

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

**UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES ENERGÉTICOS POR CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS: EFEITOS DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO**

ADRIANE HUTH KRÜGER

Porto Alegre, RS – Brasil

Fevereiro de 2003

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

**UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES ENERGÉTICOS POR CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS: EFEITOS DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO**

ADRIANE HUTH KRÜGER

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas com Área de Concentração em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry.

Porto Alegre

2003

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao Leandro, pelo apoio e estímulo que me ofereceram em todos os momentos da realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcos L.S. Perry, pela oportunidade, ensinamentos,
paciência e orientação.

Aos meus pais, pelo incentivo ao estudo.

Ao Leandro, pelo apoio, estímulo e compreensão.

À Miralba e ao Marcos, pelo apoio incondicional.

À Ingrid, pela acolhida no passado, amizade e apoio.

À Liane, Iara e Sandra, pelos ensinamentos e acolhida no grupo.

Às colegas Ana e Karine, pela amizade, coleguismo e cooperação.

Aos bolsistas do Laboratório 27: Fernando, Cíntia e Luciane,
pela colaboração.

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

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS,
pelos préstimos e colaboração.

Ao CNPq, pelo auxílio à pesquisa.

À UFRGS, pela valiosa oportunidade de qualificação profissional.

À UNIJUI, pelo apoio e confiança.

RESUMO

Glicose é o principal substrato energético no SNC de mamíferos adultos, contudo o cérebro também é capaz de utilizar outros substratos, incluindo manose, frutose, galactose, glicerol, corpos cetônicos e lactato. Glicose é quase totalmente oxidada a CO_2 e H_2O , mas ela também é precursora de neurotransmissores, tais como glutamato, GABA e glicina. O metabolismo energético do SNC varia ontogeneticamente, visto o fato de que nas primeiras 2 horas após o nascimento, lactato é o seu principal substrato, glicose e corpos cetônicos servem como substratos nos 21 dias subseqüentes e, após este período, somente glicose predomina. A utilização de nutrientes é regulada de várias maneiras, tais como o transporte através das células endoteliais capilares, transporte através da membrana plasmática, variações na atividade enzimática e variações nas concentrações de nutrientes plasmáticos. Está bem estabelecido que a atividade funcional do SNC aumenta o metabolismo energético. Tal evento pode ser dependente da atividade da bomba Na^+, K^+ -ATPase, a qual é requerida para restabelecer a homeostase iônica. O aumento da concentração de potássio extracelular de um nível basal 8-12 mM provoca excitação neuronal fisiológica. A concentração de potássio pode atingir 50-80 mM durante convulsões, isquemia ou hipoglicemia. O potássio liberado pela atividade elétrica é captado nos astrócitos através de processos dependentes e não dependentes de ATP. Neste estudo, observamos o efeito de diferentes concentrações de potássio extracelular (2.7, 20 e 50 mM), sobre a oxidação de glicose, frutose, manose e lactato a CO_2 e a conversão a lipídios em córtex cerebral de ratos jovens (10 dias) e adultos (60 dias). Considerando que a captação de deoxiglicose está relacionada com a atividade glicolítica, testamos a influência do potássio extracelular sobre este parâmetro. Os efeitos da ouabaína sobre a oxidação de glicose e captação de deoxiglicose foram testados para determinar se a influência de potássio extracelular era dependente da atividade da bomba Na^+, K^+ -ATPase. Os efeitos da monensina (ionóforo de Na^+) e bumetanide (inibidor do transportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$) foram também testados. O aumento da concentração de potássio extracelular aumentou a oxidação de glicose, frutose, e manose a CO_2 em córtex cerebral de ratos adultos, contudo, este fenômeno não foi observado em ratos jovens. A oxidação de lactato aumentou com o aumento da concentração de potássio extracelular em ambos ratos jovens e adultos. Não houve diferença na oxidação de glicose e sobre a captação de deoxiglicose na presença de ouabaína. Monensina aumentou a captação de deoxiglicose em 2 minutos de incubação. Contudo, esta captação diminuiu em períodos de incubação de 1 hora e 10 minutos. Além disso, não houve efeito do bumetanide sobre o aumento causado pela alta concentração de potássio extracelular na oxidação de glicose.

ABSTRACT

Glucose is the main energetic substrate in the CNS of adult mammalian, although the brain is also able to use other substrates such as mannose, fructose, galactose, glycerol, ketone bodies and lactate. Glucose is almost entirely oxidized into CO_2 and H_2O , but it is also the precursor of neurotransmitters such as glutamate, GABA and glycine. The energetic metabolism of CNS varies ontogenetically as seen by the fact that, in the first two hours after birth, lactate is its main substrate, glucose and ketone bodies perform that role for the subsequent twenty one days and, after that, only glucose prevails. There are several levels to regulate the use of nutrients, such as transport by capillary endothelial cells, transport by plasma membrane, variations in enzyme activity and variations in plasma concentrations of nutrients. It is well established that the functional activity of CNS increases the energetic metabolism. Such event may be dependent on the Na^+/K^+ ATPase pump activity, which is required to regain ionic homeostasis. The expansion of the concentration of extracellular potassium from the basal to 8 - 12 mM leads to physiologic neuronal excitement. The potassium concentration can reach 50-80 mM in situations such as seizures, ischemia and hypoglycemia. Potassium released by the electric activity is captured by astrocytes through ATP dependent and nondependent processes. In the present study, we observed the effect of different concentrations of extracellular potassium (2.7, 20 and 50 mM) on the glucose, fructose, mannose and lactate oxidation into CO_2 and the conversion into lipids in the cerebral cortex of young (10 days) and adult (60 days) rats. Considering that deoxyglucose uptake is correlated with the glycolytic activity, we tested the influence of de potassium extracellular on this parameter. The effects of ouabain on the glucose oxidation and deoxyglucose uptake were tested to determine whether the influence of extracellular potassium was dependent on the Na^+/K^+ ATPase pump activity. Effects of monensin (Na^+ ionophore) and bumetamide ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ transporter inhibitor) were also tested. The rise of the concentration of extracellular potassium intensifies the glucose, fructose and mannose oxidation into CO_2 in the brain cortex of adult rats, yet, such phenomenon is not verified in young rats. Lactate oxidation increased with the rise of extracellular potassium in both young and adult rats. There was no difference on the glucose oxidation neither on the deoxyglucose uptake on the presence of ouabain. Monensin augmented the deoxyglucose uptake in a 2-minute incubation. However, this captation decreased when incubation periods of 1 hour and 10 minutes. Furthermore, there was no effect of bumetamide on the rise of glucose oxidation caused by high extracellular concentration of potassium.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Metabolismo energético cerebral	13
1.2 Metabolismo oxidativo e não oxidativo da glicose no cérebro	15
1.3 Ontogenia do metabolismo energético cerebral	19
1.3.1 Importância da composição da dieta no metabolismo energético cerebral ...	20
1.3.2 Síntese de lipídios cerebrais a partir de corpos cetônicos e glicose	21
1.3.3 Mudanças ontogênicas na atividade de enzimas gliconeogênicas, lipolíticas e cetogênicas	22
1.3.4 Mudanças ontogênicas no transporte e utilização de ácidos monocarboxílicos e glicose	24
1.3.5 Comparação ontogênica de enzimas cetogênicas e glicolíticas em duas espécies de mamíferos	27
1.4 Efeito do potássio sobre o metabolismo energético cerebral	27
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Materiais	35
3.1.1 Animais experimentais	35
3.1.2 Reagentes	35
3.2 Métodos	36
3.2.1 Grupos experimentais	36
3.2.2 Composição do Tampão Dulbecco's Na ⁺ -Fosfato	36
3.2.3 Isolamento do córtex cerebral	37
3.2.4 Condições de incubação com precursor radioativo para determinação de CO ₂ e síntese de lipídios	37
3.2.5 Captação de CO ₂ e extração de lipídios	38
3.2.6 Condições de incubação para captação de 2-[U- ¹⁴ C]Deoxiglicose	39
3.3 Análise estatística	41
4 RESULTADOS	46
4.1 Efeito da concentração de K ⁺ extracelular sobre a oxidação de nutrientes energéticos a CO ₂ em córtex cerebral de ratos.....	46
4.2 Efeito da concentração de K ⁺ extracelular sobre a conversão de nutrientes energéticos a lipídios em córtex cerebral de ratos	51

4.3 Efeito da concentração de K^+ extracelular e da ouabaína sobre a captação de 2-[U- ^{14}C]Deoxiglicose em córtex cerebral de ratos adultos.....	56
4.4 Efeito da concentração de K^+ extracelular e da ouabaína sobre a oxidação de glicose a CO_2 em córtex cerebral de ratos adultos.....	57
4.5 Efeito da monensina sobre a captação de 2-[U- ^{14}C]Deoxiglicose em córtex cerebral de ratos adultos	58
4.6 Efeito do bumetanide e da concentração de K^+ extracelular sobre a oxidação de glicose a CO_2 em córtex cerebral de ratos adultos	58
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	72
7 REFERÊNCIAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribuição celular dos principais transportadores de glicose no sistema nervoso central	15
Figura 1.2	Metabolismo de glicose e glutamato em astrócitos	17
Figura 1.3	Interação metabólica entre neurônio, astrócito e capilar	19
Figura 1.4	Representação esquemática do mecanismo da glicólise induzida por glutamato em astrócitos durante ativação fisiológica	31
Figura 3.1	Metodologia empregada na incubação e avaliação da oxidação a CO ₂ e determinação de lipídios dos nutrientes energéticos estudados: glicose, frutose, manose e lactato	42
Figura 3.2	Metodologia empregada na determinação de lipídios a partir dos nutrientes energéticos estudados: glicose, frutose, manose e lactato	43
Figura 3.3	Metodologia empregada na captação de 2-[U- ¹⁴ C]Deoxiglicose + Ouabaína (1 hora de incubação) e Monensina (1 hora, 10 e 5 minutos de incubação).....	44
Figura 3.4	Metodologia empregada na captação de 2-[U- ¹⁴ C]Deoxiglicose + Monensina (2 minutos de incubação).....	45
Figura 4.1.1	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a oxidação de D-[U- ¹⁴ C]Glicose a CO ₂ em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal	47
Figura 4.1.2	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a oxidação de D-[U- ¹⁴ C]Frutose a CO ₂ em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal	48
Figura 4.1.3	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a oxidação de D-[U- ¹⁴ C]Manose a CO ₂ em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal	49
Figura 4.1.4	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a oxidação de L-[U- ¹⁴ C]Lactato a CO ₂ em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal	50
Figura 4.2.1	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a conversão de D-[U- ¹⁴ C]Glicose a lipídios em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal	52
Figura 4.2.2	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a	

	conversão de D-[U- ¹⁴ C]Frutose a lipídios em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal	53
Figura 4.2.3	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a conversão de D-[U- ¹⁴ C]Manose a lipídios em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal	54
Figura 4.2.4	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a conversão de L-[U- ¹⁴ C]Lactato a lipídios em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal	55
Figura 4.3.1	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular e da ouabaina sobre a captação de 2-[U- ¹⁴ C]Deoxiglicose em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal	56
Figura 4.4.1	Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular e da ouabaina sobre a oxidação de D-[U- ¹⁴ C]Glicose a CO ₂ em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal	57
Figura 4.6.1	Efeitos do bumetanide e da concentração de potássio extracelular sobre a oxidação de D-[U- ¹⁴ C]Glicose a CO ₂ em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal	59
Figura 5.1	Metabolismo de glutamato nos astrócitos	62
Figura 5.2	Esquema das duas principais vias do metabolismo energético, glicólise e fosforilação oxidativa, em dois compartimentos do tecido cerebral, neuronal e glial, durante ativação e não-ativação do metabolismo energético	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do Tampão Dulbecco's Na ⁺ -Fosfato	37
Tabela 2	Efeito da monensina sobre a captação de 2-[U- ¹⁴ C]Deoxiglicose em diferentes tempos de incubação, em córtex cerebral de ratos adultos	58

LISTA DAS ABREVIATURAS

α-KG	-	α -cetogluturato
μM	-	Micromolar
[ADP]	-	Concentração de Adenosina Difosfato
[ATP]	-	Concentração de Adenosina Trifosfato
[Ca²⁺]_i	-	Concentração de cálcio intracelular
[Cl]_i	-	Concentração de cloreto intracelular
[Cr]	-	Concentração de Creatina
[K⁺]_e	-	Concentração de potássio extracelular
[K⁺]_i	-	Concentração de potássio intracelular
[Na⁺]_i	-	Concentração de sódio intracelular
[PCr]	-	Concentração de Fosfocreatina
AAT	-	Aspartato aminotransferase
Acetil-CoA	-	Acetil Coenzima A
ADP	-	Adenosina Difosfato
ALA	-	Alanina
ALAT	-	Alanina aminotransferase
AMP	-	Adenosina Monofosfato
AMP_c	-	Adenosina Monofosfato cíclico
ASP	-	Aspartato
ATP	-	Adenosina Trifosfato
Cl	-	Cloreto
CO₂	-	Dióxido de Carbono
CPT I	-	Carnitina Palmitoil Transferase I
Cr	-	Creatina
EPM	-	Erro Padrão da Média
FADH₂	-	Flavina Adenina Dinucleotídeo reduzido
GABA	-	Ácido Gama Aminobutírico

GAPDH	-	Gliceraldeido-3-Fosfato Desidrogenase
GDH	-	Glutamato desidrogenase
Gln	-	Glutamina
Glu	-	Glutamato
GLUT	-	Transportador de glicose independente de sódio
GPT	-	Glutamato desidrogenase
GS	-	Glutamina sintetase
K⁺	-	Potássio
Kda	-	Quilo Dalton
Km	-	Constante de Michaelis-Menten
LT	-	Leucina transaminase
mM	-	Milimolar
Na⁺	-	Sódio
NAD⁺	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidado
NADH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido
NADP	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidado
NADPH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
NH₄⁺	-	Amônio
O₂	-	Oxigênio
Ouab	-	Ouabaína
OxA	-	Oxaloacetato
PCr	-	Fosfocreatina
PEPCK	-	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
PGK	-	Fosfoglicerato Kinase
PIR	-	Piruvato
pmol	-	picomol
POPOP	-	1,4-di[2-(5- feniloxazolil)] benzeno
PPO	-	2,5-difeniloxazol
SNC	-	Sistema Nervoso Central
TCA	-	Ácido tricloroacético
v:v	-	Diluição volume:volume
V_{máx}	-	Velocidade máxima

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo energético cerebral

Embora o cérebro humano represente apenas cerca de 2% do peso corporal, os processos que consomem energia e que garantem a própria função cerebral perfazem aproximadamente 25% do metabolismo basal, uma velocidade metabólica 3,5 vezes maior até mesmo do que em cérebros de outras espécies de primatas. Além disso, os neurônios têm uma dependência quase exclusiva de glicose como substrato energético, e as reservas de glicose ou glicogênio no cérebro são limitadas (LEE et al., 2000).

O metabolismo energético foi um dos primeiros aspectos estudados da Bioquímica do cérebro (McIlwain, 1953; 1956; Lowry & Passonneau, 1964). Durante as últimas décadas foram descritos mecanismos do metabolismo energético cerebral interligando neurônios e glia, porém explicações atribuídas a alguns mecanismos necessitam maiores esclarecimentos.

No adulto, o metabolismo cerebral é altamente dependente de um contínuo fornecimento de glicose. A glicose é substrato com menor demanda para processos anabólicos do cérebro, mas o uso primário deste nutriente é catabólico como um nutriente oxidável para propósito bioenergético (LAND, 1994).

Anteriormente ao trabalho de Owen et al. (1967), acreditava-se que glicose era obrigatoriamente o único substrato energético cerebral. Owen e colaboradores estudaram o metabolismo cerebral de três pacientes obesos submetidos a 5-6 semanas de jejum, através de cateterização de vasos sanguíneos cerebrais, e mostraram que β -hidroxibutirato e acetoacetato substituíram a glicose como nutriente predominante para o metabolismo cerebral, sendo que os corpos cetônicos são responsáveis por cerca de dois terços da energia utilizada durante o jejum prolongado.

Moore et al. (1976) estudaram o transporte e metabolismo da glicose em cérebro de ratos amamentados em diferentes idades e encontraram baixa velocidade de utilização de glicose em cérebro de ratos neonatos, indicando e sugerindo uso predominante de outras fontes energéticas que não fosse a glicose.

A partir de evidências como as supracitadas, pesquisadores mostraram que o SNC é capaz de utilizar outros substratos energéticos além de glicose (WADA et al., 1998), incluindo manose (DRINGEN et al., 1994), frutose (WADA et al., 1998), glicerol e glutamina (McKENNA et al., 1986), corpos cetônicos (WILLIAMSON, 1985; NEHLIG & VASCONCELOS, 1993) e lactato (TABERNERO, VICARIO & MEDINA, 1996; GRIFFIN et al., 1999).

Em experimentos com fatias de hipocampo de cobaias, das regiões giro-denteado e da área CA3, Wada et al. (1998) investigaram o efeito de diferentes concentrações de glicose e a substituição de glicose por manose, frutose e lactato sobre a atividade neural. Os resultados indicaram que glicose parece ser essencial na preservação da atividade sináptica, e que manose, frutose e lactato não preservam a atividade sináptica, embora os níveis de fosfatos de alta energia (ATP e CrP) são preservados por estes substratos energéticos.

Chain et al. (1969) mostraram que manose (5 mM) é oxidada a CO₂ em córtex cerebral de ratos quantitativamente equiparada à glicose. Frutose (5 mM) mostrou um perfil de oxidação equivalente a 58% de glicose.

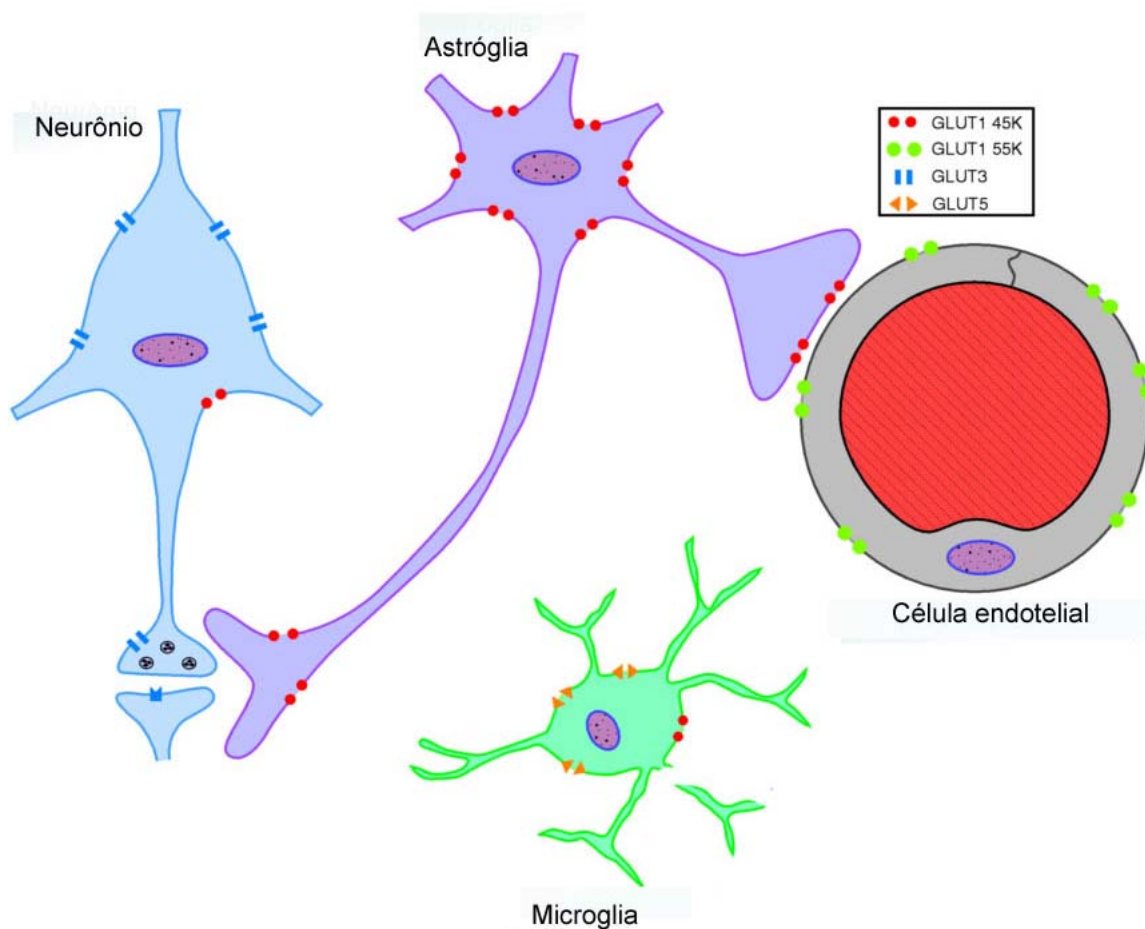
Weber et al. (2001), em estudo do metabolismo ontogênico de hexoses em córtex cerebral de ratos, mostraram que a oxidação a CO₂ de manose, frutose e glicose aumentou significativamente com a idade, enquanto que a oxidação de galactose diminuiu com o aumento da idade dos animais. Porém, a oxidação de galactose a CO₂ foi dez vezes menor do que as outras hexoses estudadas. Os autores também mostraram que Citocalasina B (inibidor do transporte de glicose sódio-independente) inibiu a oxidação a CO₂ de glicose, manose e galactose, além da síntese de lipídios a partir dessas hexoses, não afetando o metabolismo de frutose. Segundo Weber et al. (2001), isto indica que galactose e manose são transportadas pelos carreadores de glicose, ao contrário de frutose.

Rotta et al. (2002) estudaram a utilização ontogênica dos nutrientes energéticos glicina, glutamina, β-hidroxibutirato e glicerol, em fatias de cerebelo de ratos. A oxidação de glicerol e glutamina a CO₂ aumentou com a idade dos animais, e a glutamina foi o nutriente mais oxidado a CO₂ (15-30 vezes maior do que os outros nutrientes). A produção de CO₂ a partir de glicina diminuiu com a idade, e animais de 10 dias mostraram uma oxidação 7,5 vezes maior do que aquela em adultos. A síntese de lipídios a partir de β-hidroxibutirato e

glicerol foi maior em ratos adultos, não havendo diferença significativa na oxidação de β -hidroxibutirato a CO_2 nas idades de 10 dias e adultos.

1.2 Metabolismo oxidativo e não oxidativo da glicose no cérebro

Está bem estabelecido que a função normal do cérebro é criticamente dependente do fornecimento de glicose a partir do sistema circulatório (PENG, ZHANG & HERTZ, 1994). A capacidade da glicose em manter o metabolismo energético cerebral é devida, em parte, à combinação de uma concentração de glicose relativamente alta no plasma (~ 5.5 mM), e à presença de transportadores de glicose, os quais carregam glicose através da barreira hematoencefálica e das membranas das células cerebrais (Fig. 1.1), mantendo os níveis de glicose no cérebro de ratos em cerca de $2\text{-}3$ $\mu\text{mol/g}$ de massa (SIESJÖ, 1978; PFEUFFER, TKAC & GRUETTER, 2000).



Adaptado de ZIGMOND, et al. (1999)

Figura 1.1 – Distribuição celular dos principais transportadores de glicose no SNC.

O metabolismo da glicose no cérebro é similar ao metabolismo desta hexose em outros tecidos, e inclui três principais vias metabólicas: glicólise, ciclo de Krebs e via pentose fosfato (ZIGMOND et al., 1999).

Na via glicolítica, glicose é metabolizada a piruvato, havendo produção de apenas duas moléculas de ATP por molécula de glicose. Sob condição não oxidativa, piruvato é convertido a lactato, permitindo a regeneração de NAD^+ oxidado, o qual é essencial para manter um fluxo glicolítico contínuo (ZIGMOND et al., 1999).

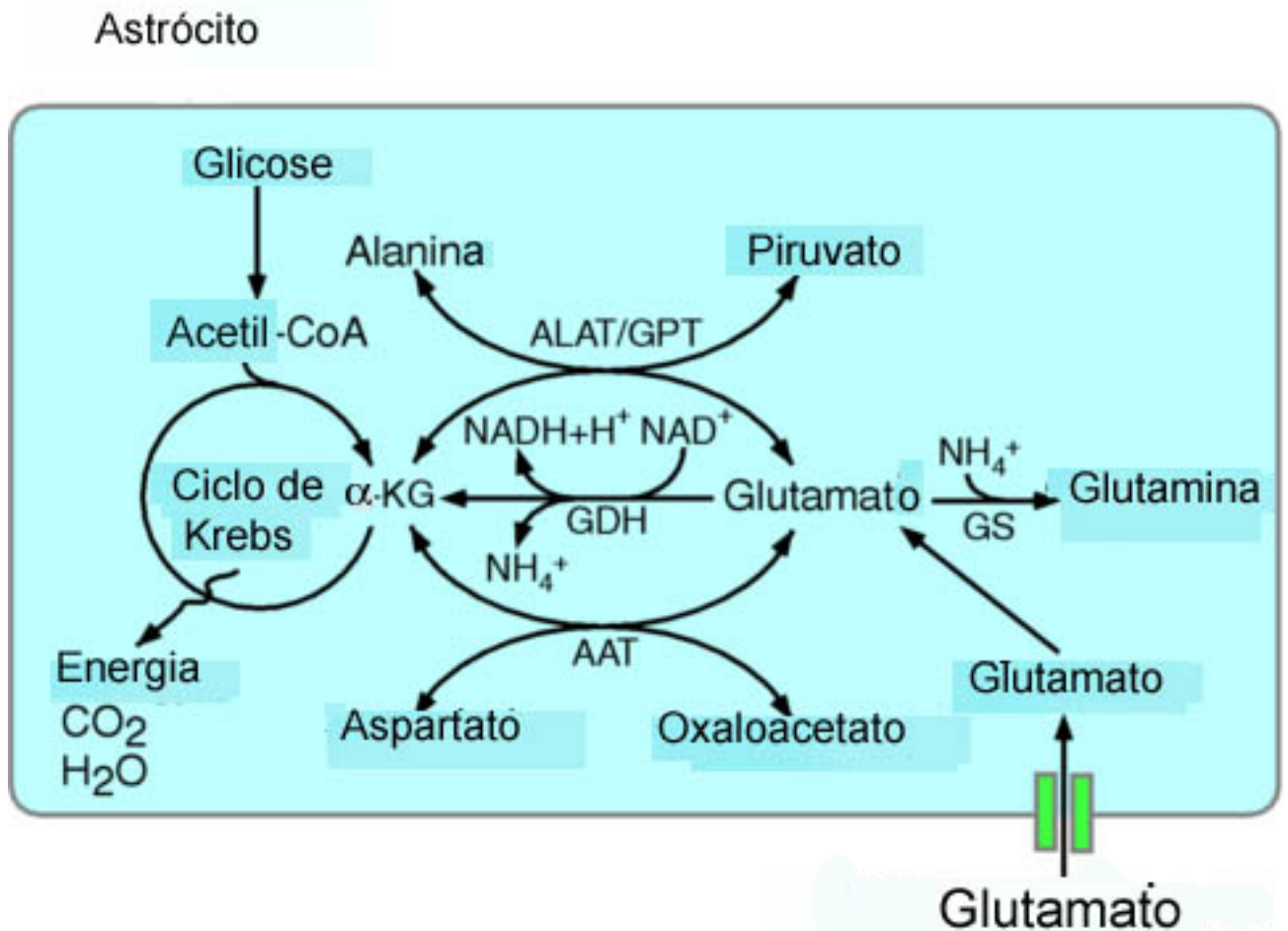
Segundo Izumi et al. (1994), a atividade sináptica pode ser mantida em fatias corticais cerebrais de rato, com lactato ou piruvato como substratos energéticos. Schurr, West & Rigor (1988) mostraram que lactato manteve a atividade sináptica de fatias de hipocampo de ratos, quando estas foram incubadas com ácido monoiodoacético (inibidor da enzima GAPDH). Em contraponto, Wada e colaboradores (1998) mostraram que lactato é um nutriente energético cerebral que não preserva a atividade sináptica, embora os níveis de ATP e CrP são preservados.

Durante o exercício, quando a concentração sanguínea de lactato aumenta várias vezes, o cérebro capta e metaboliza lactato exógeno (IDE et al., 2000). Contudo, preferencialmente o SNC utiliza o lactato produzido dentro do parênquima cerebral. Segundo Hawkins et al. (1973), sob condição de não estimulação, a concentração de lactato no cérebro é $\sim 1.0 \mu\text{mol/g}$ de massa, e a concentração de lactato extracelular é similar, ou ligeiramente menor (PFEUFFER, TKAC & GRUETTER, 2000). Ambos valores aumentam durante a ativação do cérebro, mas sob condições fisiológicas a concentração de lactato extracelular aumenta somente cerca de duas vezes (KORF, 1996).

Nas células do cérebro, como em outros tecidos, NADPH é importante como molécula redutora na biossíntese de lipídios. A utilização da glicose através da via pentose fosfato produz NADPH. A razão NADP/NADPH é um fator muito importante por regular a entrada de glicose-6-fosfato na via. Assim, se moléculas redutoras são necessárias para reações do processo de mielinização, por exemplo, os níveis de NADPH diminuem e a via pentose fosfato é ativada para gerar novos equivalentes reduzidos (ZIGMOND et al., 1999).

A captação eficiente de glutamato pelos astrócitos, a partir da fenda sináptica, e a ativação concomitante da via glicolítica, é de conhecimento já estabelecido. Uma vez dentro dos astrócitos, o aminoácido glutamato é metabolizado, pois ao contrário dos lipídios e carboidratos, glutamato não pode ser armazenado. Nos astrócitos, o grupo α -amino do glutamato pode ser transferido ao oxaloacetato produzindo α -cetoglutarato e aspartato, em

uma reação catalisada por aspartato amino transferase. O α -cetoglutarato gerado é um intermediário do ciclo de Krebs, onde é então oxidado. Outra reação de transaminação, catalisada por alanina amino transferase, transfere o grupo α -amino do glutamato para piruvato, resultando na formação de alanina e α -cetoglutarato (Fig. 1.2) (MARKS, MARKS & SMITH, 1996).



Adaptado de ZIGMOND, et al. (1999)

Figura 1.2 – Metabolismo de glicose e glutamato em astrócitos.

Duas outras vias existem nos astrócitos para metabolizar glutamato, como mostra a Fig. 1.2. Na primeira, glutamato pode ser convertido diretamente em α -cetoglutarato através de uma desaminação oxidativa que requer NAD⁺, catalisada por glutamato desidrogenase. Na segunda, a via metabólica quantitativamente predominante nos astrócitos, é a amidação de glutamato a glutamina. Esta reação é catalisada por glutamina sintetase, e provê um meio eficiente de metabolizar glutamato e amônia. Glutamina é então liberada por astrócitos e captada por neurônios, onde ela é hidrolisada de novo em glutamato pela enzima mitocondrial

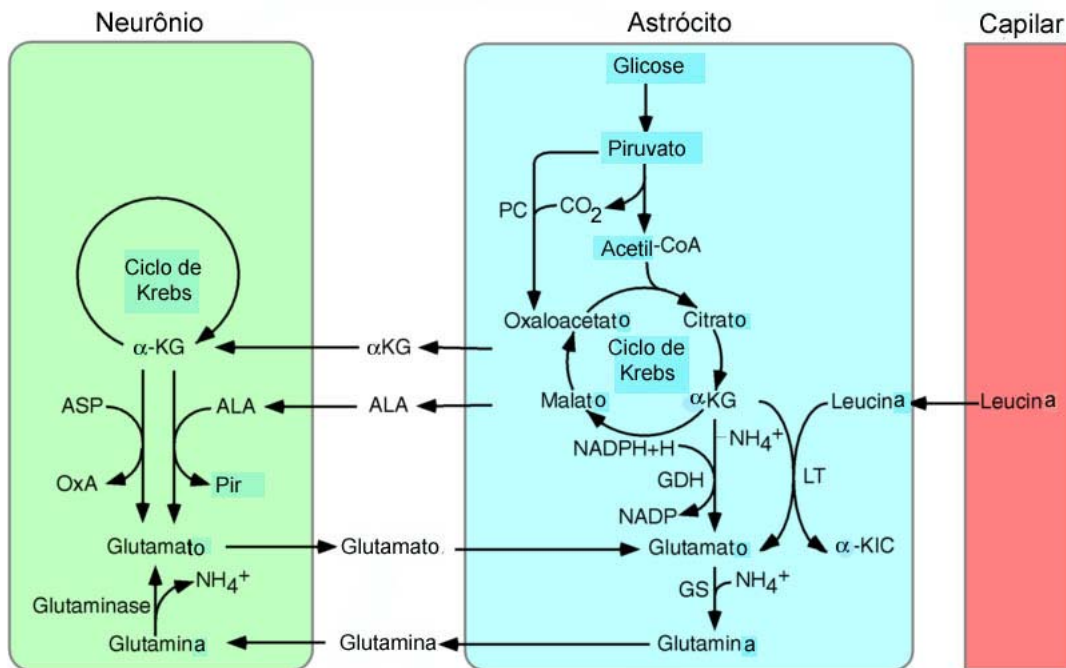
glutaminase. Esta via metabólica é descrita como ciclo glutamato-glutamina, e é um exemplo de interação metabólica entre astrócitos e neurônios (Fig. 1.3). Isto permite a remoção do excesso de glutamato da fenda sináptica, enquanto glutamina retorna ao neurônio para servir como precursor do pool de glutamato neuronal (ZIGMOND et al., 1999).

Contudo, nem todo glutamato é regenerado através do ciclo glutamato-glutamina, porque algum glutamato liberado pelos neurônios entra como α -cetogluturato no ciclo de Krebs em astrócitos (Fig. 1.3). Assim, a nova síntese é requerida para manter o pool de glutamato neuronal. Glutamato pode ser sintetizado através da aminação de α -cetogluturato catalisada por glutamato desidrogenase, dependente de NADPH. Para síntese de glutamato, a glicose fornece carbonos na forma de α -cetogluturato através do ciclo de Krebs, enquanto que a fonte de nitrogênio pode ser fornecida por leucina plasmática. Por esta reação ocorrer em astrócitos, para preenchimento do pool de glutamato neuronal, os astrócitos exportam glutamato como glutamina (ZIGMOND et al., 1999).

Os neurônios apresentam uma via metabólica para síntese de glutamato a partir de alanina e α -cetogluturato, liberados pelos astrócitos (Fig. 1.3). Ambos intermediários metabólicos são captados pelos neurônios e podem ser convertidos em glutamato e piruvato, em uma reação de transaminação catalisada pela alanina aminotransferase (MARKS, MARKS & SMITH, 1996).

Pode-se inferir que o intermediário metabólico α -cetogluturato é um ponto em comum para o metabolismo da glicose e glutamato. Qualquer mudança na atividade das enzimas que convertem α -cetogluturato em glutamato ou succinil-CoA, pode afetar a eficácia do ciclo de Krebs ou os níveis de glutamato (ZIGMOND et al., 1999).

Assim, glicose no sistema nervoso central é precursora, através do metabolismo oxidativo de: energia, CO_2 e H_2O . E do metabolismo não oxidativo é precursora de: lactato, oxaloacetato (através de reação anaplerótica catalisada pela piruvato carboxilase), glicogênio e alanina. É também constituinte essencial de macromoléculas, como: glicolipídios e glicoproteínas das células neurais, além de participar nas vias metabólicas de síntese de três neurotransmissores-chave: glutamato, GABA e acetilcolina.



Adaptado de ZIGMOND, et al. (1999)

Figura 1.3 – Interação metabólica entre neurônio, astrócito e capilar.

1.3 Ontogenia do metabolismo energético cerebral

Durante o período gestacional o feto recebe, através de nutrição placentária, um contínuo fornecimento de substratos energéticos para crescimento e metabolismo oxidativo. Neste período, a dieta recebida pelo feto é rica em carboidratos (principalmente glicose) e apresenta baixo conteúdo de lipídios. Imediatamente após o nascimento, o recém-nascido passa por um breve período de jejum, até receber o leite materno. No período pós-natal há uma mudança no perfil nutricional da dieta recebida pelo recém-nascido, sendo que esta passa a ser hiperlipídica e hipoglicídica (GIRARD et al., 1992).

Os substratos metabólicos fornecidos pela placenta ao feto incluem glicose e os aminoácidos presentes na circulação materna, além de lactato sintetizado na placenta através de glicólise não oxidativa (BATAGLIA & MESCHIA, 1978).

A hipoglicemia é particularmente comum nas primeiras horas após o nascimento e em bebês de baixo peso para a idade gestacional. As razões para isto são várias, incluindo baixa reserva de tecido adiposo, baixo conteúdo de glicogênio hepático, retardo na maturação de mecanismos enzimáticos requeridos para gliconeogênese, bem como o fornecimento prejudicado de metabólitos que poupam glicose, como os corpos cetônicos. Crianças hipoglicêmicas, com baixo peso para a idade gestacional, são hipocetonêmicas, tendo níveis relativamente baixos de ácidos graxos circulantes, e apresentam moderada acidemia láctica e, conseqüentemente, metabolismo energético cerebral comprometido (LAND, 1994).

1.3.1 Importância da composição da dieta no metabolismo energético cerebral

Ratos neonatos alimentados com leite materno têm a capacidade de utilizar como substratos energéticos cerebral corpos cetônicos (acetoacetato e β -hidroxibutirato), além de glicose. Esta capacidade é um exemplo de mecanismo adaptativo regulado, pois o leite materno contém alto teor de lipídios, resultando em uma razão lipídio/carboidrato muito maior do que a presente na dieta pós-desmame. Os lipídios perfazem, aproximadamente, 55% do total de calorias contidas no leite humano, em comparação a 30-35% de uma dieta balanceada no período pós-desmame (ZIGMOND et al., 1999). Os lipídios no leite de rata perfazem 60-70% do conteúdo calórico. Além do alto teor de lipídios (10-15g/100g de leite), o leite de rata é rico em proteínas (7-9g/100g) e possui baixo teor de carboidratos (2.4-3.5g/100g) (EDMOND et al., 1985). Sendo que este leite tem uma alta proporção (40%) do conteúdo de lipídios como ácidos graxos de cadeia média (C_8 - C_{12}), e depois da hidrólise, estes não são reesterificados para formar quilomicrons no intestino de ratos em lactação, mas chegam no fígado via sangue porta como ácidos graxos livres (WILLIAMSON, 1985).

A transição entre o período de lactação (0-21 dias) e o desmame é caracterizada por mudanças na nutrição do rato. A partir do final do período de lactação, a ingesta de leite é gradualmente substituída pela dieta com alimento sólido, cuja composição é menor em lipídios e maior em carboidratos em relação ao leite materno. Enquanto lactose é o carboidrato predominante no leite, a dieta do adulto contém uma mistura variável de oligossacarídeos (lactose, sacarose) e polissacarídeos (amido, celulose). Similarmente, a

composição de ácidos graxos da dieta é modificada. Enquanto o leite materno contém altas quantidades de ácidos graxos de cadeia média, a dieta do adulto contém quantidades mínimas. O conteúdo de carboidratos na dieta durante o aleitamento (< 10%) passa a cerca de 60% na dieta do adulto, enquanto o teor de lipídios diminui de 60-70% para cerca de 15% (GIRARD et al., 1992).

A composição da dieta de ratos em lactação e adultos se traduz nos níveis sanguíneos de alguns metabólitos. Glicose, lactato e aminoácidos no sangue de ratos amamentados e adultos estão em concentrações equivalentes. Ao contrário, concentrações de metabólitos que são derivados da digestão e metabolismo de lipídios estão elevadas no sangue de ratos amamentados: ácidos graxos livres, 0.9 mM; glicerol, 0.7 mM; acetoacetato, 0.45 mM; e β -hidroxibutirato, 1.5 mM, quando comparadas as suas concentrações no sangue de ratos adultos: 0.25, 0.25, <0.18, e <0.18 mM, respectivamente. Um perfil metabólico muito similar tem sido observado no sangue de humanos recém-nascidos (EDMOND et al., 1985).

1.3.2 Síntese de lipídios cerebrais a partir de corpos cetônicos e glicose

Além dos corpos cetônicos, outros produtos do metabolismo dos lipídios relevantes para os processos metabólicos do cérebro são os ácidos graxos livres. Enquanto os corpos cetônicos podem ser oxidados pelos neurônios, oligodendrócitos e astrócitos, a β -oxidação de ácidos graxos ocorre, exclusivamente, em astrócitos (ZIGMOND et al., 1999). Os corpos cetônicos em relação aos ácidos graxos não esterificados têm a vantagem de não serem tóxicos em uma faixa de concentração fisiológica (0.1-5.0 mmol/litro), e serem solúveis em água. Contudo, por tratar-se de ácidos carboxílicos, em altas concentrações podem afetar o balanço ácido-base (WILLIAMSON, 1985).

Outro ponto a ser considerado da dieta rica em lipídios no período de lactação é a sua contribuição para o processo de mielinização. Há evidências de que os lipídios cerebrais podem ser sintetizados a partir de corpos cetônicos (WILLIAMSON, 1985). No entanto, durante este período de desenvolvimento, o metabolismo cerebral mostra-se flexível, pois quando ratos neonatos são alimentados com uma dieta com baixo teor de lipídios, os átomos de carbono para lipogênese podem ser fornecidos pela glicose (ZIGMOND et al., 1999).

A mielinização do SNC do rato começa entre 10 e 15 dias de idade pós-natal (DAVISON & DOBBING, 1968), e alcança um pico de velocidade máxima aos 20 dias, após

o qual a mesma declina abruptamente aos níveis do adulto. Entre 15 e 30 dias de idade pós-natal, ocorre um aumento de seis vezes na deposição de mielina, enquanto o peso cerebral aumenta de 30-40%. Estima-se que aos 20 dias de idade, cada célula oligodendroglial produza uma quantidade de mielina superior a três vezes a sua própria massa celular (NORTON & PODUSLO, 1973).

Durante as primeiras duas semanas de vida pós-natal, acetoacetato e β -hidroxibutirato são preferidos em relação à glicose como substratos para síntese de fosfolipídios e esfingolipídios (YEH & SHEEHAN, 1985). Porém, a formação lipídica a partir de corpos cetônicos pode ser totalmente efetiva na presença de glicose a qual fornece NADPH, necessário para esta rota metabólica (SOKOLOFF, 1981). Os lipídios sintetizados a partir de glicose incluem: fosfolipídios, colesterol, glicerídeos e ácidos graxos livres. Este é um período caracterizado por crescimento e mielinização cerebral (YEH, STREULI & ZEE, 1977).

Em cérebro de ratos, no primeiro dia de vida pós-natal, 57% do total de glicose é oxidada para fins energéticos e 43% para síntese lipídica. Entre o sexto dia pós-natal e a idade adulta, 77-86% do total de glicose é oxidada para produzir energia e somente 14-23% para síntese lipídica. Isto traduz a baixa capacidade de síntese lipídica a partir de glicose durante todo desenvolvimento pós-natal. A síntese de lipídios mais ativa a partir desta hexose é encontrada no tronco cerebral (YEH, STREULI & ZEE, 1977).

1.3.3 Mudanças ontogênicas na atividade de enzimas gliconeogênicas, lipolíticas e cetogênicas

Em ratos, o período de lactação é caracterizado por alta concentração plasmática de glucagon e baixa concentração de insulina (GIRARD et al., 1973). Este perfil hormonal é diretamente ligado ao tipo de dieta consumida, sendo que o leite da rata contém baixo teor de lactose e, além disso, galactose é um baixo secretagogo de insulina. A ausência circadiana de ingesta de alimentos durante a lactação induz a uma contínua e baixa concentração de insulina no plasma (HENNING, CHANG & GISEL, 1979). Entre 20 e 30 dias de idade pós-natal, os níveis de insulina plasmática aumentam e de glucagon diminuem, período em que os ratos, espontaneamente, se alimentam com dieta rica em carboidratos. Se os ratos são alimentados com uma dieta rica em lipídios e com baixo teor de carboidratos, os níveis de glucagon do plasma não diminuem, e de insulina não aumentam (GIRARD et al., 1992).

Imediatamente após o nascimento o rato passa por um período de 2 a 3 horas de jejum. Durante este período, para suprir a necessidade de glicose de órgãos vitais (cérebro, medula renal e hemácias), o metabolismo do recém-nascido deve ativar vias para produção endógena de glicose (GIRARD et al., 1992).

No rato, os estoques de glicogênio hepático são rapidamente mobilizados e exauridos em doze horas após o nascimento. A glicogenólise hepática ocorre para manter a concentração de glicose sangüínea antes que outras fontes de energia estejam disponíveis a partir do leite. A importância da glicogenólise hepática na homeostase da glicose no período neonatal é devido ao fato de que a glicemia nesta situação metabólica permanece normal até a concentração do glicogênio hepático ser reduzida até cerca de 10 mg/g. Contudo, a partir da 12^a hora de vida a gliconeogênese deve ser ativada para manter normoglicemia (GIRARD et al., 1992), a partir de precursores gliconeogênicos que incluem: lactato, piruvato, glicerol, aminoácidos e galactose (GIRARD, 1986).

Segundo Girard et al. (1992), os fatores que desencadeiam a glicogenólise hepática no recém-nascido são o aumento concomitante de glucagon e catecolaminas no plasma, e a queda na concentração plasmática de insulina.

Deve-se levar em consideração que glicose-6-fosfato (derivada da glicogenólise) deve ser hidrolisada a glicose (pela enzima glicose-6-fosfatase) e liberada na corrente sangüínea. Glicose-6-fosfatase apresenta atividade significativa somente no fígado, rins e enterócitos. Assim, glicose-6-fosfatase tem papel muito importante na regulação da produção de glicose hepática em ambas as vias: glicogenólise e gliconeogênese (GIRARD et al., 1992). Dawkins (1961) mostrou que glicose-6-fosfatase tem atividade muito baixa em membranas microsomais de fígado fetal, e há aumento próximo aos níveis em adultos no final do período gestacional. Após o nascimento, há um rápido aumento na atividade da glicose-6-fosfatase a níveis consideravelmente maiores do que em fígado de adultos. Wells (1985) coloca que no período de 12-24 horas pós-natal, todas as enzimas gliconeogênicas estão desenvolvidas no fígado de ratos neonatos e suas atividades são similares àquelas relatadas em ratos adultos.

Segundo Girard et al. (1992), há alguns fatores fisiológicos envolvidos no estímulo à gliconeogênese: a) a indução da enzima citosólica PEPCK é desencadeada por um aumento de AMP_C secundário a um aumento de glucagon no plasma e queda de insulina, que ocorre após o nascimento em ratos; b) aumento da oxigenação do fígado e mudança no estado redox; c) maturação da capacidade oxidativa mitocondrial sob influência da oxigenação e/ou secreção de hormônios pancreáticos; d) controle hormonal do ciclo da frutose-6-fosfato/frutose 1,6-bifosfato.

A oxidação de ácidos graxos se desenvolve rapidamente depois do nascimento em muitos tecidos, incluindo o fígado, onde eles são usados como precursores para síntese de corpos cetônicos (GIRARD et al., 1992). A oxidação de ácidos graxos no fígado, entre outros propósitos, é necessária para manter alta a velocidade da gliconeogênese, característica do período de lactação (WELLS, 1985). Segundo Ferré et al. (1979), Pégrier et al. (1983) e Girard et al. (1992), a hipercetonemia no período de lactação devido ao alto teor de ácidos graxos de cadeia média no leite diminui a oxidação de piruvato e aumenta a liberação de lactato, piruvato e alanina no sangue. Assim, ácidos graxos de cadeia média ou longa estimulam a produção de glicose em ratos neonatos, ambos por aumentar o fornecimento de precursores gliconeogênicos para o fígado e por ativar diretamente a gliconeogênese hepática.

Ferré et al. (1979) mostraram que a oxidação de ácidos graxos estimula a gliconeogênese por fornecer acetil-CoA (ativador da piruvato carboxilase) e equivalentes reduzidos (NADH), necessários para deslocar o equilíbrio da reação catalisada por gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase em direção à gliconeogênese.

Segundo Williamson (1985), várias enzimas hepáticas envolvidas no catabolismo de ácidos graxos e formação de corpos cetônicos mostram maior atividade durante o período de lactação. O maior aumento na atividade da CPT I é evidenciado nos primeiros quatro dias de vida pós-natal. Neste período sua atividade é de três a quatro vezes maior do que no fígado de ratos adultos. Como em outras situações associadas à alta ingestão de lipídios na dieta, a sensibilidade de inibição da CPT I por malonil-CoA é diminuída em ratos neonatos.

A atividade da enzima citosólica acetoacetil-CoA sintetase é alta no cérebro de ratos neonatos, e diminui com o desenvolvimento, o que corrobora a idéia de que esta enzima tem papel fundamental no processo de mielinização (WILLIAMSON, 1985).

1.3.4 Mudanças ontogênicas no transporte e utilização de ácidos monocarboxílicos e glicose

Durante o primeiro período neonatal os mecanismos que regulam a utilização de corpos cetônicos são diferentes daqueles que regulam a utilização de glicose. Com base na grande heterogeneidade celular do cérebro, tem sido proposto que a oxidação de diferentes substratos pode ocorrer em compartimentos metabólicos separados (CREMER & HEATH, 1974). A velocidade de conversão de diferentes substratos em produtos específicos tem sugerido que organelas subcelulares e/ou tipos individuais de células servem como separação

física ou compartimentação das atividades metabólicas. Isto pode ser devido, em parte, a diferentes velocidades de transporte de vários substratos dentro destes compartimentos, localização e atividade enzimática, e /ou diferença no tamanho dos seus pools metabólicos (ROEDER, TILDON & STEVENSON, 1984).

Vários estudos têm investigado a importância do lactato como substrato energético cerebral. Vicario et al. (1991), em estudo com células cerebrais isoladas de ratos neonatos, evidenciaram que a velocidade de utilização de lactato foi 2,5 vezes maior em relação à observada para glicose, β -hidroxibutirato, ou glutamina, sugerindo que lactato é o principal substrato metabólico para o cérebro imediatamente após o nascimento. Cremer (1982) mostrou que a entrada de lactato no cérebro de ratos com idade entre quinze e dezoito dias é cerca de dez vezes maior em relação a ratos adultos. Segundo Vicário & Medina (1992), a concentração sanguínea de lactato atinge valores superiores a 10 mM em ratos recém-nascidos. Contudo, a maior parte do lactato acumulado é utilizada nas primeiras duas horas de vida extra-uterina do rato, atingindo concentração de 1 mM após duas horas de vida pós-natal (FULGSANG, LOMHOLT & GJEDDE, 1986). Isto sugere que lactato é um substrato energético indispensável para sustentação de tecidos neonatais no período que precede a amamentação.

Bueno, Azzolin & Perry (1994) mostraram que em fatias de cerebelo de ratos adultos, a oxidação de lactato (10mM) a CO_2 aumentou na ordem de duas vezes em comparação com fatias de cerebelo de ratos neonatos, e que a oxidação de lactato a CO_2 foi três vezes superior a de glicose no período neonatal.

Taberner, Vicario & Medina (1996) investigaram se o metabolismo de lactato pode afetar a utilização de glicose por neurônios de fetos de ratos (17.5 dias) e astrócitos (ratos neonatos, um dia pós-natal), através de diferentes vias metabólicas como via pentose-fosfato, oxidação catalisada por piruvato-desidrogenase, ciclo de Krebs e/ou lipogênese. Os resultados sugerem que na presença de lactato ambos neurônios e astrócitos podem utilizá-lo como principal substrato metabólico, poupando glicose para síntese de NADPH, ribose-5-fosfato e/ou lipídios.

A utilização de nutrientes energéticos pelo SNC pode ser regulada em diversos níveis: a) variação nos níveis plasmáticos de nutrientes (PARDRIDGE, 1983); b) transporte através das células endoteliais capilares (CREMER, 1982); c) transporte através da membrana plasmática (ROEDER, TILDON & STEVENSON, 1984); e d) variação na atividade enzimática (BOOTH, PATEL & CLARK, 1980).

Há evidências de que uma mudança na situação nutricional, como o jejum por exemplo, pode influenciar a capacidade de transporte do carreador monocarboxilato (CREMER et al., 1979), sendo encontrado aumento no transporte (K_m e V_{max}) de β -hidroxibutirato, acetoacetato (GJEDDE & CRONE, 1975) e de lactato (CREMER, BRAUM & OLDENDORF, 1976) em cérebros de ratos adultos submetidos a jejum de vários dias.

Clark et al. (1993) relataram que a atividade de transportador de ácido monocarboxílico aumenta durante o período de lactação cerca de sete vezes para β -hidroxibutirato, mas declina no período de transição entre a lactação e o desmame. A regulação da expressão do transportador parece estar relacionada a ambos os tempos de duração e concentração de corpos cetônicos circulantes, sugerindo que o período de hipercetonemia prolongado durante a lactação é o fator principal para o aumento na sua atividade.

Roeder, Tildon & Stevenson (1984), em estudo ontogênico com homogeneizado de cérebro de ratos, observaram que a adição ao meio de incubação de β -hidroxibutirato ou acetoacetato não marcados, diminuiu a velocidade de oxidação de D-[6- 14 C]glicose a CO_2 em animais jovens (5-6 dias). Em adultos, a tendência foi similar, mas a magnitude da mudança foi consideravelmente menor e não significativa.

Cremer, Braum & Oldendorf (1976) e Moore et al. (1976), mostraram que a capacidade de transporte de ácidos monocarboxílicos através da barreira hemato-encefálica é consideravelmente aumentada em ratos jovens no período de lactação. O transporte de glicose, ao contrário, parece ser menor em ratos jovens do que em adultos.

Cremer et al. (1979) estudaram as características cinéticas dos carreadores de ácidos monocarboxílicos em cérebro de ratos de diferentes idades (21 e 28 dias, adultos), através de injeção de substratos marcados radioativamente (piruvato, lactato e glicose) na artéria carótida. A partir disto, mostraram que enquanto o valor de V_{max} para carreador monocarboxilato diminuiu com a idade, o carreador para D-glicose é maior em adultos do que em ratos no período de lactação. Piruvato e lactato são transportados, através da barreira hemato-encefálica, por difusão facilitada através do carreador monocarboxilato. A direção do fluxo é determinada, principalmente, pela concentração respectiva no fluido cerebral extracelular e plasma. Há evidências que indicam a importância da captação de lactato e piruvato do sangue para o cérebro, fornecendo substratos oxidáveis quando a concentração sanguínea de ambos, glicose e corpos cetônicos, são baixos (CREMER et al., 1979). Levitsky

et al. (1977) mostraram que o cérebro de ratos neonatos capta lactato do sangue durante anoxia, sugerindo que lactato é oxidado pelo cérebro poupando glicose.

1.3.5 Comparação ontogênica de enzimas cetogênicas e glicolíticas em duas espécies de mamíferos

Em cobaias, as atividades das enzimas cerebrais que metabolizam corpos cetônicos (β -hidroxibutirato desidrogenase, 3-cetoácidoCoA-transferase, acetoacetyl-CoA-tiolase) permanecem relativamente baixas durante os períodos fetal e neonatal, somente havendo um pequeno aumento no nascimento. Ao contrário do cérebro de ratos, onde há um aumento na atividade de três a quatro vezes ocorrendo durante o período de lactação, seguido por uma diminuição correspondente no adulto (BOOTH, PATEL & CLARK, 1980).

As atividades da hexoquinase (citosólica e mitocondrial), piruvato desidrogenase, lactato desidrogenase e citrato sintase de cérebro de cobaias, mostraram aumento nos últimos 10-15 dias antes do nascimento, de tal maneira que ao nascimento, a cobaia possui as atividades dessas enzimas similares a cobaias em idade adulta. Isto está em contraponto com o perfil metabólico encontrado em cérebro de ratos, onde estas enzimas aumentam suas atividades durante 10-15 dias pós o nascimento, isto é, no período de lactação (BOOTH, PATEL & CLARK, 1980). Estes resultados podem ser explicados em parte pelo teor de lipídios do leite de ambas as espécies de mamíferos, sendo que o leite de rata possui cerca de 12,3%, e o de cobaia apenas 5,5% de lipídios. Além disso, o fígado de rato durante a lactação tem alta atividade cetogênica, levando o rato neonato a um estado hipercetogênico, e isto se pode traduzir como uma situação de adaptação (BOOTH, PATEL & CLARK, 1980).

O aumento das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo de glicose mostra correlação direta com o completo desenvolvimento neurológico de cobaias, denominada como uma espécie precocial, e o incompleto desenvolvimento neurológico de ratos, denominada como uma espécie não-precocial (BOOTH, PATEL & CLARK, 1980).

1.4 Efeito do potássio sobre o metabolismo energético cerebral

A concentração de K^+ extracelular no cérebro in vivo não estimulado é normalmente em torno de 3 mM. Este valor pode aumentar durante ativação neuronal para 12 mM com

excitação neuronal fisiológica, e pode atingir 50-80 mM durante convulsão, isquemia, hipoglicemia ou depressão cortical alastrante (SOKOLOFF et al., 1996).

Sokoloff et al. (1996) estudaram o metabolismo da glicose, através do método de captação de [^{14}C]Deoxiglicose, em culturas neuronal e mista (neuronal-astroglial) a partir do estriado de ratos neonatos. As diferentes culturas foram submetidas a meios de incubação com diferentes concentrações de potássio extracelular: 5.4, 28, 56 mM. A partir deste estudo, os autores verificaram que elevando a concentração de K^+ no meio de incubação (28 e 56 mM), aumentou a velocidade do metabolismo de glicose em culturas neuronal e mista, mas não estimulou o metabolismo em culturas de astrócitos. Sokoloff et al. (1996) também testaram os efeitos de veratridina (75 μM) e monensina (10 μM) sobre a velocidade de captação de [^{14}C]Deoxiglicose em astrócitos, e o efeito de ouabaína (1 mM) sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Os autores verificaram que veratridina e monensina estimularam a fosforilação de [^{14}C]Deoxiglicose em 20 e 171%, respectivamente (em relação ao controle). Ouabaína diminuiu a velocidade basal de fosforilação de [^{14}C]Deoxiglicose em aproximadamente 20%, isto é, eliminou completamente a estimulação da veratridina, mas somente parcialmente da monensina.

Peng, Zhang & Hertz (1994), em estudo semelhante ao de Sokoloff et al. (1996), mostraram o efeito de altas concentrações de potássio extracelular sobre o metabolismo oxidativo e glicolítico em culturas de astrócitos e neurônios corticais e cerebelares. A partir disso, evidenciaram que a elevação da concentração de potássio extracelular aumentou a velocidade de acúmulo de deoxiglicose, mas não da atividade do ciclo de Krebs em astrócitos. Em neurônios cerebelares, a velocidade de acúmulo de deoxiglicose foi de 1.3 nmol/mg proteína/min. sob condição não estimulada, isto é, $[\text{K}^+]_e$ de 5 mM, e este valor aumentou 75% quando $[\text{K}^+]_e$ atingiu 50 mM. O aumento na produção de CO_2 a partir de lactato e piruvato durante a exposição $[\text{K}^+]_e$ de 50 mM indica uma estimulação induzida por potássio específica do metabolismo oxidativo, o qual pode ser a razão para o aumento de acúmulo de deoxiglicose, mas isto não exclui que possa ser um efeito estimulatório direto sobre a glicólise.

O trabalho de Peng, Jurlink & Hertz (1996) discorda em parte dos achados de Sokoloff et al. (1996), mostrando que o aumento na $[\text{K}^+]_e$ não teve efeito sobre o acúmulo de 2-Deoxiglicose em astrócitos de camundongos em cultura de 1-2 semanas. Porém, em astrócitos em cultura por, no mínimo, quatro semanas, a elevação na $[\text{K}^+]_e$ provocou aumento significativo na captação e fosforilação de 2-Deoxiglicose. Samson & Quinn (1967) verificaram que a idade em que a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase in vivo está totalmente

desenvolvida, coincide com a idade em que o estímulo da glicólise induzido por potássio em culturas de astrócitos de quatro semanas se manifestam. Já em culturas de astrócitos de ratos, Peng, Jurlink & Hertz (1996) repetiram os resultados relatados por Sokoloff et al. (1996).

Segundo Sokoloff et al. (1996), a excitação neuronal gera potenciais de ação produzidos por despolarização. Ocorre, então, rápido influxo de Na^+ e efluxo de K^+ celular. O aumento na $[\text{Na}^+]_i$ e $[\text{K}^+]_e$ pode então levar à ativação neuronal da enzima Na^+, K^+ -ATPase, a qual estimula o metabolismo energético necessário para restaurar a homeostase iônica. Membranas astrogliais podem ser despolarizadas por aumento na $[\text{K}^+]_e$, mas a despolarização não produz potenciais de ação, e assim não há aumento na $[\text{Na}^+]_i$. Os canais de Na^+ voltagem-dependentes dos astrócitos não são sensíveis a elevadas $[\text{K}^+]_e$, pois não há estímulo do metabolismo energético em culturas de astrócitos expostas a elevadas $[\text{K}^+]_e$. Uma explicação plausível é que os canais de Na^+ voltagem-dependentes de astrócitos podem ter uma baixa densidade ou propriedades diferentes dos neurônios.

Contudo, o estímulo do metabolismo energético de astrócitos por despolarização depende de um aumento associado na $[\text{Na}^+]_i$, preferencialmente, do que aumento na $[\text{K}^+]_e$ (TAKAHASHI et al., 1995). A captação de glutamato por astrócitos, aumento na $[\text{Na}^+]_i$ e $[\text{K}^+]_e$ provocam estímulo suficiente para aumentar a velocidade de utilização de glicose em astrócitos, especialmente quando veratridina (provoca a abertura dos canais de Na^+ voltagem-dependentes) e monensina (ionoforo Na^+) são utilizadas (SOKOLOFF et al., 1996).

Sokoloff (1994), em experimentos com fatias neurohipofisárias de ratos, verificou que a estimulação elétrica resultou no aumento da captação e fosforilação de ^{14}C Deoxiglicose, e esta estimulação metabólica é bloqueada por ouabaína, um inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase.

Brines & Robbins (1993) mostraram que ouabaína se liga menos a astrócitos em cultura, enquanto que há ligação de quantidades significativamente maiores do inibidor da Na^+, K^+ -ATPase á culturas mistas (neurônios e astrócitos). A adição de ouabaína inibe a enzima Na^+, K^+ -ATPase, o que acarreta influxo de sódio e cálcio e efluxo de potássio celular. Simultaneamente há diminuição da velocidade de consumo de oxigênio e glicólise (SILVER & ERECINSKA, 1997).

A existência de isoformas da Na^+, K^+ -ATPase tem sido bem caracterizada. A enzima funcional é um heterodímero composto de duas subunidades catalíticas (α) e duas subunidades de glicoproteínas reguladoras (β). Há quatro isoformas da subunidade α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$) e quatro isoformas da subunidade β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$). Todas as subunidades são

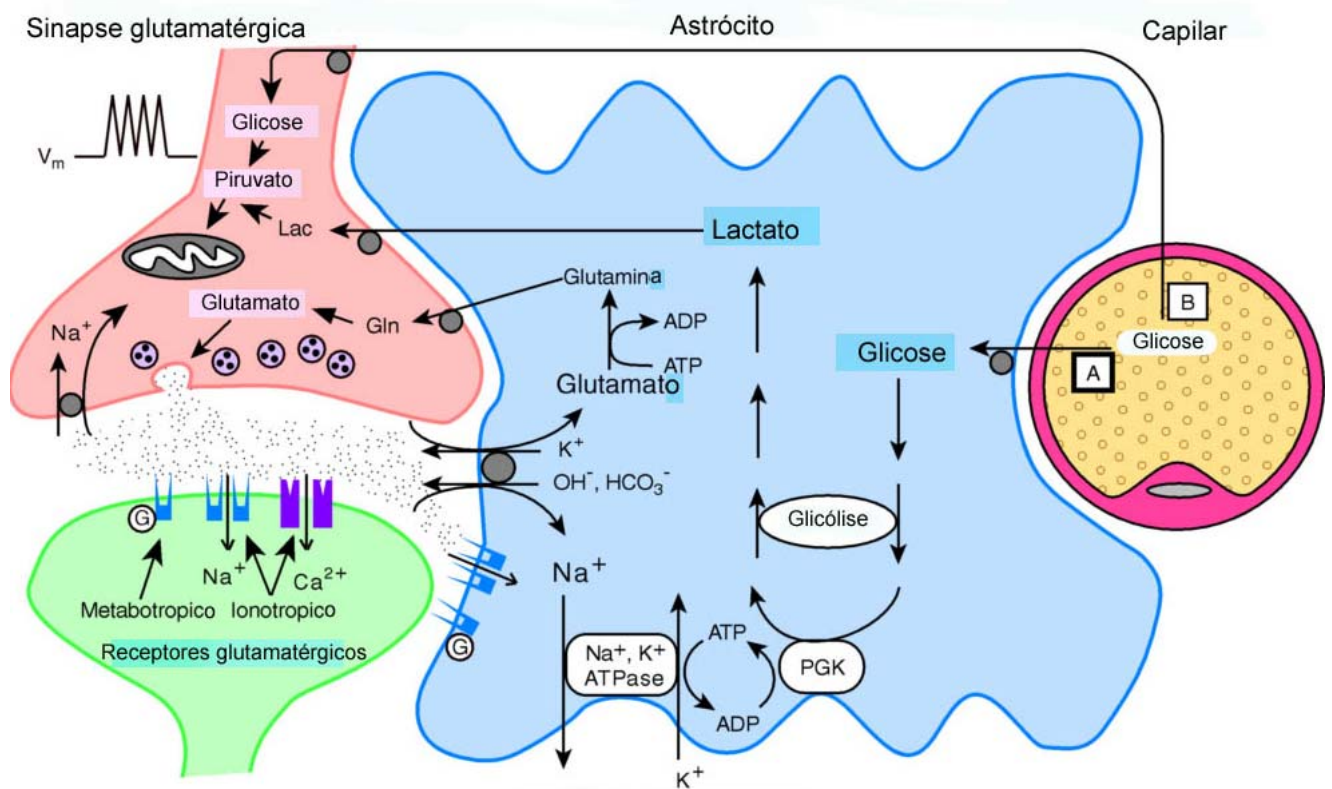
produtos de diferentes genes, apesar de as subunidades α mostrarem considerável similaridade de aminoácidos e nucleotídeos. No rato, a isoforma $\alpha 1$ é resistente à inibição por ouabaína (FINK, KNAPP & MATA, 1996; KNAPP, ITKIS & MATA, 2000).

Eriksson et al. (1995) relatam que há uma diminuição em 20% na respiração após a adição de 1mM de ouabaína, e uma redução percentual similar na glicólise em culturas de astrócitos corticais de ratos.

Está bem estabelecido que potenciais de ação refletem o influxo de Na^+ e o efluxo de K^+ em neurônios, e o metabolismo energético aumenta em proporção direta a sua frequência, o que resulta em aumento na concentração de Na^+ intracelular e K^+ extracelular, assim a atividade da bomba Na^+, K^+ -ATPase e do metabolismo energético aumentam para restaurar os gradientes iônicos aos níveis normais. Pode-se inferir que a restauração dos gradientes iônicos ocorre nos neurônios (onde os potenciais de ação são gerados), porém, os astrócitos envolvidos nas sinapses locais também podem estar envolvidos na resposta metabólica, regulando a $[\text{K}^+]_e$ por difusão passiva e/ou transporte ativo (SOKOLOFF et al. 1996).

Astrócitos em cultura captam K^+ avidamente do meio, e a velocidade de captação é maior do que aquela para neurônios. Os astrócitos também podem captar K^+ de áreas com estimulação neuronal para áreas com menor concentração de K^+ extracelular (tamponamento espacial de K^+). Os resultados de Sokoloff e colaboradores (1996), indicam que elementos neuronais podem responder com elevada utilização de glicose a mudanças no meio iônico extracelular, a ser esperado a partir de atividade aumentada, isto é, aumento na $[\text{K}^+]_e$. Se o mesmo aumento na $[\text{K}^+]_e$ estimula o metabolismo energético em astrócitos é ainda incerto, mas a entrada de Na^+ aumentada em astrócitos certamente o é. Um dos mecanismos que promove entrada Na^+ nos astrócitos está bem estabelecido na literatura (PELLERIN & MAGISTRETTI, 1994; SOKOLOFF et al., 1996; ZIGMOND et al., 1999): o aumento na $[\text{K}^+]_e$ leva à liberação de neurotransmissores, incluindo glutamato, que é o neurotransmissor liberado na maioria das sinapses excitatórias, e o neurotransmissor mais distribuído no SNC. Glutamato afeta a atividade neuronal por interagir com receptores específicos ionotrópicos e metabotrópicos. As ações pós-sinápticas do glutamato são rapidamente terminadas por um ávido sistema de recaptação localizado em ambos neurônios e astrócitos que circundam a fenda sináptica. Em astrócitos, o principal transporte de glutamato é um processo eletrogênico, pelo qual um glutamato é cotransportado com três íons Na^+ (ou dois Na^+ e um H^+) em troca de um K^+ e uma OH^- (ou um HCO_3^-). A consequência desta estequiometria é um aumento na concentração de Na^+ intracelular, acompanhada por uma acidificação intracelular e alcalinização extracelular. A captação de glutamato é essencial não somente para terminar

seu efeito como neurotransmissor, mas também para prevenir que os níveis de glutamato extracelular atinjam níveis citotóxicos. O aumento de Na^+ intracelular ativa a enzima Na^+, K^+ -ATPase em astrócitos. A ativação da Na^+, K^+ -ATPase aumenta a relação intracelular $[\text{ADP}]/[\text{ATP}]$. Assim, o aumento na $[\text{ADP}]$ estimula a glicólise. Esta estimulação do metabolismo é eliminada quando Na^+ , no meio extracelular, é substituído por colina. Este resultado é relatado por Sokoloff et al. (1996) e Pellerin & Magistretti (1994). Parece, então, que os astrócitos participam no metabolismo energético aumentado associados com atividade funcional, mas, ao contrário dos neurônios, a estimulação por aumento na $[\text{K}^+]_e$ é de menor relevância do que outros mecanismos, tais como liberação neuronal de glutamato e possivelmente outros neurotransmissores que promovem a entrada de Na^+ nas células. Este mecanismo é representado na Fig. 1.4.



Adaptado de ZIGMOND, et al. (1999)

Figura 1.4 – Representação esquemática do mecanismo da glicólise induzida por glutamato em astrócitos durante ativação fisiológica.

Pellerin & Magistretti (1994) verificaram que a captação de glutamato por astrócitos resulta na utilização de glicose e na produção de lactato. Neste estudo, o efeito do glutamato sobre a liberação de lactato foi bloqueado quando o inibidor do transportador de glicose Citocalasina B foi utilizado, indicando que glutamato promove captação de glicose e seu metabolismo a lactato. Até mesmo na presença de glicose a utilização de lactato pelo SNC tem sido demonstrada *in vitro* (TABERNERO, VICARIO & MEDINA, 1996). Enquanto o lactato do plasma não pode substituir glicose como um substrato metabólico para o cérebro por causa de seu limitado transporte através da barreira hemato-encefálica, lactato formado dentro do parênquima cerebral pode sustentar, no mínimo em parte, as necessidades energéticas dos neurônios durante ativação (ZIGMOND et al., 1999).

McDougal Jr. et al. (1997) evidenciaram que a estimulação de fatias de hipocampo de ratos por glutamato resultou em um aumento na velocidade de fosforilação de 2-Deoxiglicose, decréscimo nos níveis de fosfocreatina e ATP, além de aumento no nível de lactato, refletindo atividade neural. Quando a incubação foi feita com níveis elevados de K^+ , também houve diminuição dos níveis de PCr e ATP, aumento na velocidade de fosforilação de 2-Deoxiglicose, além de aumento de citrato e α -cetogluturato.

Grisar & Franck (1981) mostraram em estudo ontogênico com fatias de córtex cerebral de ratos, que o aumento da $[K^+]_e$ de 3 para 20 mM provocou um aumento na $[K^+]_i$ e diminuiu $[Na^+]_i$ e $[Cl^-]_i$. Este fenômeno ocorreu somente em ratos com idade acima de 30 dias. Concentrações acima de 20 mM de K^+ provocaram uma intensa captação de água junto a um aumento da $[Na^+]_i$ e $[Cl^-]_i$, em ratos adultos e jovens. Isto indica que diferentes concentrações de K^+ extracelular induzem a diferentes fenômenos: até 20 mM de K^+ extracelular há ativação da enzima Na^+, K^+ -ATPase. Este processo parece ser idade-dependente (acima de 30 dias). Em concentrações acima de 20 mM de K^+ , um fenômeno adicional ocorre, isto é, a captação de água Cl^- -dependente, provavelmente mediada pela anidrase carbônica glial e HCO_3^- -ATPase. Este processo não é idade-dependente, ocorrendo em ambos, ratos jovens e adultos.

Outro mecanismo que promove entrada de Na^+ nos astrócitos foi descrito em 1980 por Geck et al. No modelo proposto por estes autores ocorre um triplo cotransporte de Na^+ , K^+ e Cl^- em proporções 1:1:2, respectivamente. Este cotransporte ocorre em muitos tecidos, e tem papel fundamental na absorção epitelial, secreção, regulação no volume celular, e acúmulo de Cl^- intracelular. Segundo Walz (1991), uma análise da atividade do cotransportador $Na^+/K^+/Cl^-$ sobre concentrações extracelulares destes íons, traz os seguintes valores de K_m : $Na^+ = 35$ mM, $K^+ = 2.7$ mM e $Cl^- = 40$ mM. Destaca-se o valor de K_m para K^+ , que é quase idêntico ao valor de concentração deste íon no fluido cérebro espinhal (3 mM). Assim,

pequenos aumentos na $[K^+]_e$ podem ter um efeito estimulatório máximo nos astrócitos. Isto foi comprovado pelos estudos de Walz & Hinks (1985, 1986) e Walz & Mukerji (1988). Estes autores realizaram estudos mudando a $[K^+]_e$ em astrócitos de camundongos. As células foram expostas a uma mudança na $[K^+]_e$ de 3-12 mM. Ocorreu aumento nos astrócitos do conteúdo de K^+ (63%), e de água (27%) em 50 segundos.

Walz (1991) descreve o ciclo de Na^+ transmembrana em astrócitos, através do funcionamento acoplado do carreador $Na^+/K^+/Cl^-$ e da enzima $Na^+,K^+-ATPase$. Neste modelo, um acoplamento de ambos carreadores via concentração de Na^+ intracelular leva ao estabelecimento de um ciclo de Na^+ através da membrana. O ciclo envolve uma $Na^+,K^+-ATPase$ que é estimulada por ambos: elevado K^+ extracelular e elevado Na^+ intracelular. Como resultado, Na^+ é carreado para dentro da célula pelo carreador $Na^+/K^+/Cl^-$, e o efluxo é por transporte ativo através da ação da $Na^+,K^+-ATPase$.

Segundo Amédée, Robert & Coles (1997), o potássio liberado no meio extracelular pela atividade elétrica de neurônios, é captado pelos astrócitos. Há três principais processos de captação de K^+ nas células gliais que não requerem energia. Estes são: difusão através das fendas extracelulares, tamponamento espacial por células gliais, e captação de K^+ nas células gliais através de canais de K^+ , associados com captação de Cl^- . Além disso, algumas células gliais captam K^+ pelo carreador $Na^+/K^+/Cl^-$, o qual indiretamente consome energia quando Na^+ é bombeado para fora da célula.

No cérebro de mamíferos há uma divisão do metabolismo energético entre células gliais e neurônios. As células gliais podem funcionar com uma quantidade relativamente pequena de ATP produzido pela glicólise, enquanto que neurônios encontram seu maior requerimento energético através da fosforilação oxidativa (Fig.1.4) (AMÉDÉE, ROBERT & COLES, 1997).

2 OBJETIVOS

Neste trabalho utilizamos os nutrientes energéticos glicose, frutose, manose e lactato, visando atingir os seguintes objetivos:

- estudar o efeito da concentração de potássio extracelular (2.7, 20 e 50 mM) sobre a oxidação isolada dos nutrientes energéticos supracitados, a CO_2 e sua conversão a lipídios, nas idades de 10 e 60 dias pós-natal, em fatias de córtex cerebral de ratos;
- estudar o efeito da monensina e da concentração de potássio sobre a captação de 2-Deoxiglicose, em fatias de córtex cerebral de ratos adultos;
- estudar o efeito da concentração de potássio e da ouabaína sobre a captação de 2-Deoxiglicose e oxidação de glicose a CO_2 , em fatias de córtex cerebral de ratos adultos;
- estudar a participação da bomba Na^+, K^+ -ATPase sobre o efeito de altas concentrações de potássio extracelular no metabolismo energético cerebral;
- estudar a participação do transportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ sobre o efeito de altas concentrações de potássio extracelular no metabolismo energético cerebral;
- estudar o efeito da concentração de potássio e do bumetanide sobre a oxidação de glicose a CO_2 , em fatias de córtex cerebral de ratos adultos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Os ratos foram alimentados com ração comercial (NUVILAB CR1 – Pr) e água *ad libitum*, mantidos em ambiente climatizado (21-23° C), passando por ciclos consecutivos de 12 horas claro/12 horas escuro.

3.1.2 Reagentes

- D-[U-¹⁴C]Glicose. Atividade específica: 297 µCi/mmol (Amersham Life Science Berkshire, Inglaterra).
- D-[U-¹⁴C]Frutose. Atividade específica: 321 µCi/mmol (Amersham Life Science Berkshire, Inglaterra).
- D-[U-¹⁴C]Manose. Atividade específica: 304 µCi/mmol (Amersham Life Science Berkshire, Inglaterra).

- L-[U-¹⁴C]Lactato. Atividade específica: 152 µCi/mmol (Amersham Life Science Berkinghamshire, Inglaterra).
- 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose. Atividade específica: 250 µCi/mmol (Amersham Life Science Berkinghamshire, Inglaterra).
- D-Glicose (Sigma Chemical Company-St. Louis, Mo, E.U.A.).
- D-Manose (Sigma Chemical Company-St. Louis, Mo, E.U.A.).
- D-Frutose (Sigma Chemical Company-St. Louis, Mo, E.U.A.).
- L-Lactato (Sigma Chemical Company-St. Louis, Mo, E.U.A.).
- Monensina (Sigma Chemical Company-St. Louis, Mo, E.U.A.).
- Ouabaína (Sigma Chemical Company-St. Louis, Mo, E.U.A.).
- Bumetanide (Sigma Chemical Company-St. Louis, Mo, E.U.A.).
- POPOP e PPO (Sigma Chemical Company-St. Louis, Mo, E.U.A.).
- Clorofórmio (Merck S.A – Porto Alegre, RS, Brasil).
- Metanol (Merck S.A – Porto Alegre, RS, Brasil).
- Tolueno (Merck S.A – Porto Alegre, RS, Brasil).
- Líquido de Cintilação Opti Phase ‘Hi Safe’3 (Wallac Scintillation Products – England).

Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de pureza “pró-análise” (P.A.).

3.2 Métodos

3.2.1 Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, de diferentes idades: 10 e 60 dias pós-natal.

3.2.2 Composição do Tampão Dulbecco’s Na⁺-Fosfato

Utilizou-se a solução tampão Dulbecco’s Na⁺-Fosfato, pH 7.2, com as seguintes concentrações de potássio:

- Tampão 1: 2.7 mM ;
- Tampão 2: 20 mM;
- Tampão 3: 50 mM.

A Tabela 1 apresenta a composição das soluções do Tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato.

Tabela 1 – Composição do Tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato

Sais	Tampão 1	Tampão 2	Tampão 3
NaH ₂ PO ₄	17,7 mM	17,7 mM	17,7 mM
CaCl ₂	0,9 mM	0,9 mM	0,9 mM
MgCl ₂	0,49mM	0,49mM	0,49mM
KCl	2,7mM	20mM	50mM
NaCl	113,3mM	96mM	66mM

3.2.3 Isolamento do córtex cerebral

Os ratos utilizados nas idades de 10 e 60 dias pós-natal foram sacrificados por decapitação e seus cérebros foram removidos rapidamente. Os córtices cerebrais foram isolados, pesados e colocados sobre placas de Petry, acondicionadas sobre gelo. A superfície de cada placa de Petry foi coberta com papel filtro umedecido com solução tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato 2.7 mM K⁺.

Os córtices cerebrais de ratos de 60 dias pós-natal foram fatiados em fatiador (McILWAIN TISSUE CHOPPER) na espessura de 0,3mm. Este procedimento foi adotado com o objetivo de aumentar a área de contato do tecido com o nutriente energético incubado.

3.2.4 Condições de incubação com precursor radioativo para determinação de CO₂ e síntese de lipídios

Entre 40-50 mg de córtices cerebrais foram incubados com 1,0 ml de solução tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato, pH 7,2 contendo:

- D-Glicose 5 mM + 0,2 µCi de D-[U-¹⁴C]Glicose
- D-Glicose 5 mM + 0,2 µCi de D-[U-¹⁴C]Glicose + Ouabaína 1mM
- D-Glicose 5 mM + 0,2 µCi de D-[U-¹⁴C]Glicose + Bumetanide 10 µM

- d) D-Frutose 10 mM + 0,2 μ Ci de D-[U-¹⁴C]Frutose
- e) D-Manose 5 mM + 0,2 μ Ci de D-[U-¹⁴C]Manose
- f) L-Lactato 10 mM + 0,2 μ Ci de L-[U-¹⁴C]Lactato

A solução tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato foi pipetada em frascos de 10 ml, os quais foram levados ao banho metabólico a 35°C antes da adição do tecido.

Após o conteúdo dos frascos ter sido aerado por 30 segundos com O_{2(g)}, o tecido foi adicionado. Os frascos foram fechados com tampas de borracha, contendo poços de vidro com papel filtro dobrado em forma de “w” e vedados com parafilme.

As fatias de córtices cerebrais foram incubadas a 35°C por 1 hora em banho metabólico com agitação (Dubnoff a 60 ciclos por minuto) (Fig. 3.1), de acordo com o método de Dunlop et al. (1975).

3.2.5 Captação de CO₂ e extração de lipídios

Após uma hora de incubação a reação foi interrompida pela adição, através de seringa graduada, de 0,2 ml de ácido tricloroacético (TCA), a 50%, no meio de incubação em cada frasco. Após, foram injetados com seringa graduada 0,2 ml de hidróxido de sódio (2 M) no pocinho central, sendo os frascos novamente vedados com parafilme e submetidos à agitação em banho metabólico por 30 minutos para captação de CO₂ (Fig. 3.1).

Após este procedimento, o conteúdo dos pocinhos foi transferido para tubos Eppendorf com auxílio de pinça e pipeta automática. Em cada tubo Eppendorf foi adicionado 1,5 ml de líquido de cintilação. Posteriormente os tubos Eppendorf foram agitados em Vórtex, e a radioatividade incorporada a CO₂ foi medida em contador de cintilação líquida (WALLAC 1409).

Os resultados foram expressos em pmoles de nutrientes energéticos oxidados a CO₂ por mg de córtex cerebral por hora.

O tecido, juntamente com o meio de incubação, foi homogeneizado em homogeneizador Potter Elvehjem, o qual foi lavado com 1,0 ml de TCA 10%, e seu conteúdo transferido para tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram centrifugados em centrífuga por dois minutos a 2000g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1 ml de TCA 10%, repetindo-se este processo por mais duas vezes (Fig. 3.2). Os tubos de ensaio contendo o precipitado permaneceram emborcados sobre papel absorvente, durante 24 horas.

Para extração de lipídios, o precipitado foi ressuscitado com 1,0 ml de solução clorofórmio:metanol (2:1 v:v). Os tubos de ensaio foram vedados com parafilme e submetidos à agitação por 10 minutos. Após, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 2000g, e o sobrenadante de cada tubo de ensaio foi transferido para Vials com auxílio de pipeta Pasteur (Fig. 3.2), repetindo-se este processo por mais duas vezes (FOLCH & LEE, 1957).

Após evaporação total do clorofórmio:metanol dos Vials, foram acrescentados 3,0 ml de líquido de cintilação PPO/POPOP (4,0 g/50 mg em 1000 ml de tolueno) e a radioatividade incorporada a lipídios foi medida em contador de cintilação líquida (WALLAC 1409). Os resultados foram expressos em pmoles de nutrientes energéticos convertidos a lipídios por mg de córtex cerebral por hora.

3.2.6 Condições de Incubação para Captação de 2-[U-¹⁴C]-Deoxiglicose

A solução tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato foi preparada conforme descrito na Tabela 1. Após, a solução foi aerada com O_{2(g)} durante 5 minutos, o pH padronizado em 7,2 e aerada novamente.

Posteriormente, 0,7 ml de solução tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato, contendo os precursores energéticos abaixo relacionados: a, b, foram pipetadas em béqueres de vidro com capacidade para 5 ml, sendo os mesmos colocados previamente em banho metabólico a 35°C (Fig. 3.3).

- a) D-Glicose 2 mM + 0,1 µCi de 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose + Monensina 10 µM
- b) D-Glicose 2 mM + 0,2 µCi de 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose + Ouabaína 1 mM

Para incubações com tempo de duração de 1 hora, 10 e 5 minutos procedeu-se da seguinte forma:

Os córtices cerebrais foram dissecados. Pesamos entre 40-50 mg de tecido, que posteriormente foi fatiado na espessura de 0,3 mm em fatiador (McILWAIN TISSUE CHOPPER) (Fig. 3.3).

Adicionamos as fatias de tecido aos béqueres colocados previamente no banho metabólico. O sistema de incubação permaneceu em 35°C, com agitação (90 ciclos/minuto), fechado com aeração (O_{2(g)}) durante os diferentes tempos de incubação (para experimentos com monensina): 1 hora, 10 e 5 minutos. Para os experimentos com ouabaína, o tempo de incubação foi de 1 hora.

Após a incubação, os béqueres foram retirados do banho metabólico e colocados imediatamente em isopor com gelo. Adicionamos 0,7 ml de solução tampão acondicionada em gelo e agitamos. O sobrenadante foi retirado com pipeta pasteur e desprezado. Novamente adicionamos 1,5 ml de solução tampão, agitamos e desprezamos o sobrenadante. Esta operação foi repetida por mais uma vez (Fig. 3.3).

Posteriormente, pipetamos sobre o tecido 300 µl de NaOH 0,5 N e homogeneizamos com auxílio de uma pipeta Pasteur. Transferimos o conteúdo dos béqueres para tubos Eppendorf e adicionamos 1 ml de líquido de cintilação. A radioatividade incorporada a 2-Deoxiglicose-6-P foi medida em contador de cintilação líquida (WALLAC 1409).

Para incubações (D-Glicose 2 mM + 0,1 µCi de 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose + Monensina 10 µM) com tempo de duração de 2 minutos procedeu-se da seguinte forma (Fig. 3.4):

A solução tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato foi preparada conforme descrito na Tabela 1. Após, a solução foi aerada com O_{2(g)} durante 5 minutos, o pH padronizado em 7,2 e aerada novamente.

Os córtices cerebrais foram dissecados. Pesamos entre 40-50 mg de tecido, que posteriormente foi fatiado na espessura de 0,4 mm em fatiador (McILWAIN TISSUE CHOPPER). Após, foi separada uma fatia de cada córtex (de diferentes animais) para cada n, com auxílio de um pincel fino.

Acondicionamos as fatias de tecido em uma placa de Petry com solução tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato 2.7 mM K⁺. Para a incubação, adicionamos uma fatia de córtex com tampão em um poço de placa de cultura. Retiramos, com auxílio de pipeta Pasteur, o tampão sem radioativo de cada poço, e logo após adicionamos ao tecido em cada poço 0.5 ml de solução tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato 2.7 mM K⁺ com 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose + Monensina. A incubação transcorreu por 2 minutos.

Posteriormente, as fatias da placa de cultura foram retiradas com auxílio de uma pinça, e foi feita a lavagem das mesmas com 1 ml de tampão Dulbecco's Na⁺-Fosfato 2.7 mM K⁺ acondicionado em gelo. Esta operação foi repetida por mais duas vezes.

Após, pipetamos sobre o tecido 300 µl de NaOH 0,5 N, e homogeneizamos com auxílio de uma pipeta Pasteur. Retiramos uma alíquota (5 µl) para dosagem de proteína através do método de Lowry. Em tubos Eppendorf, adicionamos ao tecido homogeneizado 1 ml de líquido de cintilação. A radioatividade incorporada a 2-Deoxiglicose-6-P foi medida em contador de cintilação líquida (WALLAC 1409).

3.3 Análise Estatística

Os resultados experimentais expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) foram submetidos a tratamento estatístico através da Análise de Variância de uma via, utilizando-se o software SPSS/PC-Plus.

As comparações entre as médias dos grupos foram realizadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

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

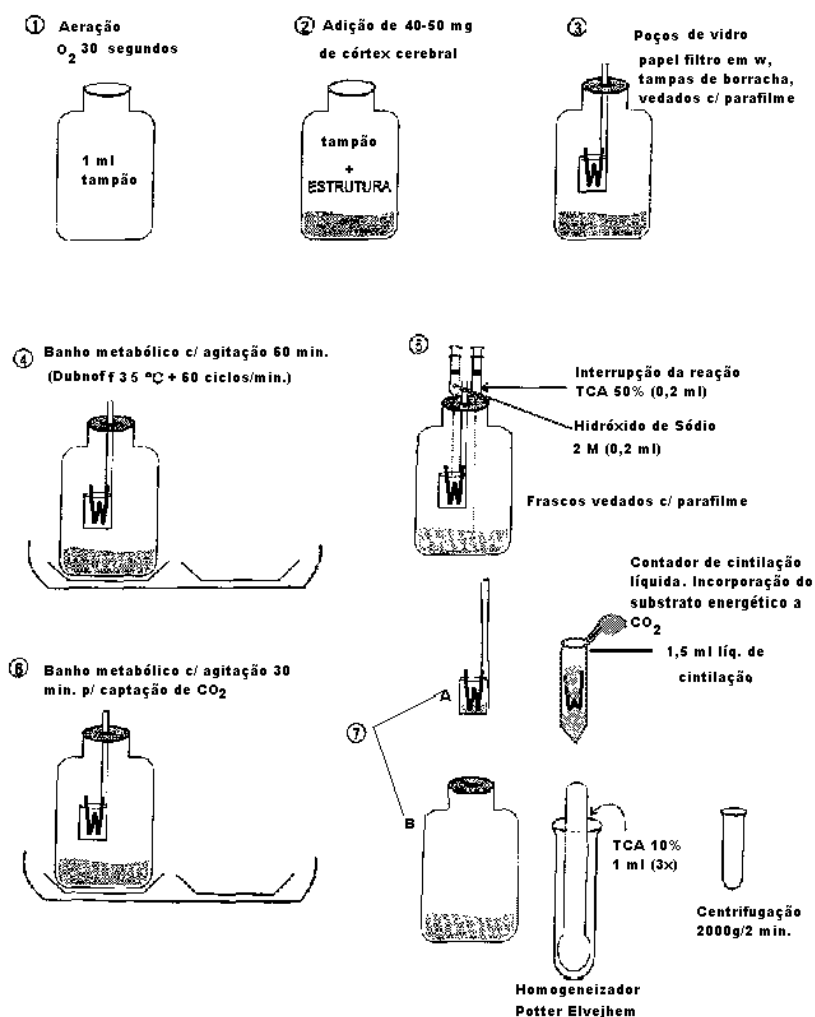


Figura 3.1 – Metodologia empregada na incubação e avaliação da oxidação a CO₂ e determinação de lipídios dos nutrientes energéticos estudados: glicose, frutose, manose e lactato.

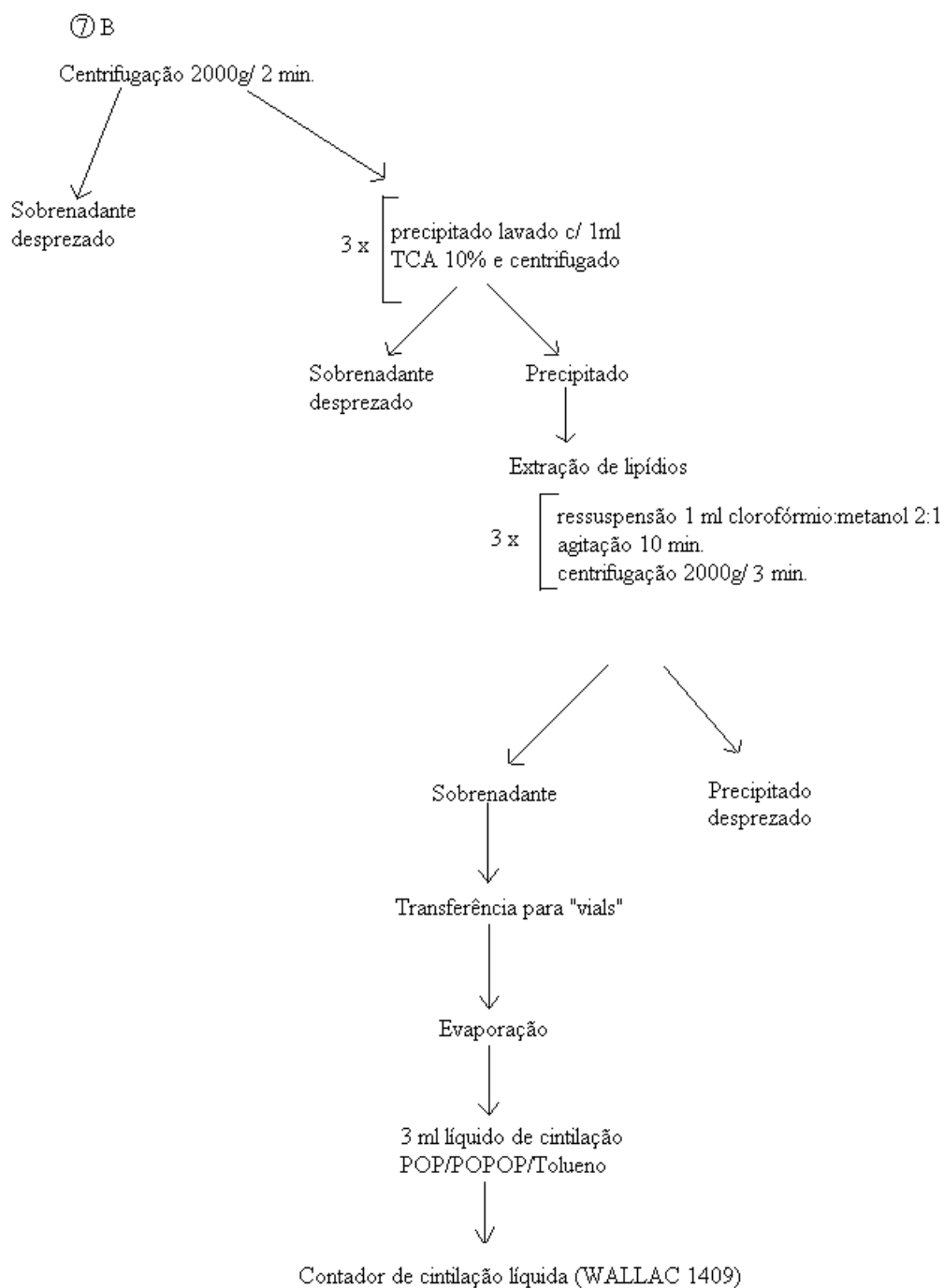


Figura 3.2 – Metodologia empregada na determinação de lipídios a partir dos nutrientes energéticos estudados: glicose, frutose, manose e lactato.

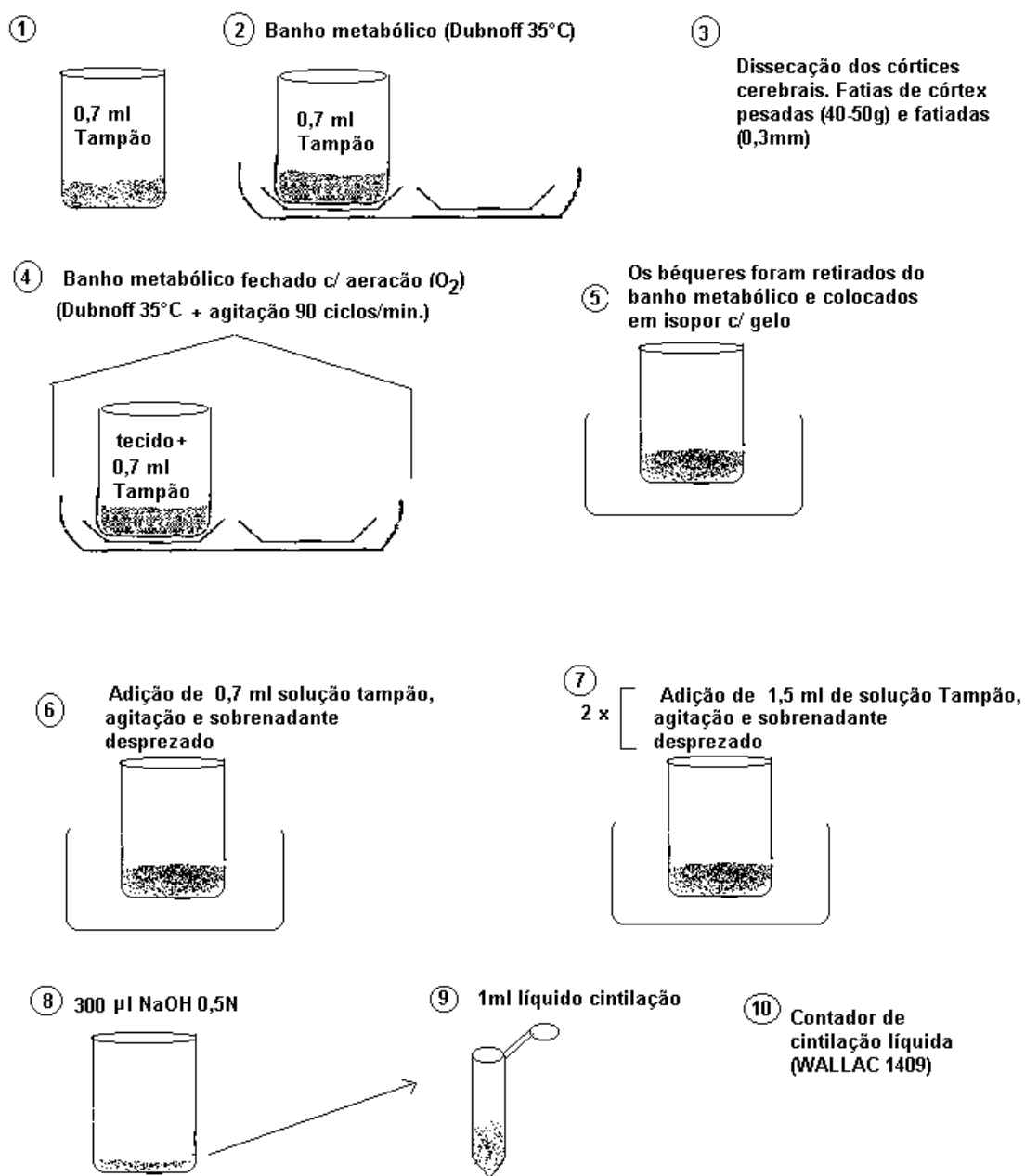


Figura 3.3 – Metodologia empregada na captação de 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose + Ouabaina (1 hora de incubação) e Monensina (1 hora, 10 e 5 minutos de incubação).

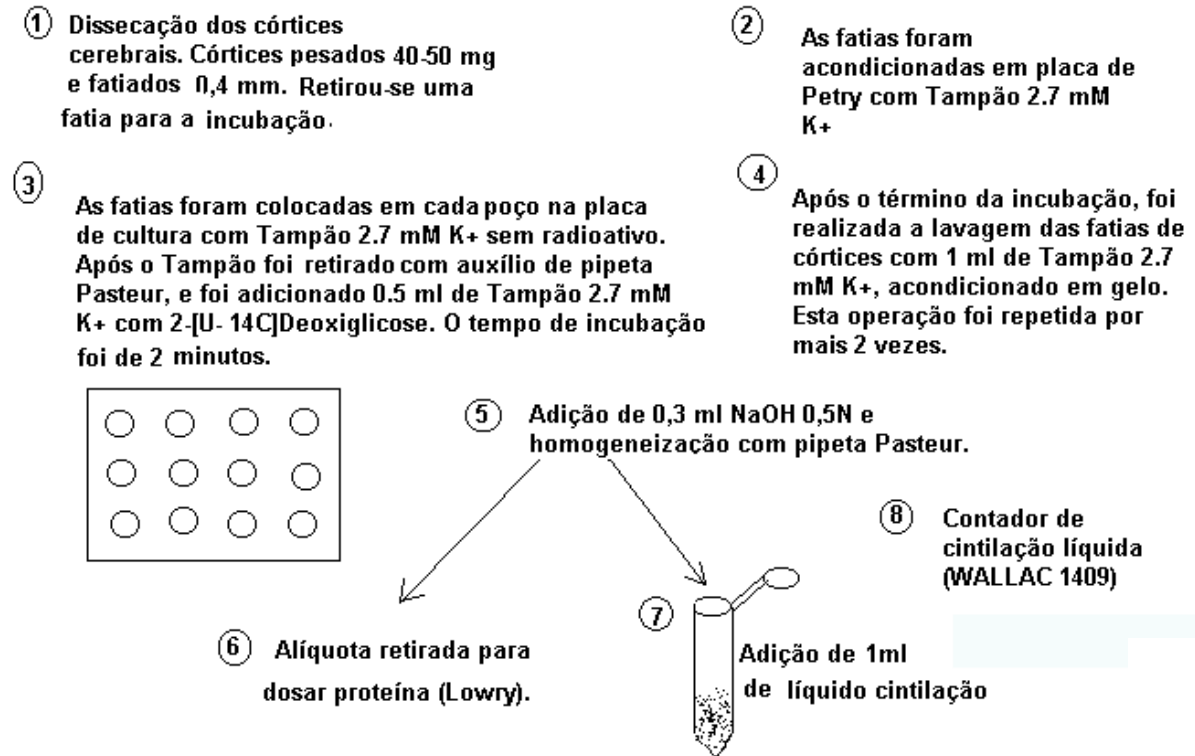


Figura 3.4 – Metodologia empregada na captação de 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose + Monensina (2 minutos de incubação).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da concentração de K^+ extracelular sobre a oxidação de nutrientes energéticos a CO_2 em córtex cerebral de ratos

A elevação na $[K^+]_e$ aumentou a oxidação das hexoses glicose (Fig. 4.1.1), frutose (Fig. 4.1.2), e manose (Fig. 4.1.3), a CO_2 em ratos adultos, e a de velocidade de oxidação das 3 hexoses manteve-se na faixa de 1000 pmoles/mg tecido.h. Em córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal, o aumento na $[K^+]_e$ não teve efeito sobre a oxidação de glicose (Fig. 4.1.1) e frutose (Fig. 4.1.2) a CO_2 .

Os resultados mostram que o aumento na $[K^+]_e$ teve efeito sobre a oxidação de lactato a CO_2 , em ambas as idades estudadas: 10 e 60 dias pós-natal (Fig. 4.1.4).

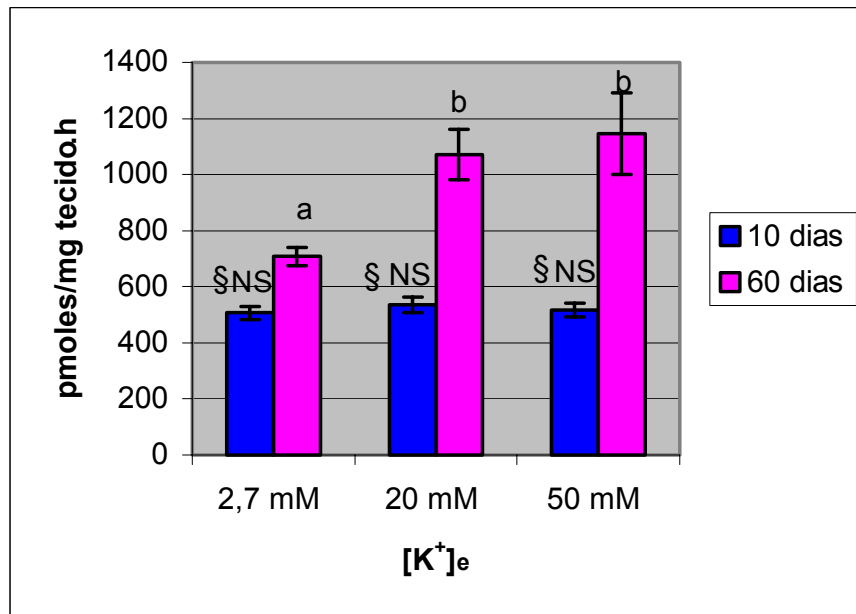


Figura 4.1.1 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a oxidação de D-[U-¹⁴C]Glicose a CO₂ em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média ±EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,01$.

$n = 8$ para cada idade.

Letras minúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: **a** difere significativamente de **b** ($p < 0,01$).

Letras maiúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 10 dias pós-natal: **NS**= não significativo.

Símbolo § – comparações entre 10 e 60 dias de idade pós-natal na mesma [K⁺]_e: § difere significativamente ($p < 0,01$).

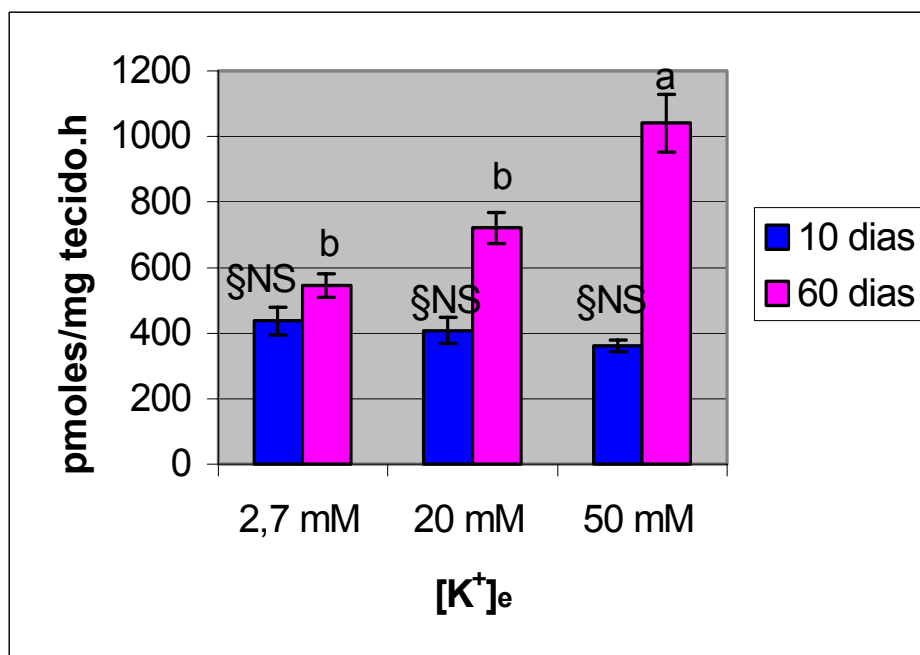


Figura 4.1.2 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a oxidação de D-[U-¹⁴C]Frutose a CO₂ em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média ±EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,01$.

$n = 8$ para cada idade.

Letras minúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: **a** difere significativamente de **b** ($p < 0,01$).

Letras maiúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 10 dias pós-natal: NS= não significativo.

Símbolo § – comparações entre 10 e 60 dias de idade pós-natal na mesma [K⁺]_e: § difere significativamente ($p < 0,01$).

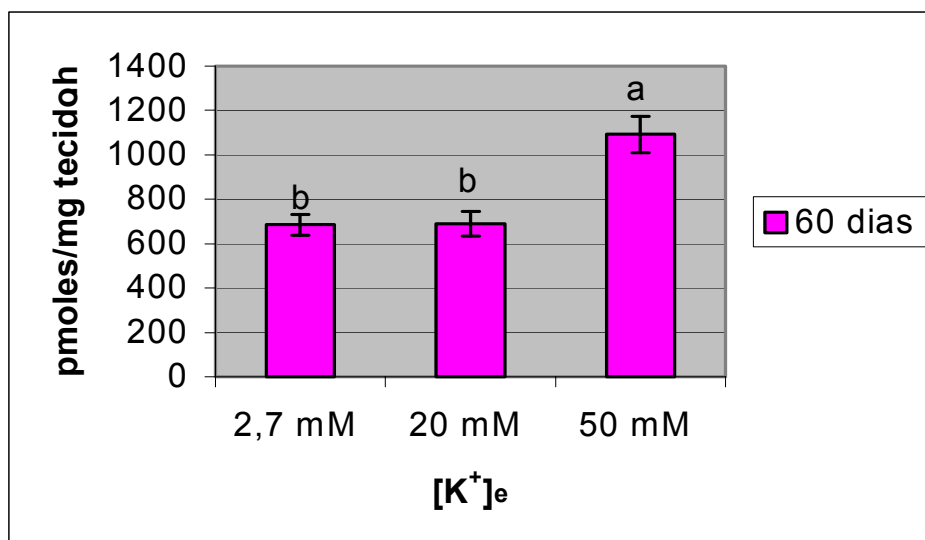


Figura 4.1.3 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a oxidação de D-[U-¹⁴C]Manose a CO₂ em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média ±EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,01$.

n = 8.

Letras minúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: **a** difere significativamente de **b** ($p < 0,01$).

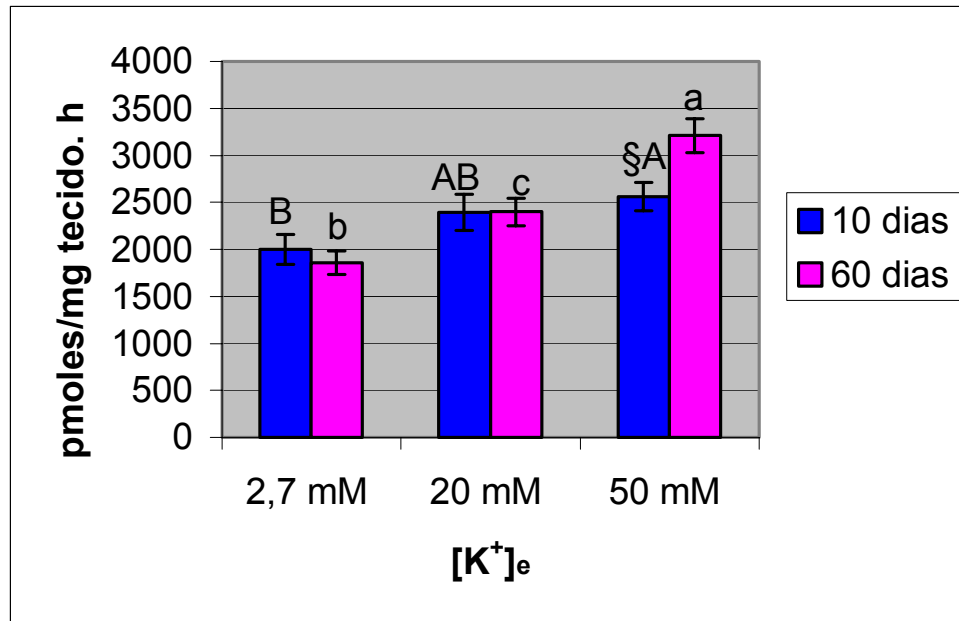


Figura 4.1.4 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a oxidação de L-[U-¹⁴C]Lactato a CO₂ em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média ±EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,05$.

$n = 8$ para cada idade.

Letras minúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: letras minúsculas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 10 dias pós-natal: **A** difere significativamente de **B** ($p < 0,05$); **AB** não difere significativamente de **A** e **B**.

Símbolo § – comparações entre 10 e 60 dias de idade pós-natal na mesma [K⁺]_e: § difere significativamente ($p < 0,05$).

4.2 Efeito da concentração de K^+ extracelular sobre a conversão de nutrientes energéticos a lipídios em córtex cerebral de ratos

Nossos resultados mostram que elevadas concentrações de K^+ extracelular aumentaram a conversão de glicose (Fig. 4.2.1) e lactato (Fig. 4.2.4) a lipídios somente em ratos de 10 dias de idade pós-natal.

A conversão de glicose a lipídios (Fig. 4.2.1) em ratos de 60 dias foi cerca de duas vezes menor em relação a ratos de 10 dias de idade. Com relação à frutose (Fig. 4.2.2), obtivemos resultado inverso: a sua conversão a lipídios em ratos de 60 dias foi cerca de duas vezes maior em relação a ratos de 10 dias de idade. Além disso, o aumento na $[K^+]_e$ não teve efeito significativo sobre a conversão de frutose a lipídios (Fig. 4.2.2) em ambas as idades. A velocidade de conversão de manose a lipídios (Fig. 4.2.3) em ratos adultos não variou com o aumento na $[K^+]_e$.

O aumento na $[K^+]_e$ de 2.7 mM para 20 mM aumentou a conversão de lactato a lipídios (Fig. 4.2.4) em ambas as idades estudadas.

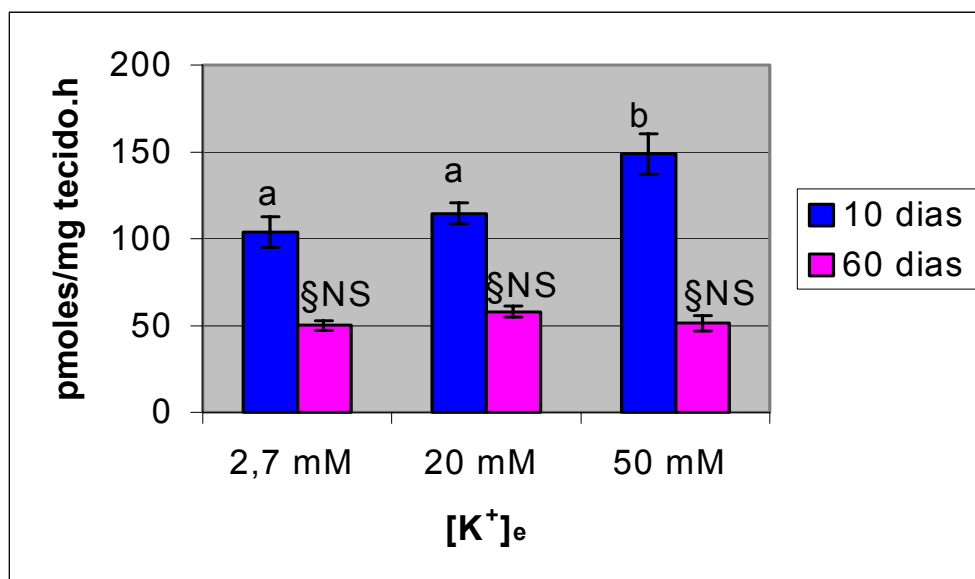


Figura 4.2.1 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a conversão de D-[U-¹⁴C]Glicose a lipídios em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média \pm EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,05$.

$n = 8$ para cada idade.

Letras maiúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: **NS**= não significativo.

Letras minúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 10 dias pós-natal: **a** difere significativamente de **b** ($p < 0,05$).

Símbolo § – comparações entre 10 e 60 dias de idade pós-natal na mesma [K⁺]_e: § difere significativamente ($p < 0,05$).

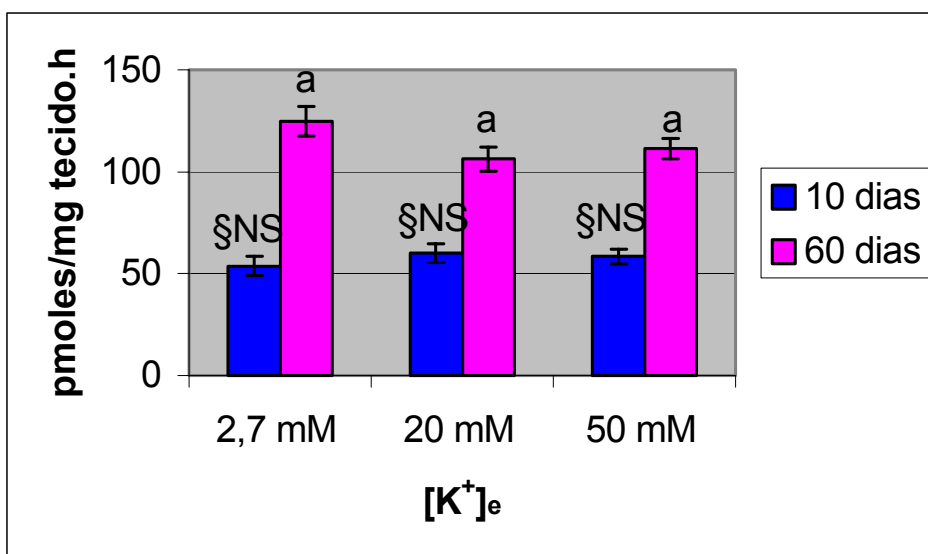


Figura 4.2.2 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a conversão de D-[U-¹⁴C]Frutose a lipídios em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média \pm EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,05$.

$n = 8$ para cada idade.

Letras minúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: não há diferença significativa.

Letras maiúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 10 dias pós-natal: NS= não significativo.

Símbolo § – comparações entre 10 e 60 dias de idade pós-natal na mesma [K⁺]_e: § difere significativamente ($p < 0,05$).

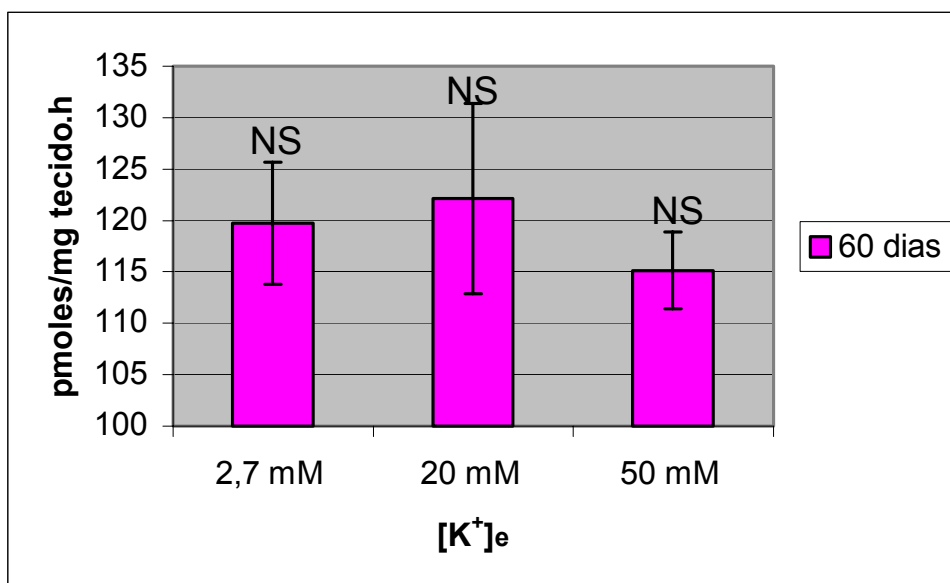


Figura 4.2.3 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a conversão de D-[U-¹⁴C]Manose a lipídios em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média ±EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,05$.

n = 8.

Letras maiúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: NS= não significativo.

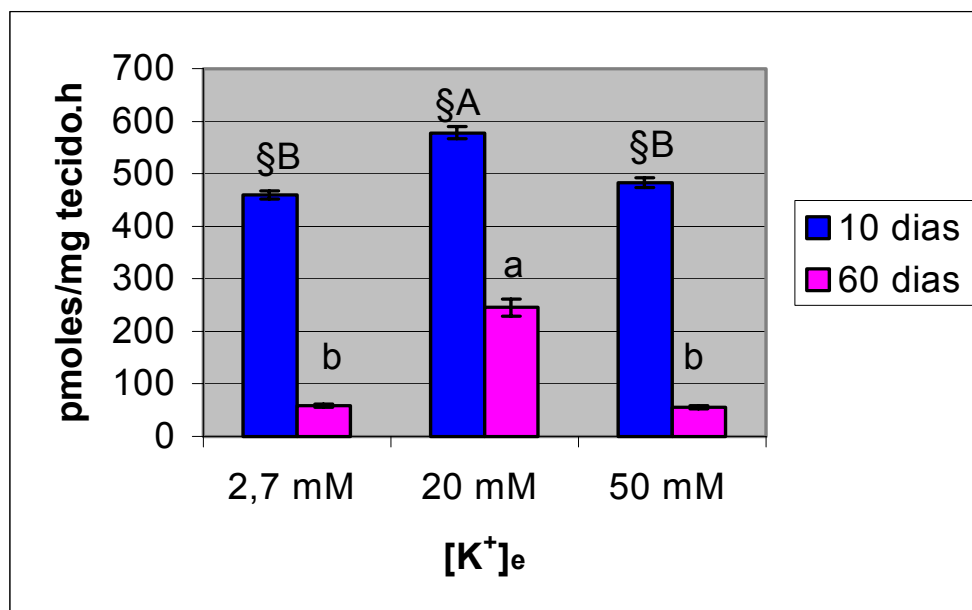


Figura 4.2.4 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular sobre a conversão de L-[U-¹⁴C]Lactato a lipídios em córtex cerebral de ratos de 10 e 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média \pm EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,05$.

$n = 8$ para cada idade.

Letras minúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: **a** difere significativamente de **b** ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 10 dias pós-natal: **A** difere significativamente de **B** ($p < 0,05$).

Símbolo § – comparações entre 10 e 60 dias de idade pós-natal na mesma [K⁺]_e: § difere significativamente ($p < 0,05$).

4.3 Efeito da concentração de K^+ extracelular e da ouabaína sobre a captação de 2-[U- ^{14}C]Deoxiglicose em córtex cerebral de ratos adultos

O aumento da $[K^+]_e$, assim como a presença de ouabaína, não teve efeito sobre a captação de 2-[U- ^{14}C]Deoxiglicose (Fig. 4.3.1).

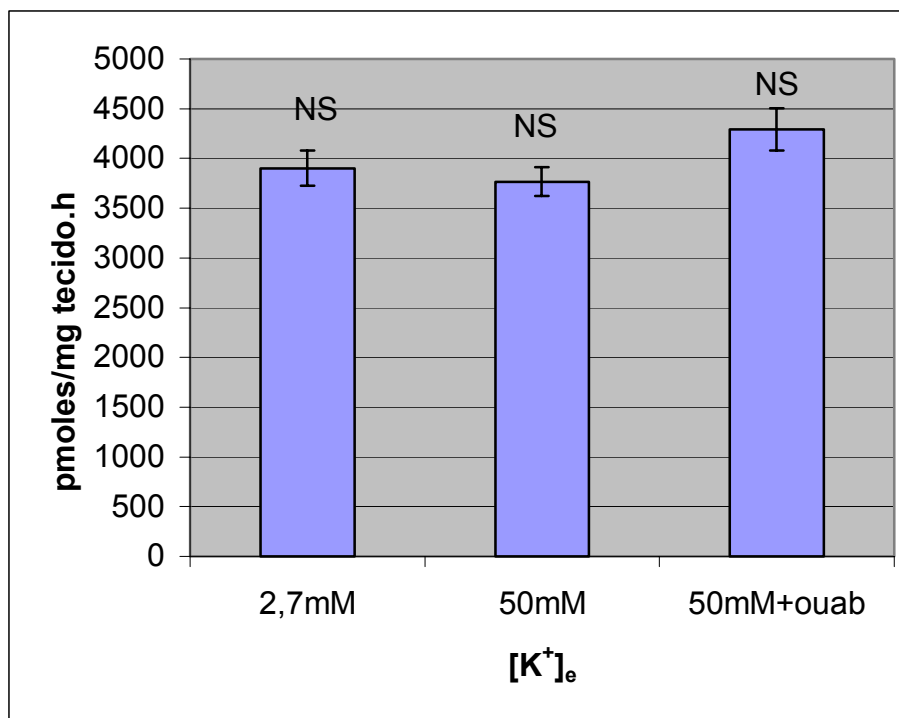


Figura 4.3.1 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular e da ouabaína sobre a captação de 2-[U- ^{14}C]Deoxiglicose em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média \pm EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,05$.

$n = 8$.

Letras maiúsculas – comparações entre $[K^+]_e$ na idade de 60 dias pós-natal: **NS**= não significativo.

4.4 Efeito da concentração de K^+ extracelular e da ouabaína sobre a oxidação de glicose a CO_2 em córtex cerebral de ratos adultos

O aumento da $[K^+]_e$ teve efeito sobre a oxidação de glicose a CO_2 , porém quando o aumento da $[K^+]_e$ foi acompanhado pela adição de ouabaína, não foi observado efeito do inibidor da enzima Na^+,K^+ -ATPase sobre a oxidação de glicose a CO_2 .

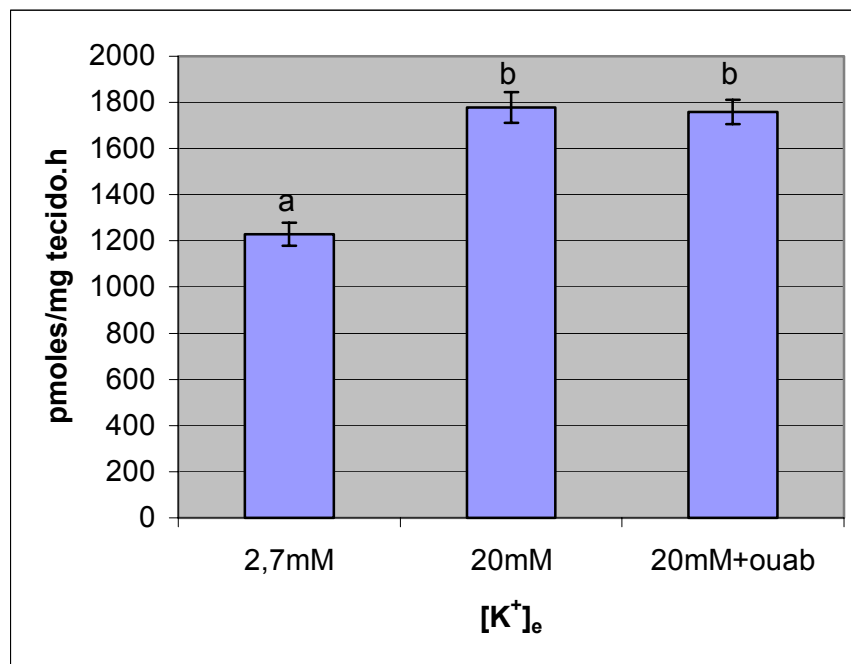


Figura 4.4.1 – Efeitos de diferentes concentrações de potássio extracelular e da ouabaína sobre a oxidação de D-[U- ^{14}C]Glicose a CO_2 em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média \pm EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, $p < 0,05$.

n = 8.

Letras minúsculas – comparações entre $[K^+]_e$ na idade de 60 dias pós-natal: **a** difere significativamente de **b** ($p < 0,05$).

4.5 Efeito da monensina sobre a captação de 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose em córtex cerebral de ratos adultos

De acordo com a Tabela 2, o resultado deste experimento nos mostra que: em incubações de 1 hora, 10 minutos, 5 minutos e 2 minutos, monensina na concentração de 10 μ M modificou a captação de 2-Deoxiglicose em um meio com 2,7 mM K^+ , em relação ao meio com 2,7 mM K^+ sem adição de monensina (grupo controle).

Tabela 2 – Efeito da monensina sobre a captação de 2-[U-¹⁴C]Deoxiglicose em diferentes tempos de incubação, em córtex cerebral de ratos adultos.

	Captação de 2-[U- ¹⁴ C]Deoxiglicose			
	Tempo de incubação			
	1 hora	10 min.	5 min.	2 min.
2.7 mM K^+ sem monensina (controle)	100% \pm 18,4	100% \pm 12,1	100% \pm 11,2	100% \pm 7,4
2.7 mM K^+ com monensina	50% \pm 8,9*	72% \pm 13,9*	100% \pm 10,1	160% \pm 9,5*

As médias foram analisadas por teste T de Student, $p < 0,05$. $n = 8$.

* Difere significativamente em relação ao controle, $p < 0,05$.

Os valores foram expressos em % pois houve variação nos resultados dos experimentos nos diferentes tempos de incubação.

4.6 Efeito do bumetanide e da concentração de K^+ extracelular sobre a oxidação de glicose a CO_2 em córtex cerebral de ratos adultos

O aumento da $[K^+]_e$ teve efeito sobre a oxidação de glicose a CO_2 , porém quando o aumento da $[K^+]_e$ foi acompanhado pela adição de bumetanide, não foi observado efeito do inibidor do transportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ sobre a oxidação de glicose a CO_2 .

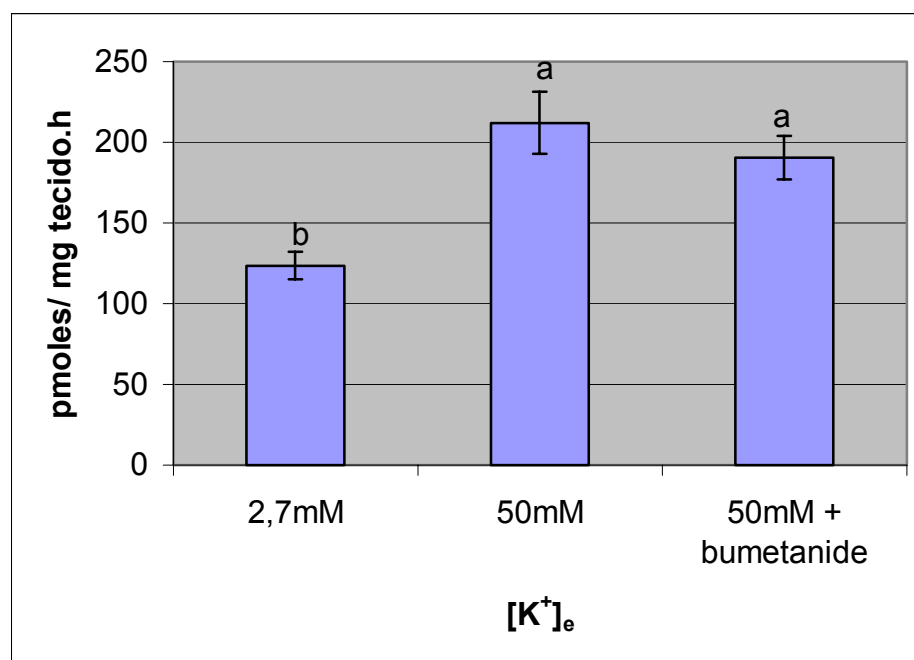


Figura 4.6.1 – Efeitos do bumetanide e da concentração de potássio extracelular sobre a oxidação de D-[U-¹⁴C]Glicose a CO₂ em córtex cerebral de ratos de 60 dias de idade pós-natal. Cada barra representa a média ±EPM. As médias foram analisadas por ANOVA e teste de múltipla amplitude de Duncan, p< 0,05.

n = 8.

Letras minúsculas – comparações entre [K⁺]_e na idade de 60 dias pós-natal: **a** difere significativamente de **b** (p<0,05).

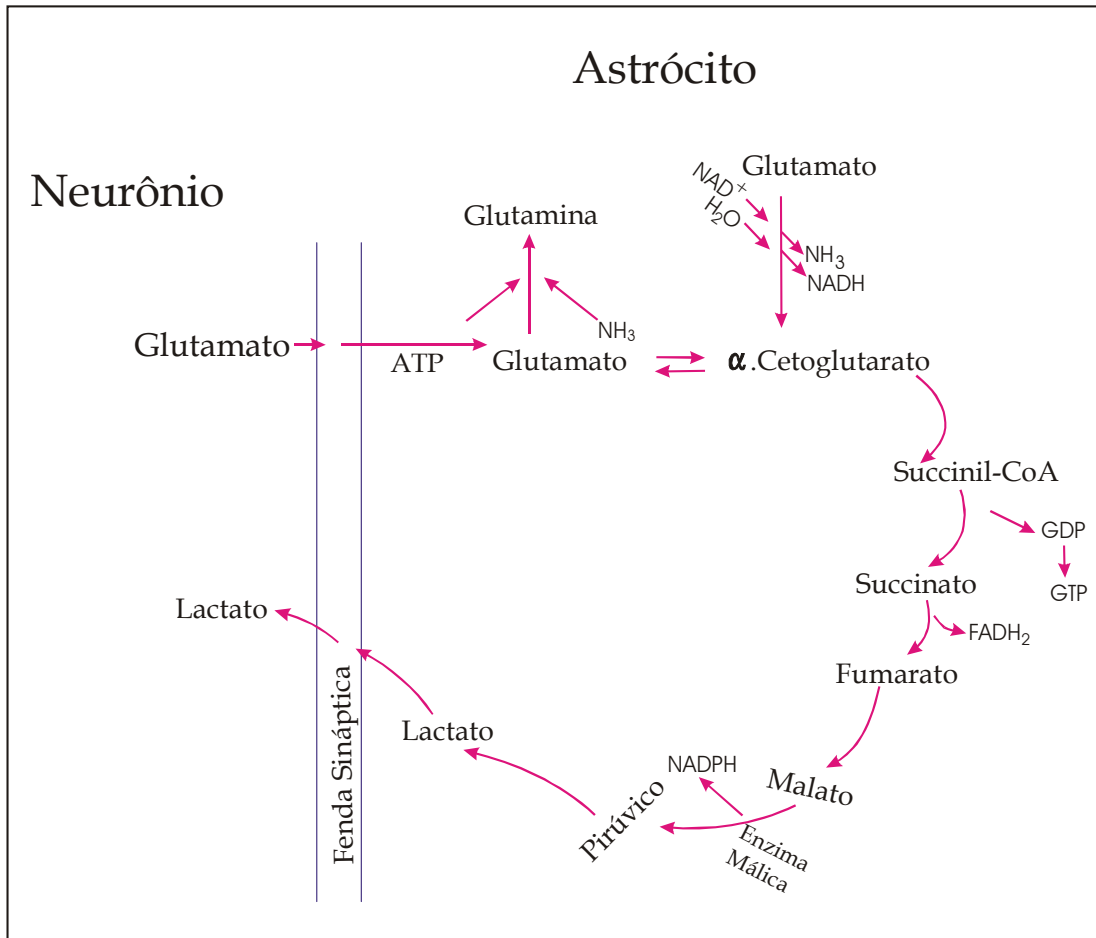
5 DISCUSSÃO

A limitação da produção de energia no cérebro, assim como ocorre durante hipóxia e hipoglicemia, provoca um colapso no gradiente de íons, o qual se não for restabelecido em minutos, leva ao dano celular permanente ou, eventualmente, à morte celular. A energia requerida para suportar a função normal do cérebro e o nível de íons, é fornecida pela glicólise e fosforilação oxidativa, as quais, em condições fisiológicas, operam em conjunto (SILVER, DEAS & ERECINSKA, 1997).

No cérebro, sob condições de repouso, a razão entre consumo de oxigênio e utilização de glicose é, aproximadamente, 5.5, indicando que >90% da glicose consumida segue a via oxidativa, e sugerindo acoplamento entre metabolismo oxidativo e atividade funcional do cérebro (SIESJÖ, 1978).

A dependência da função cerebral em relação à glicose sangüínea como nutriente não exclui a possibilidade de que lactato, e outros nutrientes energéticos, dentro do cérebro, possam ser transferidos entre diferentes tipos de células e sirvam como fonte energética (DIENEL & HERTZ, 2001). Durante a ativação cerebral por glutamato (liberado pelos neurônios na fenda sináptica e captado pelos astrócitos), o fluxo de lactato dos astrócitos para os neurônios (Fig. 1.4) serve como nutriente energético neuronal. Este modelo propõe que 80-90% do consumo total de glicose cortical é usado para demanda da transmissão glutamatérgica e que 85% da utilização da glicose pelo cérebro é acoplada ao ciclo glutamato-glutamina para prover energia para captação de glutamato acoplada a Na^+ , e sua conversão subsequente a glutamina nos astrócitos. Estes dois processos requerem energia, e são dependentes da energia derivada glicoliticamente (DIENEL & HERTZ, 2001).

Está bem estabelecido que os astrócitos podem fornecer outros substratos, além de glutamina, aos neurônios para síntese de energia e neurotransmissores. Contudo, a função dos astrócitos de remover glutamato da fenda sináptica e metabolizar glutamato, é fundamental para manter a homeostase no cérebro (SONNENWALD et al., 1993). Sonnenwald et al. (1993) e McKenna et al. (1996) mostraram que a concentração de glutamato extracelular é um fator chave na regulação do metabolismo de glutamato em astrócitos: até 0.1 mM glutamato é convertido em glutamina (85%), em concentrações entre 0.2-0.5 mM glutamato é principalmente oxidado no ciclo de Krebs, e 25% é convertido em lactato via enzima málica (Fig. 5.1). Lactato é então utilizado como nutriente energético em neurônios, que contém, principalmente, a isoforma Lactato desidrogenase-1. A conversão de glutamato a lactato pode representar um mecanismo para a completa oxidação do esqueleto de carbono do glutamato para produção de energia. Além disso, a formação de lactato pode constituir um mecanismo para transformar o excesso de glutamato, sem aumentar os níveis de glutamina. A formação de lactato pode ser um meio efetivo de utilizar glutamato, pois níveis de lactato até 20 mM são bem tolerados pelo cérebro (SCHURR, WEST & RIGOR, 1989).



Adaptado de SONNENWALD, et al. (1993)

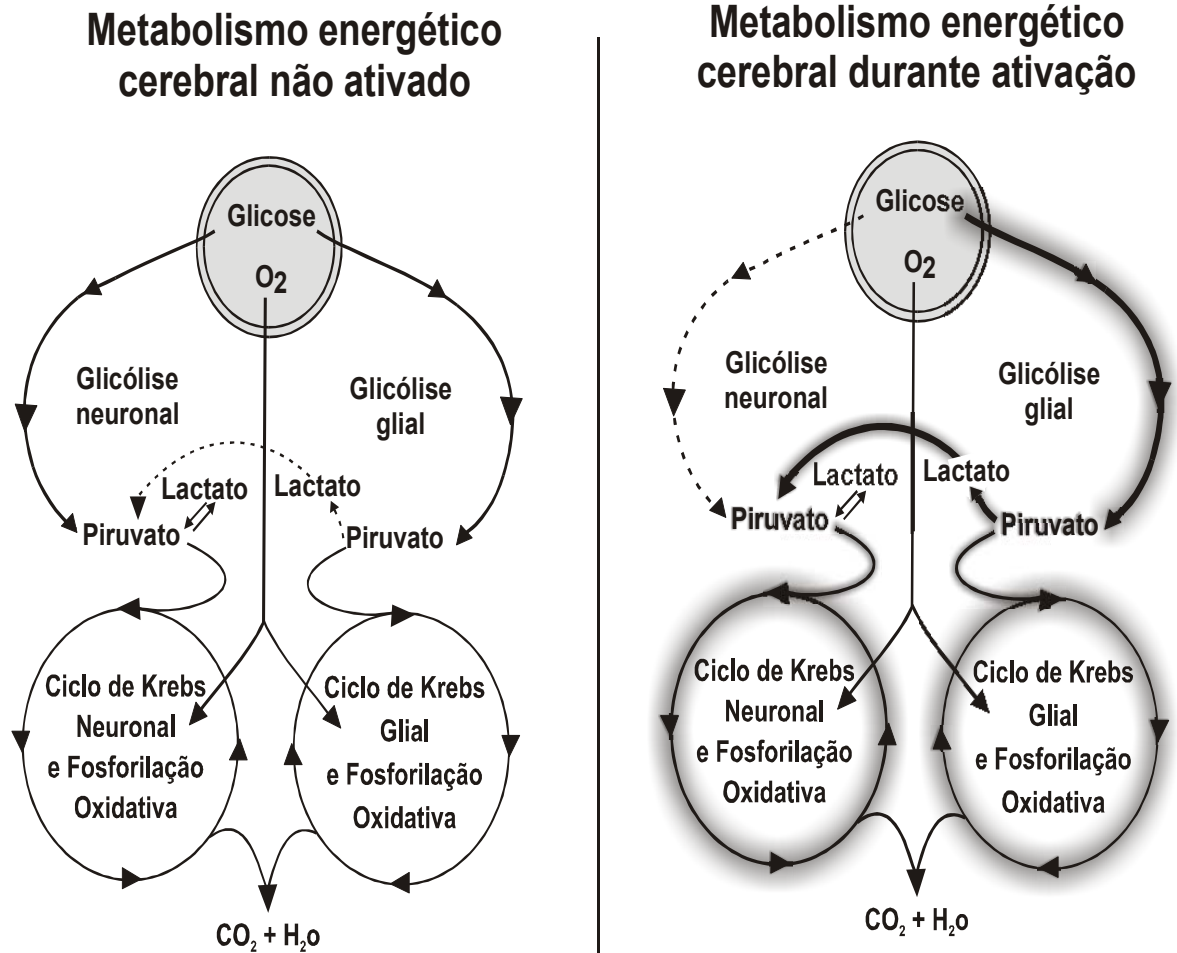
Figura 5.1 – Metabolismo de glutamato nos astrócitos.

A exposição a elevadas concentrações de potássio provoca um aumento superior a duas vezes na velocidade de oxidação de [^{14}C]glicose e fosforilação de [^{14}C]deoxiglicose, em neurônios cerebelares glutamatérgicos (PENG, ZHANG & HERTZ, 1994).

Elevadas concentrações de potássio extracelular provocam um pequeno estímulo (~20%) na fosforilação de [^{14}C]deoxiglicose e oxidação de glicose em astrócitos, um efeito que parece ser resultado do aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, sensível a estímulo por $[\text{K}^+]_e$ no máximo em ~12 mM K^+ (HUANG et al., 1994). Além disso, elevadas $[\text{K}^+]_e$ estimulam o consumo de oxigênio e oxidação de glicose em astrócitos, uma estimulação que provavelmente resulta da ativação de um sistema de cotransporte, levando à entrada de K^+ e Cl^- nas células (DIENEL & HERTZ, 2001). Assim, em ambos, neurônios e astrócitos, os efeitos metabólicos de elevada $[\text{K}^+]_e$ são associados ao estímulo de transporte de íons, conclusão obtida a partir das evidências de que o aumento na demanda de energia durante ativação cerebral reflete a demanda metabólica de transporte de íons, ocorrendo elevação na

concentração de Na^+ e K^+ intracelular (MATA et al., 1980). O aumento nos níveis de ADP e AMP, provocado pela utilização de ATP, estimula o metabolismo energético, possivelmente sob algumas condições, em conjunto com um aumento mediado por cálcio nas atividades de desidrogenases mitocondriais (DIENEL & HERTZ, 2001).

Schurr et al. (1999), a partir de seus estudos, propõem um modelo para o metabolismo energético cerebral durante o estado de não ativação e durante ativação (exposição a glutamato) (Fig. 5.2): sob condições de repouso ($[\text{K}^+]_e = \sim 3 \text{ mM}$), a maioria da glicose captada pelo cérebro a partir do sangue, é metabolizada oxidativamente em ambos compartimentos glial e neuronal. A maior parte do lactato basal produzido na glia é transportada para os neurônios, onde este entra no ciclo de Krebs neuronal. A ativação por glutamato promove a captação de neurotransmissor acompanhada por Na^+ . Há ativação da enzima Na^+, K^+ -ATPase, aumento da [ADP], e conseqüente aumento na metabolização glicolítica de glicose, evidenciada pelo aumento na produção de lactato. Uma explicação plausível para o aumento nos níveis de lactato poderia ser a existência de uma via glicolítica separada, com o único propósito de prover o sistema Na^+, K^+ -ATPase glial com ATP. Em função de que esta via não requer oxigênio para sua atividade, não há aumento no consumo de oxigênio após a ativação (SCHURR et al., 1999). Nos neurônios, lactato torna-se o principal substrato energético pelo concomitante aumento na razão lactato/glicose neuronal (LARRABEE, 1996). O aumento da utilização de lactato nos neurônios é acompanhado por uma diminuição da utilização de glicose. Este mecanismo do metabolismo poderia explicar o fato de que a estimulação do tecido cerebral aumenta a captação de glicose sem o aumento concomitante do consumo de O_2 (SCHURR et al., 1999).



Adaptado de SCHURR, et al. (1999)

Figura 5.2 – Esquema das duas principais vias do metabolismo energético, glicólise e fosforilação oxidativa, em dois compartimentos do tecido cerebral, neuronal e glial, durante ativação (direita) e não-ativação (esquerda) do metabolismo energético.

Sibson et al. (1998) determinaram que a estequiometria entre metabolismo oxidativo de glicose e atividade neuronal glutamatérgica, em córtex in vivo, é de 1:1, implicando que a maioria da energia produzida durante a ativação suporta a função neuronal glutamatérgica. Contudo, estes autores colocam que durante a liberação neuronal de glutamato e sua captação glial, glicólise astrocítica é a principal via que consome glicose, e lactato neuronal é o principal consumidor de oxigênio.

Erecinska et al. (1996) buscaram entender as razões para redução na atividade glicolítica durante intenso bombeamento de íons, em sinaptossomas e cultura de células glioma C6 tratados com veratridina, monensina ou nigericina, com ou sem rotenona. Uma característica comum destes agentes é o fato de provocarem decréscimo na $[K^+]_i$, aumento na

$[Na^+]_i$ e $[Ca^{2+}]_i$, além de causarem despolarização da membrana plasmática. Os resultados deste trabalho mostraram que a exposição dos modelos experimentais aos agentes supracitados causa um colapso no gradiente de íons, diminuindo o estado energético celular ([ATP]), e estimulando a produção de lactato. Durante os primeiros cinco minutos de incubação, a formação de lactato em células C6 aumentou de duas-três vezes, e em sinaptossomas cerca de oito vezes, quando veratridina, nigericina, monensina e rotenona foram adicionadas separadamente ao meio. Uma comparação do comportamento dos dois sistemas indica que em sinaptossomas, ao contrário das células C6, a utilização de energia para restauração do gradiente de íons, principalmente pela bomba Na^+,K^+ -ATPase, excede muito a capacidade da glicólise para produzir ATP, tal que o nível de ATP decresce a valores muito baixos. Esta grande redução no nível de energia é acompanhada por declínio no conteúdo de glicose-6-fosfato, que sugere uma limitação na atividade da hexoquinase. O K_m da hexoquinase para ATP é entre 0.1-0.7 mM. Erecinska et al. (1996) mostraram que a queda na produção de lactato sinaptossomal tem início em níveis de ATP de, aproximadamente, 0.2 mM, e que o aparente K_m para ATP neste processo é 0.08 mM. O decréscimo na [ATP] e na relação [ATP]/[ADP] ocorre em sinaptossomas, o que limita a atividade da hexoquinase, e este é o principal fator responsável pelo decréscimo na velocidade glicolítica.

Mostramos, através deste trabalho, que a elevação na $[K^+]_e$ aumentou a oxidação de lactato a CO_2 , em ambas as idades estudadas: 10 e 60 dias pós-natal (Fig. 4.1.4), sendo que houve diferença significativa na oxidação de lactato a CO_2 entre as idades somente quando a $[K^+]_e$ foi de 50 mM.

Em nossos experimentos verificamos que lactato, quando incubado como único substrato energético, foi em torno de 1,5 vez mais oxidado a CO_2 , em córtex cerebral de ratos de 10 dias, em relação à glicose, manose e frutose. Este achado corrobora as evidências estabelecidas por Vicário et al. (1991), Cremer (1982) e Bueno, Azzolin & Perry (1994). Já em córtex cerebral de ratos adultos, a oxidação de lactato foi cerca de 2,5 vezes maior em relação às três hexoses estudadas. Isto pode ser explicado pelo fato de que a sua oxidação a CO_2 não requer as enzimas marcapasso da via glicolítica. Assim: lactato \rightarrow piruvato \rightarrow Ciclo de Krebs \rightarrow Cadeia Respiratória e Fosforilação Oxidativa \Rightarrow ATP.

Takahashi, Shibata & Fukuuchi (1997) estudaram os efeitos de diferentes concentrações de K^+ (5.4, 28, 56 mM), monensina (10 μ M) e veratridina (75 μ M) sobre a ativação e influxo de Na^+ , em culturas de astrócitos corticais e neurônios do estriato de ratos. Os autores relatam que a velocidade de utilização de glicose em astrócitos é inibida pelo aumento na $[K^+]_e$, mas pode ser estimulada por veratridina ou monensina. Isto indica que a

atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em astrócitos pode ser estimulada via mecanismos que são dependentes do aumento na concentração de Na^+ intracelular.

Segundo Walls (2000), em astrócitos o ciclo de sódio transmembrana é dependente da enzima Na^+, K^+ -ATPase e do co-transporte $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$: K^+ é bombeado para o meio intracelular pela enzima Na^+, K^+ -ATPase, e o decréscimo da $[\text{Na}^+]_i$ é prevenido por um estímulo simultâneo do cotransportador $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$, sensível a bumetanide. Assim, íons Na^+ que são bombeados para o meio extracelular pela enzima Na^+, K^+ -ATPase são repostos por este carreador.

Kettenmann & Ransom (1995) mostraram que altas concentrações de potássio provocam aumento no volume de astrócitos e o co-transporte $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ acompanhado por água está presente neste evento. Quando este processo ocorre, a concentração de K^+ intracelular aumenta mais do que o esperado, e algum outro íon, talvez Na^+ , sai das células. Walz & Hertz (1983) mostraram que o conteúdo de Na^+ em culturas de astrócitos diminuiu quando a $[\text{K}^+]_e$ foi aumentada. Posteriormente, Rose & Ransom (1996) também mostraram que $[\text{Na}^+]_i$, medida por técnica de imagem fluorescente diminuiu em culturas de astrócitos de hipocampo quando a $[\text{K}^+]_e$ foi aumentada de 3 para 8 ou 12 mM.

Os resultados relatados por Takahashi, Shibata & Fukuuchi (1997) indicam que os canais de Na^+ voltagem-dependentes expressos em astrócitos e neurônios respondem diferentemente a condições em que a $[\text{K}^+]_e$ é aumentada, como por exemplo, excitação neuronal. Quando estas condições resultam na estimulação do metabolismo energético, a ativação metabólica nos dois tipos de células provavelmente é mediada por diferentes mecanismos.

Segundo Walz (2000), os astrócitos apresentam um potencial de membrana em repouso 20 mV mais negativo do que neurônios. Isto é devido, principalmente, à reduzida permeabilidade ao sódio dos astrócitos comparado aos neurônios. A maioria desses canais, mas não todos, poderia uma vez ativados por uma despolarização inicial devido ao excesso de potássio extracelular, contribuir com despolarização da membrana.

Takahashi et al. (1995) mostraram que a membrana de astrócitos pode ser despolarizada por aumento na $[\text{K}^+]_e$, mas a despolarização não está associada com potenciais de ação, como em neurônios, e pode, desta forma, não levar ao aumento da $[\text{Na}^+]_i$ em astrócitos. Uma explicação plausível é que os canais de Na^+ voltagem-dependentes de astrócitos podem ter uma baixa densidade ou propriedades diferentes dos neurônios.

Segundo Sontheimer (1992), os canais de K^+ voltagem-dependentes (tipo de canal de íon predominante na membrana dos astrócitos), participam no tamponamento espacial, isto é, a captação de K^+ extracelular em locais com elevada $[\text{K}^+]_e$ para locais com menor $[\text{K}^+]_e$. É

concebível que canais de Na^+ funcionem sem ativação voltagem-dependente. Mesmo em repouso, os canais de Na^+ permitem que uma pequena quantidade de íons Na^+ entrem no astrócito. Este mecanismo pode ser importante para prover Na^+ em concentração suficiente para permitir o funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase. Uma das principais funções da Na^+, K^+ -ATPase glial é a captação do K^+ extracelular durante o tamponamento espacial. Elevada $[\text{K}^+]_e$ poderia aumentar a quantidade de íons Na^+ que entram no astrócito através de canais de Na^+ , assim, a probabilidade destes canais serem abertos aumenta de acordo com o aumento da voltagem.

Silver, Deas & Erecinska (1997) relatam que há maior densidade de canais de Na^+ em neurônios, e assim, há maior influxo e efluxo deste íon em neurônios. Contudo, a manutenção do gradiente de íons consome energia, e a utilização de ATP para este propósito é maior em neurônios do que em células gliais.

As aplicações do método da ^{14}C Deoxiglicose para determinação da velocidade local de utilização de glicose em tecidos neurais tem estabelecido que a ativação funcional aumenta o metabolismo energético em regiões ativadas do SNC, e que o aumento no metabolismo energético é quantitativamente relacionado a magnitude da ativação funcional. O estímulo do metabolismo por ativação funcional é dependente da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, uma enzima da membrana plasmática celular responsável pela manutenção da homeostase de íons intracelulares e seus gradientes transmembrana (SILVER, DEAS & ERECINSKA, 1997).

Silver, Deas & Erecinska (1997) mostraram que a adição de 5 ou 10 mM de 2-Deoxiglicose em culturas de neurônios e astrócitos corticais de camundongos, na ausência de qualquer outro nutriente energético, causou um rápido decréscimo na $[\text{ATP}]$ a níveis próximos da metade do valor em relação ao controle (culturas de neurônios e astrócitos corticais incubadas com glicose) após 15 minutos de incubação. Simultaneamente, a $[\text{ADP}]$ aumentou cerca de duas vezes, a $[\text{PCr}]$ diminuiu, enquanto a $[\text{Cr}]$ aumentou. Além disso, Silver, Deas & Erecinska (1997), através de medições com microeletrodos da concentração de íons intracelulares de neurônios e astrócitos corticais de camundongos, evidenciaram que na ausência de glicose com e sem suplementação de piruvato, a $[\text{Na}^+]_i$ e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumentaram, enquanto a de $[\text{K}^+]_i$ diminuiu. Contudo, estas alterações mostraram maior velocidade e magnitude em neurônios do que em células gliais, a saber: o decréscimo no gradiente de íons em neurônios após 10 minutos de incubação é comparável às reduções observadas em astrócitos após 16 horas. Há, no mínimo, três possíveis razões para esta maior sensibilidade neuronal relatada por Silver, Deas & Erecinska (1997): a) canais para movimento de íons são mais abundantes em neurônios, porém a manutenção do gradiente de íons consome energia, e a utilização de ATP para este propósito é maior em neurônios do que em células gliais; b)

mecanismos que geram energia, em particular a glicólise, podem ser menos ativos em neurônios em cultura do que astrócitos. Assim, durante hipóxia, os neurônios geram e mantêm uma concentração intracelular menor de ATP; c) somente os astrócitos contêm glicogênio, o qual fornece principalmente lactato aos neurônios em situações de hipoglicemia.

Kimelberg et al. (1978) e Walz & Hertz (1982), colocam que a enzima Na^+, K^+ -ATPase é ativada por concentrações de potássio de 12-18 mM, visto que o K_m para K^+ em neurônios é 18 mM. Contudo, um grande aumento na $[\text{K}^+]_e$ exerce somente efeito moderado sobre a produção de energia. Brookes & Yarowsky (1985) mostraram que houve um aumento na captação de 2-Deoxiglicose de 35-40% quando $[\text{K}^+]_e$ aumentou de 14.2 para 20 mM, enquanto Peng, Zhang & Hertz (1994) evidenciaram um aumento de somente 20%, até mesmo em $[\text{K}^+]_e = 50\text{mM}$.

Mercer & Dunham (1981) investigaram o mecanismo pelo qual ATP é fornecido para a enzima Na^+, K^+ -ATPase, utilizando vesículas preparadas a partir de eritrócitos. Sugeriram então, que o mecanismo molecular do acoplamento de ativação da Na^+, K^+ -ATPase e glicólise, reside na associação entre Na^+, K^+ -ATPase e enzimas chaves da glicólise na membrana plasmática, implicando que ATP gerado glicoliticamente, especificamente pela ação da enzima Fosfoglicerato Kinase (PGK) é, preferencialmente, usado para atividade da bomba. As principais evidências deste trabalho foram:

- a) o transporte ativo de Na^+ para dentro das vesículas de eritrócitos foi promovido pela adição de substratos para Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) e PGK, e sem adição de ATP;
- b) o complexo GAPDH-PGK sintetiza ATP, o qual permanece associado à membrana;
- c) ATP ligado à membrana é compartimentalizado de forma que é inacessível a degradação por hexoquinase.

Provérbio & Hoffman (1977), em experimentos com eritrócitos, concluíram que ATP, que foi gerado glicoliticamente e retido no pool da membrana, forneceu a energia para a Na^+, K^+ -ATPase, preferencialmente do que $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP exógeno administrado.

Dringen, Gebhardt & Hamprecht (1993), buscando elucidar a função do glicogênio em culturas primárias de astrócitos, verificaram que além de glicose, os astrócitos também podem utilizar manose para a síntese de glicogênio e lactato. Uma incubação de 3 horas com manose (20mM) resultou em 75% de glicogênio sintetizado, 87% de lactato liberado, e 71% de glicose-6-fosfato quando comparado ao grupo controle (incubação de 3 horas com 20 mM de glicose). Estes resultados sugerem que astrócitos são incapazes de hidrolisar glicose-6-fosfato e/ou são incapazes de liberar a glicose que é gerada pela ação das enzimas desramificadoras

durante a degradação do glicogênio ou derivada a partir da glicose-6-fosfato pela ação de uma fosfatase. Assim, glicogênio armazenado em astrócitos pode ser considerado como um estoque de lactato, preferencialmente do que glicose.

A elevação na $[K^+]_e$ aumentou a oxidação de glicose, frutose e manose a CO_2 , em córtex cerebral de ratos adultos, e a velocidade de oxidação das hexoses incubadas manteve-se na faixa de 1000 pmoles/mg tecido.h. Provavelmente, isto se deve ao fato de que estes nutrientes têm frutose-6-P como intermediário comum na rota glicolítica, e a produção de ATP por enzimas desta rota estarem espacialmente associadas com a Na^+,K^+ -ATPase, como refere o trabalho de Mercer & Dunham (1981): “as enzimas glicolíticas ligadas à membrana sintetizam ATP e o depositam em um compartimento associado à membrana, a partir do qual o ATP é usado pela Na^+,K^+ -ATPase”. Além disso, em cérebro de ratos adultos, os transportadores de glicose GLUT 1 e GLUT 3, e as atividades das enzimas da via glicolítica e do ciclo de Krebs, envolvidas no metabolismo das hexoses glicose, manose e frutose, estão totalmente desenvolvidas nesta idade (WEBER et al., 2001; BOOTH, PATEL & CLARK, 1980). A ausência de frutoquinase no cérebro tem sido mostrada por Bergbauer et al (1996), o que indica que o metabolismo cerebral da frutose acontece através da hexoquinase. Da mesma forma em que ocorre o metabolismo da manose, que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, e é transportada pelo GLUT-1 (55 Kda), sendo que a concentração de manose no sangue é de 1,0 mg/100 ml. Depois de captada pela célula, manose é fosforilada por hexoquinase. O próximo passo no metabolismo da manose é a conversão de manose-6-fosfato à frutose-6-fosfato, um intermediário da glicólise. Para esta reação manose-6-fosfato isomerase é essencial (ZIGMOND et al., 1999). Weber et al. (2001) mostraram em estudo ontogênico do metabolismo de hexoses (glicose, manose, galactose e frutose) em córtex cerebral de ratos, que manose e glicose foram as hexoses mais oxidadas a CO_2 . No cérebro, a principal função da enzima manose-6-fosfato isomerase pode não ser a produção de energia a partir de manose, mas, preferencialmente, a produção de manose-6-fosfato a partir de glicose-6-fosfato, a qual pode ser utilizada para síntese de glicoproteínas e glicolipídios. Esta enzima pode também atuar transformando manose-6-fosfato a glicose-6-fosfato, reação essencial na catabolização de manose, derivada da degradação de glicoproteínas e glicolipídios cerebrais (DRINGEN et al., 1994).

Nossos resultados mostram que elevadas concentrações de K^+ extracelular aumentaram a conversão de glicose (Fig. 4.2.1) e lactato (Fig. 4.2.4) a lipídios somente em ratos de 10 dias de idade. A conversão de glicose a lipídios (Fig. 4.2.1) em ratos de 60 dias, foi cerca de duas vezes menor em relação a ratos de 10 dias de idade. Está bem estabelecido

que a síntese de lipídios é maior em ratos recém-nascidos em lactação, em relação a ratos adultos. Segundo Girard et al. (1992), o conteúdo de ácidos graxos do cérebro aumenta mais de quatro vezes no período que compreende o quinto dia pós-natal e a idade adulta. A capacidade para sintetizar lipídios a partir de glicose é baixa e um tanto inalterada durante todo o desenvolvimento pós-natal (YEH, STREULI & ZEE, 1977). Os corpos cetônicos são utilizados mais prontamente para a síntese de lipídios cerebrais do que glicose e lactato, especialmente em cérebro de ratos imaturos. Os corpos cetônicos têm papel importante na síntese dos principais lipídios cerebrais, dependente das necessidades do cérebro em crescimento e da mielinização (GIRARD et al., 1992).

A conversão de frutose (Fig. 4.2.2) a lipídios mostrou um resultado inverso à glicose e lactato: a conversão a lipídios em ratos de 60 dias foi cerca de duas vezes maior em relação a ratos de 10 dias de idade. Além disso, o aumento na $[K^+]_e$ não teve efeito significativo sobre a conversão de frutose a lipídios (Fig. 4.2.2) em ambas as idades. A conversão de manose a lipídios (Fig. 4.2.3) em ratos adultos não variou com o aumento na $[K^+]_e$. Observamos uma síntese muito baixa de lipídios a partir de manose em córtex cerebral de ratos adultos. Talvez o que explique este fato é a idade dos animais, na qual a síntese de lipídios e mielinização é mínima. Segundo Dringen et al. (1994), manose é utilizada por astrócitos na síntese de glicogênio, e lactato pode ser utilizado no metabolismo oxidativo de neurônios.

Os dados da literatura pertinente quanto ao efeito de elevadas $[K^+]_e$ sobre a captação de 2-Deoxiglicose em culturas de astrócitos são conflitantes (SOKOLOFF et al., 1996; PENG, JURLINK & HERTZ, 1996). Contudo, os dados sobre o estímulo da captação de 2-Deoxiglicose e a oxidação de glicose em neurônios não o são (SOKOLOFF et al., 1996; PENG, ZHANG & HERTZ, 1994; PELLERIN & MAGISTRETTI, 1994). O aumento da $[K^+]_e$ estimula estes parâmetros em neurônios. São raros os trabalhos que estudaram o efeito da $[K^+]_e$ sobre a utilização de nutrientes energéticos em fatias de estruturas do SNC. McDougal Jr., et al. (1997) estudaram a velocidade de captação de 2-Deoxiglicose em fatias de hipocampo de ratos adultos, incubadas em um meio contendo diferentes concentrações de glutamato (0, 5, 10, 15 e 20 mM) e K^+ (0, 25, 50, 75, 100 mM), separadamente. Os autores mostraram que em ambas incubações com glutamato (5 mM) e K^+ (25 mM), os níveis de fosfocreatina e ATP diminuíram rapidamente, enquanto os níveis de lactato aumentaram.

Em nosso trabalho não conseguimos mostrar a participação da Na^+,K^+ -ATPase no aumento da oxidação de glicose a CO_2 (Fig. 4.4.1), e na captação de 2-Deoxiglicose (Fig. 4.3.1) em córtex cerebral de ratos adultos, sobre o efeito de elevada $[K^+]_e$, pois a ouabaína na concentração de 1 mM não inibiu este processo. Também não conseguimos mostrar a partici-

pação do transportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ neste processo, pois bumetanide, na concentração de 10 μM , foi incapaz de modificar o aumento causado pela $[\text{K}^+]_e = 50 \text{ mM}$ na oxidação de glicose a CO_2 .

Levando em consideração o trabalho de Erecinska et al. (1996), mostrando que monensina na concentração de 10 μM ocasionou uma estimulação no metabolismo sinaptossomal que foi limitado pela hexoquinase, devido a uma diminuição acentuada na [ATP], realizamos uma curva de tempo para verificar o efeito da monensina sobre a velocidade de captação de 2-Deoxiglicose, em fatias de córtex cerebral de ratos adultos (Tabela 2). Verificamos que em uma hora de incubação no meio contendo: 2.7 mM K^+ + D-Glicose 2 mM + 0,1 μCi de 2-[U- ^{14}C]-Deoxiglicose + Monensina 10 μM , ocorreu uma inibição de 50% na velocidade de captação de 2-Deoxiglicose, em relação ao grupo controle. Porém, utilizando as mesmas condições e modificando o tempo de incubação para 10 minutos, a inibição na velocidade de captação de 2-Deoxiglicose foi de 28% em relação ao controle. Já na incubação realizada nas mesmas condições, porém com tempo de incubação de 5 minutos, não houve inibição ou estímulo na velocidade de captação de 2-Deoxiglicose, em relação ao controle. Quando o tempo de incubação foi reduzido para dois minutos, houve estímulo de 60% na velocidade de captação de 2-Deoxiglicose, em relação ao controle. Estes resultados mostram claramente que a elevação da $[\text{Na}^+]_i$ aumenta o metabolismo energético em fatias de córtex cerebral de ratos adultos, possivelmente devido ao aumento na $[\text{Na}^+]_i$ nos neurônios.

No momento não há explicação pertinente para o mecanismo através do qual o aumento da $[\text{K}^+]_e$ estimulou a oxidação de nutrientes energéticos por fatias de córtex cerebral de ratos adultos. Tampouco, temos explicação para a diferença do efeito da elevada $[\text{K}^+]_e$ na oxidação das hexoses entre córtex cerebral de ratos adultos e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal, pois a mesma era baseada na incapacidade da $\text{Na}^+,\text{K}^+-\text{ATPase}$ cerebral de ratos com idade inferior a 30 dias, de responder ao aumento da $[\text{K}^+]_e$.

Em função do exposto, pretendemos no futuro investigar a participação dos canais de Ca^{++} , o fator tempo de incubação associado ao efeito de elevadas concentrações de potássio sobre o metabolismo de nutrientes energéticos no SNC.

6 CONCLUSÕES

- A velocidade de oxidação a CO_2 de glicose, frutose e manose, manteve-se na faixa de 1000 pmoles/mg tecido.h, em córtex cerebral de ratos adultos. Provavelmente, isto se deve ao fato de que estes nutrientes têm frutose-6-P como intermediário comum na rota glicolítica, e a produção de ATP por enzimas desta rota estarem espacialmente associadas com a Na^+, K^+ ATPase. Além disso, em cérebro de ratos adultos, os transportadores de glicose GLUT 1 e GLUT 3, e as atividades das enzimas da via glicolítica e do ciclo de Krebs, envolvidas no metabolismo das hexoses glicose, manose e frutose, estão totalmente desenvolvidas nesta idade.
- No momento não há explicação pertinente para o mecanismo através do qual o aumento da $[\text{K}^+]_e$ estimulou a oxidação de nutrientes energéticos por fatias de córtex cerebral de ratos adultos. Tampouco temos explicação para a diferença do efeito da elevada $[\text{K}^+]_e$ na oxidação das hexoses entre córtex cerebral de ratos adultos e córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal, pois a mesma era baseada na incapacidade da Na^+, K^+ -ATPase cerebral de ratos com idade inferior a 30 dias, de responder ao aumento da $[\text{K}^+]_e$.
- Lactato, quando incubado como único substrato energético, foi em torno de 1,5 vez mais oxidado a CO_2 , em córtex cerebral de ratos de 10 dias, em relação à glicose, manose e frutose. Em córtex cerebral de ratos adultos, a oxidação de lactato foi cerca de 2,5 vezes maior em relação às três hexoses estudadas.
- Elevadas concentrações de K^+ extracelular aumentaram a conversão de glicose e lactato a lipídios somente em ratos de 10 dias de idade. A conversão de glicose a lipídios em córtex

cerebral de ratos de 60 dias, foi cerca de duas vezes menor em relação a ratos de 10 dias de idade. Provavelmente isto não é devido ao aumento na $[K^+]_e$, mas sim ao fato de que a síntese de lipídios é maior em ratos recém-nascidos em lactação, em relação a ratos adultos, visto que o conteúdo de ácidos graxos do cérebro aumenta mais de quatro vezes no período que compreende o quinto dia pós-natal e a idade adulta.

- A conversão de manose a lipídios em ratos adultos não variou com o aumento na $[K^+]_e$. Observamos uma síntese muito baixa de lipídios a partir de manose, em córtex cerebral de ratos adultos. Talvez o que explique este fato é a idade dos animais, na qual a síntese de lipídios e mielinização é mínima.
- Não houve participação da Na^+,K^+ -ATPase no aumento da oxidação de glicose a CO_2 , e na captação de 2-Deoxiglicose em córtex cerebral de ratos adultos, sobre o efeito de elevada $[K^+]_e$, pois a ouabaína na concentração de 1 mM não inibiu este processo.
- Não conseguimos mostrar a participação do transportador de $Na^+/K^+/2Cl^-$, pois bumetanide, na concentração de 10 μM , foi incapaz de modificar o aumento causado pela $[K^+]_e = 50$ mM na oxidação de glicose a CO_2 .
- Verificamos estímulo da monensina sobre a velocidade de captação de 2-Deoxiglicose em dois minutos de incubação, em um meio com 2.7 mM K^+ , quando comparado a um meio com 2.7 mM K^+ sem adição de monensina. Este resultado nos mostra claramente que a elevação da $[Na^+]_i$ aumenta o metabolismo energético em fatias de córtex cerebral de ratos adultos, possivelmente devido ao aumento na $[Na^+]_i$ nos neurônios.
- Em incubações com monensina + 2-Deoxiglicose, verificamos que diferentes tempos de incubação podem produzir diferentes resultados.

7 REFERÊNCIAS

- AMÉDÉE, T.; ROBERT A.; COLES, A.J. 1997. Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia*. 21: 46-55.
- BATAGLIA, F.C.; MESCHIA, G. 1978. Principal substrates of fetal metabolism. *Physiological Review*. 58: 941-945.
- BERGBAUER, K.; DRINGEN, R.; VEERLESDONK, S.; GEBHARDT, R.; HAMPRECHT, B.; WIESINGER, H. 1996. Studies on fructose metabolism in cultured astroglial cells and control hepatocytes: lack of fructokinase activity and immunoreactivity in astrocytes. *Developmental Neuroscience*. 18:371-379.
- BOOTH, R.F.G.; PATEL, T.B.; 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. of Neurochemistry*. 34(1):17-25.
- BRINES, M.L.; ROBBINS, R.J. 1993. Cell-type specific expression of Na⁺, K⁺-ATPase catalytic subunits in cultured neurons and glia: evidence for polarized distribution in neurons. *Brain Research*. 631:1-11.
- BROOKES, N.; YAROWSKY, P.J. 1985. Determinants of deoxyglucose uptake in cultured astrocytes: the role of the sodium pump. *J. of Neurochemistry*. 44:473-479.
- BUENO, D.; AZZOLIN, I.R.; PERRY, M.L.S. 1994. Ontogenetic study of glucose and lactate utilisation by rat cerebellum slices. *Med. Sci. Research*. 22:631-632.
- _____. Estudo ontogênico da utilização de nutrientes energéticos em cerebelo de ratos. Porto Alegre, 1999. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica UFRGS.
- CHAIN, E.B.; ROSE, S.P.R.; MAZSI, I.; POCCHIARI, F. 1969. Metabolism of hexoses in the rat cerebral cortex slices. *J. of Neurochemistry*. 16: 93-100.

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

CREMER, J. E. 1982. Substrate utilization and brain development. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2: 394-407.

_____; BRAUM, L.D.; OLDENDORF, W.H. 1976. Changes during development in transport processes of the blood-brain barrier. *Biochim. Biophys. Acta* 448:633-637.

_____; HEATH, D.F. 1974. The estimation of rates of utilization of glucose and ketone bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data. *Biochem. J.* 142:527-544.

_____; VINCENT, J.C.; PARDRIDGE, W.M.; BRAUN, L.D.; OLDENDORF, W.H. 1979. Kinetics of blood-brain barrier transport of pyruvate, lactate and glucose in suckling, weanling and adult rats. *J. of Neurochemistry*. 33:439-445.

DAVISON, A.N.; DOBBING, J. 1968. The developing brain. *Applied Neurochemistry*. Oxford, p.253-286.

DAWKINS, M.J.R. 1961. Changes in glucose-6-phosphatase activity in liver and kidney at birth. *Nature Lond.* 191: 72-73.

DIENEL, A.G.; HERTZ, L. 2001. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J. of Neuroscience Research*. 66: 824-838.

DRINGEN, R.; BERGBAUER, K.; WIESINGER, H.; HAMPRECHT, B. 1994. Utilization of mannose by astroglial cells. *Neurochemical Research*. 19:23-30.

_____; GEBHARDT, R.; HAMPRECHT, B. 1993. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Research*. 623:208-214.

DUNLOP, D.S.; VAN ELDEN, W.; LAJTHA, A. 1975. Optimal conditions for protein synthesis in incubated slices of brain rat. *Brain Research*. 99:303-318.

EDMOND, J.; AUESTAD, N.; ROBBINS, R.A.; BERGSTROM, J.D. 1985. Ketone body metabolism in the neonate: development and the effect of diet. *Federation Proceedings*. 44 (7) : 2359-2364.

ERECINSKA, M.; NELSON, D.; DEAS, J.; SILVER, I.A. 1996. Limitation of glycolysis by hexokinase in rat brain synaptosomes during intense ion pumping. *Brain Research*. 726:153-159.

_____; SILVER, I.A. 1994. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43:37-71.

ERIKSSON, G.; PETERSON, A.; IVERFELDT, K.; WALUM, E. 1995. Sodium-dependent glutamate uptake as an activator of oxidative metabolism in primary astrocyte cultures from newborn rat. *Glia*. 15:152-156.

FERRÉ, P.; PEGORIER, J.P.; WILLIAMSON, D.H.; GIRARD, J.R. 1979. Interactions in vivo between oxidation of non-esterified fatty acids and gluconeogenesis in the newborn rat. *Biochemistry J.* 182: 593-598.

FINK, D.; KNAPP, P.E.; MATA, M. 1996. Differential expression of Na,K-ATPase isoforms in oligodendrocytes and astrocytes. *Developmental Neuroscience.* 18:319-326.

FOLCH, J.; LEE, M.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. of Biological Chemistry.* Baltimore M.D., 226 : 497-509.

FULGSANG, A.; LOMHOLT, M.; GJEDDE, A. 1986. Blood-brain transfer of glucose and glucose analogs in newborn rats. *J. of Neurochemistry.* 46: 1417-1428.

GECK, P.; PIETRZYK, C.; BURCKHARDT, B.C.; PFEIFFER, B.; HEINZ, E. 1980. Electrically silent cotransport of Na, K and Cl in Ehrlich cells. *Biochim. Biophys. Acta* 600: 432-447.

GIRARD, J.; CUENDET, G.S.; MARLISS, E.B.; KERVRAN, A.; RIEUTORT, M.; ASSAN, R. 1973. Fuels, hormones and liver metabolism at term and during the early postnatal period in the rat. *J. Clin. Invest.* 52: 3190-3200.

_____; FERRÉ, P.; PÉGORIER, J.P.; DUÉE, P.H. 1992. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiological Reviews.* 72 (2): 507-562.

_____. 1986. Gluconeogenesis in late and early neonatal life. *Biol. Neonate.* 50: 237-258.

GJEDDE, A.; CRONE, C. 1975. Induction processes in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation. *Am. J. Physiol.* 229: 1165-1169.

GRIFFIN, J.L.; ERA, C.; RADDA, G.K.; MATTHEWS, P.M. 1999. Lactate-induced inhibition of glucose catabolism in guinea pig cortical brain slices. *Neurochemistry International.* 35:405-409.

GRISAR, T.; FRANCK, G. 1981. Effect of changing potassium ion concentrations on rat cerebral slices *in vitro*: a study during development. *J. of Neurochemistry.* 36 (5) : 1853-1857.

HAWKINS, R.A.; MILLER, A.L.; NIELSEN, R.C.; VEECH, R.L. 1973. The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. *Biochem. J.* 134 : 1001-1008.

HENNING, S.J.; CHANG, S.S.P.; GISEL, E.G. 1979. Ontogeny of feeding controls in suckling and weaning rats. *Am. J. Physiol.* 237: 187-191.

HERTZ, L.; PENG, L. 1992. Energy metabolism at the cellular level of the CNS. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70:S146-S157.

HUANG, R.; PENG, L.; CHEN, Y.; HAJEK, I.; ZHAO, Z.; HERTZ, L. 1994. Signalling effect of monoamines and of elevated potassium concentrations on brain energy metabolism at the cellular level. *Developmental Neuroscience.* 16: 337-351.

IDE, K.; SCHMALBRUCH, I.K.; QUISTORFF, B.; HORN, A.; SECHER, N.H. 2000. Lactate, glucose and O₂ uptake in human brain during recovery from maximal exercise. *J. Physiol.* 522: 159-164.

IZUMI, Y.; BENZ, A.; ZORUMSKI, C.F.; OLNEY, J.W. 1994. Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. *Neuroreport.* 5: 617-620.

KETTENMANN, H.; RANSOM, B.R. 1995. *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, 1079 p.

KIMELBERG, H.K.; BIDDECOME, S.; NARUMI, S.; BOURKE, R.S. 1978. ATPase and carbonic anhydrase activities of bulk-isolated neuron, astroglia and synaptosome fractions from rat brain. *Brain Research.* 141:305-323.

KNAPP, P.E.; ITKIS, O.S.; MATA, M. 2000. Neuronal interaction determines the expression of the α -2 isoform of Na, K-ATPase in oligodendrocytes. *Developmental Brain Research.* 125 : 89-97.

KORF, J. 1996. Intracerebral trafficking of lactate in vivo during stress, exercise, electroconvulsive shock and ischemia as studied with microdialysis. *Developmental Neuroscience.* 18 : 405-414.

LAND, J.M. 1994. Hypoglycaemia in the neonate: how and when is it important? *Developmental Neuroscience.* 16 : 307-312.

LARRABEE, M.G. 1996. Partitioning of CO₂ production between glucose and lactate in excised sympathetic ganglia, with implications for brain. *J. of Neurochemistry.* 67 : 1726-1734.

LEE, J.M.; GRABB, M.C.; ZIPFEL, G.J.; CHOI, D.W. 2000. Brain tissue responses to ischemia. *The J. of Clinical Investigation.* 106 (6) : 723-731.

LEVITSKY, L.L.; FISHER, D.E.; PATON, J.B.; DELANNOY, C.W. 1977. Fasting plasma levels of glucose, acetoacetate, D- β -hydroxybutyrate, glycerol, and lactate in the baboon infant: correlation with cerebral uptake of substrates and oxygen. *Pediat. Research.* 11: 298-302.

LOWRY, O.H.; PASSONNEAU, J.V. 1964. The relationships between substrates and enzymes of glycolysis in brain. *J. Biol. Chem.* 239 : 31-42.

_____; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. 1996. Pathways for the Interconversion of Sugars Section V Carbohydrate Metabolism p. 445-456. In: *Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach*. Ed. Lippincott Williams & Wilkins.

MATA, M.; FINCK, D.J.; GAINER, H.; SMITH, C.B.; DAVIDSEN, L.; SAVAKI, H.; SCHWARTZ, W.J.; SOKOLOFF, L. 1980. Activity-dependent energy metabolism in rat posterior pituitary primarily reflects sodium pump activity. *J. of Neurochemistry.* 34: 213-215.

McDOUGAL Jr., D.B.; COWSETTE, B.R.; PUSATERI, M.E.; CARTER, J.G.; MANCHESTER, J.K.; CHI, M.M.Y.; LOWRY, O.H. 1997. Glutamate and potassium stimulation of hippocampal slices metabolizing glucose or glucose and pyruvate. *Brain Research*. 755: 304-312.

McKENNA, M.C.; BEZOLD, L.I.; KIMATIAN, S.J.; TILDON, J.T. 1986. Competition of glycerol with other oxidizable substrates in rat brain. *Biochem. J.* 237:47-51.

_____; SONNEWALD, U.; HUANG, X.; STEVENSON, J.; ZIELKE, H.R. 1996. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. of Neurochemistry*. 66 (1) : 386-393.

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

_____. 1956. Electrical influences and speed of chemical change in the brain. *Physiological Review*. 36:355-375.

MERCER, R.W.; DUNHAM, P.B. 1981. Membrane-bound ATP fuels the Na/K pump: studies on membrane-bound glycolytic enzymes on inside-out vesicles from human red cell membranes. *J. Gen. Physiol.* 78:547-568.

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

NEHLIG, A.; VASCONCELOS, A.P. 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Progress in Neurobiology*. 40 : 163-221.

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

OWEN, O.E.; MORGAN, A.P.; KEMP, H.G.; SULLIVAN, J.M.; HERRERA, M.G.; CAHILL, G.F. Jr. 1967. Brain metabolism during fasting. *The J. of Clinical Investigation*. 46 (10) : 1589-1595.

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

PÉGORIER, J.P.; LETURQUE, A.; FERRÉ, P.; TURLAN, P.; GIRARD, J. 1983. Effects of medium chain triglyceride feeding on glucose homeostasis in newborn rat. *Am. J. Physiol.* 244 : 329-334.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Neurobiology*. 91 : 10625-10629.

PENG, L.; JURLINK, B.H.J.; HERTZ, L. 1996. Pharmacological and developmental evidence that the potassium-induced stimulation of deoxyglucose uptake in astrocytes is a metabolic manifestation of increased Na^+ - K^+ ATPase activity. *Developmental Neuroscience*. 18 : 353-359.

_____; ZHANG, X.; HERTZ L. 1994. High extracellular potassium concentrations stimulate oxidative metabolism in a glutamatergic neuronal culture and glycolysis in cultured astrocytes but have no stimulatory effect in a GABAergic neuronal culture. *Brain Research*. 663 : 168-172.

PFEUFFER, J.; TKAC, I.; GRUETTER, R. 2000. Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed noninvasively by diffusion-weighted ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20: 736-746.

PROVERBIO, F.; HOFFMANN J.F. 1977. Membrane compartmentalized ATP and its preferential use by the Na^+ , K^+ -ATPase of human red cell ghosts. *J. Gen. Physiol.* 69 : 605-632.

ROEDER, L.M.; TILDON, J.T.; STEVENSON, J.H. 1984. Competition among oxidizable substrates in brains of young and adult rats. *Biochem. J.* 219 : 125-130.

ROSE, C.R.; RANSOM, B.R. 1996. Intracellular sodium homeostasis in rat hippocampal astrocytes. *J. Physiol.* 491 (2): 291-305.

ROTTA, L.N.; VALLE, S.C.; SCHWEIGERT, I.; RICARDI, L.D.; FERRONATTO, M.E.; SILVA, L. da; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.S. 2002. Utilization of energy nutrients by cerebellar slices. *Neurochemical Research*. 27(3): 201-206.

SAMSON, F.E.; QUINN, D.J. 1967. Na^+ - K^+ - activated ATPase in rat brain development. *J. of Neurochemistry*. 14: 421-427.

SCHURR, A.; MILLER, J.J.; PAYNE, R.S.; RIGOR, B.M. 1999. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *The J. of Neuroscience*. 19(1):34-39.

_____; WEST, C.A.; RIGOR, B.M. 1989. Electrophysiology of energy metabolism and neuronal function in the hippocampal slice preparation. *J. Neuroscience Methods*. 28 : 7-13.

_____; WEST, C.A.; RIGOR, B.M. 1988. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science*. 240: 1326-1328.

SIBSON, N.R.; DHANKHAR, A.; MASON G.F.; ROTHMAN, D.L.; BEHAR, K.L.; SHULMAN, R.G. 1998. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:316-321.

SIESJÖ, B.K. 1978. Brain energy metabolism. New York: John Wiley & Sons. 607 p.

SILVER, I.A.; ERECINSKA, M. 1997. Energetic demands of the Na^+ , K^+ -ATPase in mammalian astrocytes. *Glia*.21:35-45.

_____; DEAS, J.; ERECINSKA, M. 1997. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*. 78 (2): 589-601.

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

_____. 1994. Sites and mechanisms of function-related changes in energy metabolism in the nervous system. *Developmental Neuroscience.* 15: 194-206.

_____; TAKAHASHI, S.; GOTOH, J.; DRISCOLL, B.F.; LAW, M.J. 1996. Contribution of astroglia to functionally activated energy metabolism. *Developmental Neuroscience.* 18:343-352.

SONNENWALD, U.; WESTERGAARD, N.; PETERSEN, S.B.; UNSGARD, G. and SCHOUSBOE, A. 1993. Metabolism of [U-¹³C]glutamate in astrocytes by ¹³C NMR spectroscopy: Incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the TCA cycle. *J. of Neurochemistry.* 61:1179-1182.

SONTHEIMER, H. 1992. Astrocytes, as well as neurons, express a diversity of ion channels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: S 223- S 238.

TABERNERO, A.; VICARIO, C.; MEDINA, J.M. 1996. Lactate spares glucose as a metabolic fuel in neurons and astrocytes from primary culture. *Neuroscience Research.* 26 : 369-376.

TAKAHASHI, S.; DRISCOLL, B.F.; LAW, M.J.; SOKOLOFF, L. 1995. Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 : 4616-4620.

_____; SHIBATA, M.; FUKUUCHI, Y. 1997. Effects of increased extracellular potassium on influx of sodium ions in cultured rat astroglia and neurons. *Developmental Brain Research.* 104 : 111-117.

VICARIO, C.; ARIZMENDI, C.; MALLOCH, G.; CLARK, J.B.; MEDINA, J.M. 1991. Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain. *J. of Neurochemistry.* 57 (5):1700-1707.

VICARIO, C.; MEDINA, J.M. 1992. Metabolism of lactate in the rat brain during the early neonatal period. *J. of Neurochemistry.* 59(1): 32-40.

WADA, H.; OKADA, Y.; UZUO, T.; NAKAMURA, H. 1998. The effects of glucose, mannose, fructose and lactate on the preservation of neural activity in the hippocampal slices from the guinea pig. *Brain Research.* 788:144-150.

WALZ, W. 1991. Role of Na/K/Cl cotransport in astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70 : S260-S262.

_____. 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochemistry International.* 36: 291-300.

_____; HERTZ, L. 1982. Ouabain-sensitive and ouabain-resistant net uptake of potassium into astrocytes and neurons in primary cultures. *J. of Neurochemistry.* 39:70-77.

_____; _____. 1983. Intracellular ion changes of astrocytes in response to extracellular potassium. *J. Neuroscience Research*. 10: 411-423.

_____; HINKS, E.C. 1985. Carrier-mediated KCl accumulation accompanied by water movements is involved in the control of physiological K⁺ levels by astrocytes. *Brain Research*. 343: 44-51.

_____; _____. 1986. A transmembrane sodium cycle in astrocytes. *Brain Research*. 368 : 226-232.

_____; MUKERJI, S. 1988. KCl movements during potassium induced cytotoxic swelling of cultures astrocytes. *Exp. Neurol*. 99: 17-29.

WEBER, M.H.; OLIVEIRA, K.R.; VALLE, S.C.; SCHWEIGERT, I.D.; ROTTA, L.N.; FAGUNDES, I.; KRÜGER, A.H.; SOUZA K.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.S. 2001. Study of developmental changes on hexoses metabolism in rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*. 26 (2) : 161-166.

WELLS, M.A. 1985. Fatty acid metabolism and ketone formation in the suckling rat. *Federation Proceedings*. 44 (7) : 2365-2368.

WILLIAMSON, D.H. 1985. Ketone body Metabolism during development. *Federation Proceedings*. 44 (7) : 2342-2346.

YEH, Y.Y.; SHEEHAN, P.M. 1985. Preferential utilization of ketone bodies in the brain and lung of newborn rats. *Federation Proceedings*. 44 (7) : 2352-2358.

_____; STREULI, V.L.; ZEE, P. 1977. Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rat. *Lipids*. 12: 957-964.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIES, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. 1999. Brain Energy Metabolism. In: *Fundamental Neuroscience*. Ed Academic Press. Chapter 14:389-409.