uma avaliação detalhada de cada região, enquanto o *Western blotting* analisa a estrutura como um todo sem distinguir células ou regiões individuais.

Em resumo, apesar das variações resultantes de diferentes técnicas, o hipocampo continua sendo uma estrutura cerebral diretamente influenciada pelos sexos. Essa característica desempenha um papel fundamental na compreensão e no estudo em tratamento de neuropatologias que apresentam uma prevalência específica do sexo ¹⁰⁸.

6. CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho indicam que nos primeiros dias de vida, os neonatos utilizam substratos acumulados nas fases finais da gestação, como lactato, glicose proveniente do glicogênio e beta-hidroxibutirato do colostro rico em lipídios. Na segunda semana pós-natal, o beta-hidroxibutirato emerge como a principal fonte de energia. Antes do desmame, há uma transição metabólica da utilização de gorduras para carboidratos como fonte energética predominante. Na fase adulta, a glicose assume o papel central como metabólito principal. Além disso, o estudo confirmou nossa hipótese de trabalho ao evidenciar diferenças metabólicas entre machos e fêmeas, enfatizando a adaptação cerebral às variações nos substratos energéticos. Essas descobertas, além de corroborar com a alternância de substratos ao longo da maturação cerebral enfatizam o melhor aproveitamento das moléculas energéticas pelas fêmeas, concedendo vantagens relacionadas ao dimorfismo sexual na prevenção de deficiências metabólicas em diferentes etapas do desenvolvimento encefálico.

7. PERSPECTIVAS

A variação de substratos ao longo do desenvolvimento cerebral desempenha um papel crucial nos eventos de neurodesenvolvimento. Assim, objetivamos avaliar a expressão dos transportadores de monocarboxilato ao longo do tempo, por intermédio de análises moleculares. Além disso, nossos dados indicam que tanto o beta-hidroxibutirato quanto o lactato estão disponíveis como substratos metabólicos para suprir a demanda energética. No entanto, a compreensão sobre a possível competição entre esses metabólitos e a preferência das células neurais ainda é limitada. Para investigar isso, planejamos utilizar métodos bioquímicos e moleculares para avaliar a preferência metabólica entre lactato e beta-hidroxibutirato em células gliais e neuronais. Além disso, nossos dados indicam que o glicogênio desempenha um papel fundamental no metabolismo dos animais no DPN7, e futuras análises estarão focadas na degradação desse substrato, tanto no fígado quanto nas células gliais. Essas investigações aprofundadas nos ajudarão a compreender melhor o perfil metabólico durante a maturação cerebral e podem fornecer *insights* valiosos para o tratamento de doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento

8. REFERÊNCIAS

1. Ballard, O., and Morrow, A.L. (2013). Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors, <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>.
2. Brekke, E., Morken, T.S., and Sonnewald, U. (2015). Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain at Elsevier Ltd, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.02.002>.
3. Brown, A.M., Tekkök, S.B., and Ransom, B.R. (2004). Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochem. Int.* 45, 529–536. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2003.11.005>.
4. Machado, U.F. (1998). Transportadores de glicose. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 42. <https://doi.org/10.1590/s0004-27301998000600003>.
5. Nehlig, A., and Pereira de Vasconcelos, A. (1993). Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats, [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90022-K](https://doi.org/10.1016/0301-0082(93)90022-K).
6. Arponen, M., Jalava, N., Widjaja, N., and Ivaska, K.K. (2022). Glucose transporters GLUT1, GLUT3, and GLUT4 have different effects on osteoblast proliferation and metabolism. *Front. Physiol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1035516>.
7. Brown, A.M., and Ransom, B.R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism, <https://doi.org/10.1002/glia.20557>.
8. Maher, F., Davies-Hill, T.M., Lysko, P.G., Henneberry, R.C., and Simpson, I.A. (1991). Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol. Cell. Neurosci.* 2. [https://doi.org/10.1016/1044-7431\(91\)90066-W](https://doi.org/10.1016/1044-7431(91)90066-W).
9. Ferré, P., Decaux, J.F., Issad, T., and Girard, J. (1986). Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn., <https://doi.org/10.1051/rnd:19860413>.
10. Yeh, Y.Y., and Sheehan, P.M. (1985). Preferential utilization of ketone bodies in the brain and lung of newborn rats.

11. Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Grunstein, R., and Nissim, I. (1997). Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J. Neurochem.* 69, 682–692.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020682.x>.
12. Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Castellano, C.A., St-Pierre, V., Hennebelle, M., and Cunnane, S.C. (2017). Inverse relationship between brain glucose and ketone metabolism in adults during short-term moderate dietary ketosis: A dual tracer quantitative positron emission tomography study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37. <https://doi.org/10.1177/0271678X16669366>.
13. Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 15. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-7560\(199911/12\)15:6<412::aid-dmrr72>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-7560(199911/12)15:6<412::aid-dmrr72>3.0.co;2-8).
14. Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D.C., Yan, S., Du, Naini, A., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ramasamy, R., et al. (2003). D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 112. <https://doi.org/10.1172/JCI200318797>.
15. Nehlig, A. (2004). Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 70, 265–275. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2003.07.006>.
16. Edmond, J., Auestad, N., Robbins, R.A., and Bergstrom, J.D. (1985). Ketone body metabolism in the neonate: development and the effect of diet.
17. Nehlig, A. (1997). Cerebral energy metabolism, glucose transport and blood flow: Changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia.
18. Felmler, M.A., Jones, R.S., Rodriguez-Cruz, V., Follman, K.E., and Morris, M.E. (2020). Monocarboxylate transporters (SLC16): Function, regulation, and role in health and disease, <https://doi.org/10.1124/pr.119.018762>.
19. Halestrap, A.P., and Price, N.T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: Structure, function and

- regulation, <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3430281>.
20. Vijay, N., and Morris, M. (2014). Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain. *Curr. Pharm. Des.* 20. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990462>.
 21. Morris, M.E., and Felmler, M.A. (2008). Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: Characterization, function and role in the transport of the drug of abuse γ -Hydroxybutyric acid, <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9035-6>.
 22. Poole, R.C., and Halestrap, A.P. (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.4.c761>.
 23. Garcia, C.K., Brown, M.S., Pathak, R.K., and Goldstein, J.L. (1995). cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J. Biol. Chem.* 270. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1843>.
 24. Lin, R.Y., Vera, J.C., Chaganti, R.S.K., and Golde, D.W. (1998). Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J. Biol. Chem.* 273. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.44.28959>.
 25. Pierre, K., Pellerin, L., Debernardi, R., Riederer, B.M., and Magistretti, P.J. (2000). Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience* 100. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00294-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00294-3).
 26. Halestrap, A.P., and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family - From monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond, <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1067-2>.
 27. Odorcyk, F.K., Duran-Carabali, L.E., Rocha, D.S., Sanches, E.F., Martini, A.P., Venturin, G.T., Greggio, S., da Costa, J.C., Kucharski, L.C., Zimmer, E.R., et al. (2020). Differential glucose and beta-hydroxybutyrate metabolism confers an intrinsic neuroprotection to the immature brain in a rat model of neonatal hypoxia ischemia. *Exp. Neurol.* 330, 113317.

<https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2020.113317>.

28. Barañano, K.W., and Hartman, A.L. (2008). The ketogenic diet: Uses in epilepsy and other neurologic illnesses, <https://doi.org/10.1007/s11940-008-0043-8> .
29. Field, R., Field, T., Pourkazemi, F., and Rooney, K. (2022). Ketogenic diets and the nervous system: A scoping review of neurological outcomes from nutritional ketosis in animal studies, <https://doi.org/10.1017/S0954422421000214>.
30. Stafstrom, C.E., and Rho, J.M. (2012). The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front. Pharmacol.* 3 APR. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00059>.
31. Imdad, K., Abualait, T., Kanwal, A., AlGhannam, Z.T., Bashir, S., Farrukh, A., Khattak, S.H., Albaradie, R., and Bashir, S. (2022). The Metabolic Role of Ketogenic Diets in Treating Epilepsy, <https://doi.org/10.3390/nu14235074> .
32. McNally, M.A., and Hartman, A.L. (2012). Ketone bodies in epilepsy, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07670.x> .
33. Bough, K.J., Wetherington, J., Hassel, B., Pare, J.F., Gawryluk, J.W., Greene, J.G., Shaw, R., Smith, Y., Geiger, J.D., and Dingledine, R.J. (2006). Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann. Neurol.* 60. <https://doi.org/10.1002/ana.20899>.
34. Broom, G.M., Shaw, I.C., and Rucklidge, J.J. (2019). The ketogenic diet as a potential treatment and prevention strategy for Alzheimer's disease, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.10.003>.
35. Rusek, M., Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M., and Czuczwar, S.J. (2019). Ketogenic diet in alzheimer's disease, <https://doi.org/10.3390/ijms20163892>.
36. Bolaños, J.P., and Medina, J.M. (1993). Lipogenesis from lactate in fetal rat brain during late gestation. *Pediatr. Res.* 33. <https://doi.org/10.1203/00006450-199301000-00014>.
37. Fernandez, E., Valcarce, C., Cuezva, J.M., and Medina, J.M. (1983). Postnatal hypoglycaemia and gluconeogenesis in the newborn rat. Delayed onset of gluconeogenesis in prematurely delivered

- newborns. *Biochem. J.* 214. <https://doi.org/10.1042/bj2140525>.
38. Vicario, C., Juanes, M.C., Martín-Barrientos, J., and Medina, J.M. (1990). Effect of postnatal hypoxia on ammonia metabolism during the early neonatal period in the rat. *Neonatology* 57. <https://doi.org/10.1159/000243171>.
 39. Vicario, C., Bolanos, J.P., and Medina, J.M. (1991). The fate of lactate in isolated cells from early neonatal rat brain. Comparison with glucose and 3-hydroxybutyrate. In *Biochemical Society Transactions* <https://doi.org/10.1042/bst019141s>.
 40. Vicario, C., and Medina, J.M. (1992). Metabolism of Lactate in the Rat Brain During the Early Neonatal Period. *J. Neurochem.* 59. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08872.x>.
 41. Dombrowski, G.J., Swiatek, K.R., and Chao, K.L. (1989). Lactate, 3-hydroxybutyrate, and glucose as substrates for the early postnatal rat brain. *Neurochem. Res.* 14. <https://doi.org/10.1007/BF00964877>.
 42. Medina, J.M., and Tabernero, A. (2005). Lactate utilization by brain cells and its role in CNS development. In *Journal of Neuroscience Research* <https://doi.org/10.1002/jnr.20336>.
 43. Cuezva, J.M., Moreno, F.J., Medina, J.M., and Mayor, F. (1980). Prematurity in the rat. I. Fuels and gluconeogenic enzymes. *BIOL. NEONATE* 37.
 44. Pérez-Escuredo, J., Van Hée, V.F., Sboarina, M., Falces, J., Payen, V.L., Pellerin, L., and Sonveaux, P. (2016). Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.013>.
 45. Skoff, R.P. (1990). Gliogenesis in rat optic nerve: Astrocytes are generated in a single wave before oligodendrocytes. *Dev. Biol.* 139. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90285-Q](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90285-Q).
 46. Reemst, K., Noctor, S.C., Lucassen, P.J., and Hol, E.M. (2016). The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Front. Hum. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>.
 47. Wei, P., Zhang, W., Yang, L.-S., Zhang, H.-S., Xu, X.-E., Jiang, Y.-H., Huang, F.-P., and Shi, Q. (2013). Serum GFAP autoantibody as

- an ELISA-detectable glioma marker. *Tumor Biol.* 34, 2283–2292.
<https://doi.org/10.1007/s13277-013-0770-7>.
48. Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, <https://doi.org/10.1038/nrn1824> .
 49. Sofroniew, M. V., and Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology, <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>.
 50. Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. Paris Maloine 2.
 51. Doyle, D. (1978). The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Supporting Cells. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 41. <https://doi.org/10.1136/jnnp.41.2.191-c>.
 52. Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. *Science* (80-.). 247. <https://doi.org/10.1126/science.1967852>.
 53. Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.1038/nn1703>.
 54. McGann, J.C., Lioy, D.T., and Mandel, G. (2012). Astrocytes conspire with neurons during progression of neurological disease, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.009> .
 55. Sattler, R., and Tymianski, M. (2001). Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 24. <https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:107>.
 56. Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update, <https://doi.org/10.1002/glia.20528> .
 57. Medina, J.M., Taberner, A., Tovar, J.A., and Martín-Barrientos, J. (1996). Metabolic fuel utilization and pyruvate oxidation during the postnatal period. In *Journal of Inherited Metabolic Disease* <https://doi.org/10.1007/BF01799104>.

58. Simpson, I.A., Carruthers, A., and Vannucci, S.J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: The role of nutrient transporters, <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600521> .
59. Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., and Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* (80-.). 322.
<https://doi.org/10.1126/science.1164022>.
60. Patani, R., Hardingham, G.E., and Liddelow, S.A. (2023). Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration, <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00822-1> .
61. Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation AIDS central nervous system axon regeneration. *Nature* 532.
<https://doi.org/10.1038/nature17623>.
62. Gallo, V., and Deneen, B. (2014). Glial development: The crossroads of regeneration and repair in the CNS,
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.010> .
63. Liddelow, S.A., and Barres, B.A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential,
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006> .
64. Hol, E.M., and Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004> .
65. Janigro, D., Mondello, S., Posti, J.P., and Unden, J. (2022). GFAP and S100B: What You Always Wanted to Know and Never Dared to Ask, <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.835597> .
66. Jessen, K.R., Thorpe, R., and Mirsky, R. (1984). Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J. Neurocytol.* 13.
<https://doi.org/10.1007/BF01148114>.
67. Middeldorp, J., and Hol, E.M. (2011). GFAP in health and disease, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>.

68. Heizmann, C.W., Fritz, G., and Schäfer, B.W. (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology., <https://doi.org/10.2741/a846>
<https://doi.org/10.2741/a846>.
69. Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., and Gonçalves, C.A. (2008). A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99.
<https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2007.11.021>.
70. Marenholz, I., Heizmann, C.W., and Fritz, G. (2004). S100 proteins in mouse and man: From evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.096>.
71. Zimmer, D.B., Cornwall, E.H., Landar, A., and Song, W. (1995). The S100 protein family: History, function, and expression. *Brain Res. Bull.* 37. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(95\)00040-2](https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00040-2).
72. Nave, K.A., Asadollahi, E., and Sasmita, A. (2023). Expanding the function of oligodendrocytes to brain energy metabolism, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102782> .
73. Miller, G. (2005). The dark side of glia, <https://doi.org/10.1126/science.308.5723.778> .
74. Barres, B.A., and Raff, M.C. (1993). Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 361. <https://doi.org/10.1038/361258a0>.
75. Chen, D., Huang, Y., Shi, Z., Li, J., Zhang, Y., Wang, K., Smith, A.D., Gong, Y., and Gao, Y. (2020). Demyelinating processes in aging and stroke in the central nervous system and the prospect of treatment strategy, <https://doi.org/10.1111/cns.13497>.
76. Pfeiffer, S.E., Warrington, A.E., and Bansal, R. (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.* 3. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(93\)90213-K](https://doi.org/10.1016/0962-8924(93)90213-K).
77. Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule, <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19> .

78. Tassinari, I., and De Fraga, L. (2022). Potential use of lactate for the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.322459> .
79. Dumont, D., Noben, J.P., Moreels, M., Vanderlocht, J., Hellings, N., Vandenameele, F., Lambrichts, I., Stinissen, P., and Robben, J. (2007). Characterization of mature rat oligodendrocytes: A proteomic approach. *J. Neurochem.* 102. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04575.x>.
80. Almeida, R.G., and Lyons, D.A. (2017). On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function. *J. Neurosci.* 37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3185-16.2017>.
81. Bonnefil, V., Dietz, K., Amatruda, M., Wentling, M., Aubry, A. V., Dupree, J.L., Temple, G., Park, H.J., Burghardt, N.S., Casaccia, P., et al. (2019). Region-specific myelin differences define behavioral consequences of chronic social defeat stress in mice. *Elife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.40855>.
82. Gibson, E.M., Geraghty, A.C., and Monje, M. (2018). Bad wrap: Myelin and myelin plasticity in health and disease, <https://doi.org/10.1002/dneu.22541> .
83. Gibson, E.M., Purger, D., Mount, C.W., Goldstein, A.K., Lin, G.L., Wood, L.S., Inema, I., Miller, S.E., Bieri, G., Zuchero, J.B., et al. (2014). Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* (80-). 344. <https://doi.org/10.1126/science.1252304>.
84. Xin, W., and Chan, J.R. (2020). Myelin plasticity: sculpting circuits in learning and memory, <https://doi.org/10.1038/s41583-020-00379-8> .
85. Doretto, S., Malerba, M., Ramos, M., Ikrar, T., Kinoshita, C., de Mei, C., Tirota, E., Xu, X., and Borrelli, E. (2011). Oligodendrocytes as regulators of neuronal networks during early postnatal development. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019849>.
86. Poduslo, S.E., and Miller, K. (1991). Ketone bodies as precursors for lipid synthesis in neurons, astrocytes, and oligodendroglia (myelin) in hyperthyroidism, hyperketonemia and hypoketonemia. *Neurochem. Int.* 18. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(91\)90040-K](https://doi.org/10.1016/0197-0186(91)90040-K).

87. Cahill, L., and Aswad, D. (2015). Sex Influences on the Brain: An Issue Whose Time Has Come at Cell Press, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.021>
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.021>.
88. Jung, H., Park, H., Choi, Y., Kang, H., Lee, E., Kweon, H., Roh, J.D., Ellegood, J., Choi, W., Kang, J., et al. (2018). Sexually dimorphic behavior, neuronal activity, and gene expression in *Chd8*-mutant mice. *Nat. Neurosci.* 21. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0208-z>.
89. Janowsky, J.S. (1989). Sexual dimorphism in the human brain: Dispelling the myths, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1989.tb03987.x> .
90. Anand, K., and Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview, <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>
<https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>.
91. Kim, Y.S., Stumpf, W.E., Sar, M., Christine, M., and Martinez-vargas (1978). Estrogen and androgen target cells in the brain of fishes, reptiles and birds: Phylogeny and ontogeny. *Integr. Comp. Biol.* 18. <https://doi.org/10.1093/icb/18.3.425>.
92. Bowers, J.M., Waddell, J., and McCarthy, M.M. (2010). A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biol. Sex Differ.* 1. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-1-8>.
93. Peacock, J.L., Marston, L., Marlow, N., Calvert, S.A., and Greenough, A. (2012). Neonatal and infant outcome in boys and girls born very prematurely. *Pediatr. Res.* 71. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.50>.
94. Cerghet, M., Skoff, R.P., Bessert, D., Zhang, Z., Mullins, C., and Ghandour, M.S. (2006). Proliferation and Death of Oligodendrocytes and Myelin Proteins Are Differentially Regulated in Male and Female Rodents. *J. Neurosci.* 26, 1439–1447. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2219-05.2006>.
95. Sunny, D.E., Hammer, E., Stempel, S., Joseph, C., Manchanda, H., Ittermann, T., Hübner, S., Weiss, F.U., Völker, U., and Heckmann, M. (2020). *Nup133* and $ER\alpha$ mediate the differential effects of

- hyperoxia-induced damage in male and female OPCs. *Mol. Cell. Pediatr.* 7. <https://doi.org/10.1186/s40348-020-00102-8>.
96. Yasuda, K., Maki, T., Kinoshita, H., Kaji, S., Toyokawa, M., Nishigori, R., Kinoshita, Y., Ono, Y., Kinoshita, A., and Takahashi, R. (2020). Sex-specific differences in transcriptomic profiles and cellular characteristics of oligodendrocyte precursor cells. *Stem Cell Res.* 46. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101866>.
 97. Swamydas, M., Bessert, D., and Skoff, R. (2009). Sexual dimorphism of oligodendrocytes is mediated by differential regulation of signaling pathways. *J. Neurosci. Res.* 87. <https://doi.org/10.1002/jnr.21943>.
 98. Acaz-Fonseca, E., Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L.M., and Barreto, G.E. (2016). Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.06.002> .
 99. Amateur, S.K., and McCarthy, M.M. (2002). Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area. *J. Neuroendocrinol.* 14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2002.00858.x>.
 100. Arias, C., Zepeda, A., Hernández-Ortega, K., Leal-Galicia, P., Lojero, C., and Camacho-Arroyo, I. (2009). Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus. *Horm. Behav.* 55. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.10.016>.
 101. Rasia-Filho, A.A., Fabian, C., Rigoti, K.M., and Achaval, M. (2004). Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* 126. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.009>.
 102. Sonnewald, U. (2014). Altered astrocyte-neuronal interactions after hypoxia-ischemia in the neonatal brain in female and male rats. *Stroke.* 45, 2777–2785. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005341>.
 103. Mong, J.A., Kurzweil, R.L., Davis, A.M., Rocca, M.S., and McCarthy,

- M.M. (1996). Evidence for sexual differentiation of glia in rat brain. *Horm. Behav.* 30. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0058>.
104. Garcia-Segura, L.M., Suarez, I., Segovia, S., Tranque, P.A., Calés, J.M., Aguilera, P., Olmos, G., and Guillamón, A. (1988). The distribution of glial fibrillary acidic protein in the adult rat brain is influenced by the neonatal levels of sex steroids. *Brain Res.* 456. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90239-9).
105. Mong, J.A., and McCarthy, M.M. (1999). Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes: Implications for synaptic patterning, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(19990915\)40:4<602::AID-NEU14>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(19990915)40:4<602::AID-NEU14>3.0.CO;2-O) .
106. Beyer, C., Epp, B., Fassberg, J., Reisert, I., and Pilgrim, C. (1990). Region- and sex-related differences in maturation of astrocytes in dissociated cell cultures of embryonic rat brain. *Glia* 3. <https://doi.org/10.1002/glia.440030108>.
107. Sorge, R.E., Mapplebeck, J.C.S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J.K., Martin, L.J., Austin, J.S., Sotocinal, S.G., Chen, D., et al. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat. Neurosci.* 18. <https://doi.org/10.1038/nn.4053>.
108. Netto, C.A., Sanches, E., Odorcyk, F.K., Duran-Carabali, L.E., and Weis, S.N. (2017). Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat at John Wiley and Sons Inc., <https://doi.org/10.1002/jnr.23828> <https://doi.org/10.1002/jnr.23828>.
109. Raz, N., Ghisletta, P., Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M., and Lindenberger, U. (2010). Trajectories of brain aging in middle-aged and older adults: Regional and individual differences. *Neuroimage* 51, 501–511. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2010.03.020>.
110. Mayoral, S.R., Omar, G., and Penn, A.A. (2009). Sex differences in a hypoxia model of preterm brain damage. *Pediatr. Res.* 66. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181b1bc34>.
111. Flórez-Vargas, O., Brass, A., Karystianis, G., Bramhall, M., Stevens, R., Cruickshank, S., and Nenadic, G. (2016). Bias in the reporting of sex and age in biomedical research on mouse models. *Elife* 5.

- <https://doi.org/10.7554/eLife.13615>.
112. Dienel, G.A. (2019). Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function. *Physiol. Rev.* 99.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>.
 113. Brekke, E., Morken, T.S., and Sonnewald, U. (2015). Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.02.002> .
 114. Brown, G.K. (2000). Glucose transporters: Structure, function and consequences of deficiency. In *Journal of Inherited Metabolic Disease* <https://doi.org/10.1023/A:1005632012591>.
 115. Hill, C.A., and Fitch, R.H. (2012). Sex differences in mechanisms and outcome of neonatal hypoxia-ischemia in rodent models: Implications for sex-specific neuroprotection in clinical neonatal practice, <https://doi.org/10.1155/2012/867531>
<https://doi.org/10.1155/2012/867531>.
 116. Mirza, M.A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L.D., and Liu, F. (2015). Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Neuroinflammation* 12.
<https://doi.org/10.1186/s12974-015-0251-6>.
 117. Lust, W.D., Pundik, S., Zechel, J., Zhou, Y., Buczek, M., and Selman, W.R. (2003). Changing metabolic and energy profiles in fetal, neonatal, and adult rat brain. *Metab. Brain Dis.* 18.
<https://doi.org/10.1023/A:1025503115837>.
 118. Morris, A.A.M. (2005). Cerebral ketone body metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-5518-0>.
 119. Wang, L.S., Zhou, J., Shao, X.M., and Tang, X.C. (2002). Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 949. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02977-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02977-3).
 120. Nicholas, K.R., and Hartmann, P.E. (1991). Milk secretion in the rat: Progressive changes in milk composition during lactation and weaning and the effect of diet. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 98. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90443-G](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90443-G).
 121. Wu, P.Y.K., Edmond, J., Auestad, N., Rambathla, S., Benson, J.,

- and Picone, T. (1986). Medium-chain triglycerides in infant formulas and their relation to plasma ketone body concentrations. *Pediatr. Res.* 20. <https://doi.org/10.1203/00006450-198604000-00016>.
122. Vannucci, R.C., Christensen, M.A., and Stein, D.T. (1989). Regional cerebral glucose utilization in the immature rat: Effect of hypoxia-ischemia. *Pediatr. Res.* <https://doi.org/10.1203/00006450-198909000-00011>.
123. Rafiki, A., Boulland, J.L., Halestrap, A.P., Ottersen, O.P., and Bergersen, L. (2003). Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* 122. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.040>.
124. Bandeira, F., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804650106>.
125. DeVivo, D.C., Leckie, M.P., and Agrawal, H.C. (1975). d- β -HYDROXYBUTYRATE: A MAJOR PRECURSOR OF AMINO ACIDS IN DEVELOPING RAT BRAIN. *J. Neurochem.* 25. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb12244.x>.
126. LUCKEY, T.D., MENDE, T.J., and PLEASANTS, J. (1954). The physical and chemical characterization of rat's milk. *J. Nutr.* 54. <https://doi.org/10.1093/jn/54.3.345>.
127. Nagaya, M., and Widmaier, E.P. (1993). Twenty-four hour profiles of glucose, corticosterone and adrenocorticotrophic hormone during the first postnatal day in rats. *Neonatology* 64. <https://doi.org/10.1159/000243998>.
128. Ferre, P., Satabin, P., Decaux, J.F., Escriva, F., and Girard, J. (1983). Development and regulation of ketogenesis in hepatocytes isolated from newborn rats. *Biochem. J.* 214. <https://doi.org/10.1042/bj2140937>.
129. Otsuka, H., Kimura, T., Ago, Y., Nakama, M., Aoyama, Y., Abdelkreem, E., Matsumoto, H., Ohnishi, H., Sasai, H., Osawa, M., et al. (2020). Deficiency of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase

- (BDH1) in mice causes low ketone body levels and fatty liver during fasting. *J. Inherit. Metab. Dis.* 43. <https://doi.org/10.1002/jimd.12243>.
130. Pull, I., and McIlwain, H. (1971). 3-Hydroxybutyrate dehydrogenase of rat brain on dietary change and during maturation. *J. Neurochem.* 18. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb12046.x>.
131. Zhang, W.W., Churchill, S., and Churchill, P. (1989). Developmental regulation of D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase in rat liver and brain. *FEBS Lett.* 256. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81720-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81720-X).
132. Dahlquist, G., Persson, U., and Persson, B. (1972). The activity of D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase in fetal, infant and adult rat brain and the influence of starvation. *Neonatology* 20. <https://doi.org/10.1159/000240444>.
133. Edmond, J. (1992). Energy metabolism in developing brain cells. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* <https://doi.org/10.1139/y92-253>.
134. Edmond, J., Robbins, R.A., Bergstrom, J.D., Cole, R.A., and de Vellis, J. (1987). Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J. Neurosci. Res.* 18. <https://doi.org/10.1002/jnr.490180407>.
135. Klee, C.B., and Sokoloff, L. (1967). Changes in D(--)-beta-hydroxybutyric dehydrogenase activity during brain maturation in the rat. *J. Biol. Chem.* 242. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)95830-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)95830-8).
136. Yeh, Y. -Y (1984). Biosynthesis of phospholipids and sphingolipids from acetoacetate and glucose in different regions of developing brain in vivo. *J. Neurosci. Res.* 11. <https://doi.org/10.1002/jnr.490110406>.
137. De Angelis, L.C., Brigati, G., Polleri, G., Malova, M., Parodi, A., Minghetti, D., Rossi, A., Massirio, P., Traggiai, C., Maghnie, M., et al. (2021). Neonatal Hypoglycemia and Brain Vulnerability, <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.634305> .
138. Tucker, G.A., and Dawson, A.P. (1979). The kinetics of rat liver and

- heart mitochondrial β -hydroxybutyrate dehydrogenase. *Biochem. J.* 179. <https://doi.org/10.1042/bj1790579>.
139. Fernandez, E., and Medina, J.M. (1986). Lactate utilization by the neonatal rat brain in vitro. Competition with glucose and 3-hydroxybutyrate. *Biochem. J.* 234. <https://doi.org/10.1042/bj2340489>.
140. Shambaugh, G.E., Koehler, R.A., and Freinkel, N. (1977). Fetal fuels II: Contributions of selected carbon fuels to oxidative metabolism in rat conceptus. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. Gastrointest. Physiol.* 2. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1977.233.6.e457>.
141. Almeida, A., Bolaños, J.P., and Medina, J.M. (1992). Ketogenesis from lactate in rat liver during the perinatal period. *Pediatr. Res.* 31. <https://doi.org/10.1203/00006450-199204000-00022>.
142. Juanes, M.C., Arizmendi, C., and Medina, J.M. (1986). Attenuation of postnatal hypoxia in the premature newborn rat by maternal treatment with dexamethasone: Its relationship with lung phospholipid content. *Biol. Neonate* 50. <https://doi.org/10.1159/000242618>.
143. Palacin, M., Lasunción, M.A., and Herrera, E. (1987). Lactate production and absence of gluconeogenesis from placental transferred substrates in fetuses from fed and 48-H starved rats. *Pediatr. Res.* 22. <https://doi.org/10.1203/00006450-198707000-00002>.
144. Crane, S.C., and Morgan, B.L.G. (1983). Brain β -hydroxybutyrate utilization in neonatal hypothyroidism in rats. *Biol. Neonate* 43. <https://doi.org/10.1159/000241650>.
145. Gimeno-Bayón, J., López-López, A., Rodríguez, M.J., and Mahy, N. (2014). Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *J. Neurosci. Res.* 92. <https://doi.org/10.1002/jnr.23356>.
146. Alberini, C.M., Cruz, E., Descalzi, G., Bessières, B., and Gao, V. (2018). Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms, <https://doi.org/10.1002/glia.23250> <https://doi.org/10.1002/glia.23250>.

147. Schelp, A.O., and Burini, R.C. (1995). Control of supply and use of energy substrates in the encephalon. *Arq. Neuropsiquiatr.* 53. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x1995000400025>.
148. Dienel, G.A. (2012). Fueling and imaging brain activation, <https://doi.org/10.1042/AN20120021> .
149. Dringen, R., Gebhardt, R., and Hamprecht, B. (1993). Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* 623. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91429-V](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91429-V).
150. Solár, P., Zamani, A., Kubičková, L., Dubový, P., and Joukal, M. (2020). Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier in disease, <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00196-2> <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00196-2>.
151. Brooks, G.A., Curl, C.C., Leija, R.G., Osmond, A.D., Duong, J.J., and Arevalo, J.A. (2022). Tracing the lactate shuttle to the mitochondrial reticulum, <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00802-3>.
152. Snyder, J.M., Wood, T.R., Corry, K., Moralejo, D.H., Parikh, P., and Juul, S.E. (2018). Ontogeny of white matter, toll-like receptor expression, and motor skills in the neonatal ferret. *Int. J. Dev. Neurosci.* 70. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.05.006>.
153. Leino, R.L., Gerhart, D.Z., and Drewes, L.R. (1999). Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: A quantitative electron microscopic immunogold study. *Dev. Brain Res.* 113. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(98\)00188-6](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(98)00188-6).
154. Boggs, J.M. (2006). Myelin basic protein: A multifunctional protein, <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6094-7> .
155. Maurer, M.H., Canis, M., Kuschinsky, W., and Duelli, R. (2004). Correlation between local monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and glucose transporter 1 (GLUT1) densities in the adult rat brain. *Neurosci. Lett.* 355. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.056>.
156. Chalmers, N., Masouti, E., and Beckervordersandforth, R. (2024). Astrocytes in the adult dentate gyrus—balance between adult and developmental tasks, <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02386-4>

<https://doi.org/10.1038/s41380-023-02386-4>.

157. Fernández-González, I., and Galea, E. (2023). Astrocyte strategies in the energy-efficient brain, <https://doi.org/10.1042/EBC20220077> .
158. Brozzi, F., Arcuri, C., Giambanco, I., and Donato, R. (2009). S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase. *J. Biol. Chem.* 284. <https://doi.org/10.1074/jbc.m805897200>.
159. Luo, H., Wu, X.Q., Zhao, M., Wang, Q., Jiang, G.P., Cai, W.J., and Luo, M.Y. (2017). Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in central nervous system development of rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.027>.
160. Yang, Z., and Wang, K.K.W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003> .
161. Contreras-Baeza, Y., Sandoval, P.Y., Alarcón, R., Galaz, A., Cortés-Molina, F., Alegriá, K., Baeza-Lehnert, F., Arce-Molina, R., Guequén, A., Flores, C.A., et al. (2019). Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) is a high affinity transporter capable of exporting lactate in high-lactate microenvironments. *J. Biol. Chem.* 294. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009093>.
162. Gain, K.R., Malthus, R., and Watts, C. (1981). Glucose homeostasis during the perinatal period in normal rats and rats with a glycogen storage disorder. *J. Clin. Invest.* 67. <https://doi.org/10.1172/JCI110188>.
163. Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., and Noble-Haeusslein, L.J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001> .
164. Arteni, N.S., Salgueiro, J., Torres, I., Achaval, M., and Netto, C.A. (2003). Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res.* 973. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02436-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02436-3).
165. Brückner, G., and Biesold, D. (1981). Histochemistry of glycogen deposition in perinatal rat brain: importance of radial glial cells. *J.*

- Neurocytol. 10. <https://doi.org/10.1007/BF01262651>.
166. Rust, R.S. (1994). Energy metabolism of developing brain, <https://doi.org/10.1097/00019052-199404000-00013>.
167. Booth, R.F.G., Patel, T.B., and Clark, J.B. (1980). The Development of Enzymes of Energy Metabolism in the Brain of a Precocial (Guinea Pig) and Non-Precocial (Rat) Species. *J. Neurochem.* 34. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb04616.x>.
168. Escrivá, F., Rodriguez, C., and Pascual-Leone, A.M. (1985). Glycemia, Ketonemia, and Brain Enzymes of Ketone Body Utilization in Suckling and Adult Rats Undernourished from Intrauterine Life. *J. Neurochem.* 44. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb08770.x>.
169. Picut, C.A., Remick, A.K., de Rijk, E.P.C.T., Simons, M.L., Stump, D.G., and Parker, G.A. (2015). Postnatal Development of the Testis in the Rat. *Toxicol. Pathol.* 43. <https://doi.org/10.1177/0192623314547279>.
170. Angel, J.F., and Back, D.W. (1985). Weaning and metabolic regulation in the rat, <https://doi.org/10.1139/y85-093> <https://doi.org/10.1139/y85-093>.
171. Girard, J., Issad, T., Maury, J., Foufelle, F., Postic, C., Leturque, A., and Ferre, P. (1993). Influence of the weaning diet on the changes of glucose metabolism and of insulin sensitivity. *Proc. Nutr. Soc.* 52. <https://doi.org/10.1079/pns19930068>.
172. Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>.
173. Madeira, M.D., Sousa, N., and Paula-Barbosa, M.M. (1991). Sexual dimorphism in the mossy fiber synapses of the rat hippocampus. *Exp. Brain Res.* 87. <https://doi.org/10.1007/BF00227079>.
174. Vagnerova, K., Koerner, I.P., and Hurn, P.D. (2008). Gender and the injured brain, <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e31817326a5> <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e31817326a5>.
175. Weis, S.N., Souza, J.M.F., Hoppe, J.B., Firmino, M., Auer, M., Ataii, N.N., da Silva, L.A., Gaelzer, M.M., Klein, C.P., Mól, A.R., et al.

- (2021). In-depth quantitative proteomic characterization of organotypic hippocampal slice culture reveals sex-specific differences in biochemical pathways. *Sci. Rep.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82016-7>.
176. Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., Nowacki, P., Chlubek, D., and Baranowska-Bosiacka, I. (2015). Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism, <https://doi.org/10.3390/ijms161125939> <https://doi.org/10.3390/ijms161125939>.
177. Bittar, P.G., Charnay, Y., Pellerin, L., Bouras, C., and Magistretti, P.J. (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16. <https://doi.org/10.1097/00004647-199611000-00001>.
178. Durán-Carabali, L.E., Sanches, E.F., Marques, M.R., Aristimunha, D., Pagnussat, A., and Netto, C.A. (2017). Longer hypoxia–ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. *Neuroscience* 340, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.068>.
179. Garcia-Segura, L.M., Dueñas, M., Busiguina, S., Naftolin, F., and Chowen, J.A. (1995). Gonadal hormone regulation of neuronal-glia interactions in the developing neuroendocrine hypothalamus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 293–298. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00066-9](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00066-9).