

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

**Efeito da Desidroepiandrosterona (DHEA) sobre  
diferentes estruturas do Sistema Nervoso e sobre Músculo  
Esquelético de Ratos**

DANIELLE KAISER DE SOUZA

Porto Alegre  
2008

**Efeito da Desidroepiandrosterona (DHEA) sobre  
diferentes estruturas do Sistema Nervoso e sobre Músculo  
Esquelético de Ratos**

DANIELLE KAISER DE SOUZA

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

Orientador: Prof<sup>o</sup> Luiz Carlos Kucharski  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Maria Flávia Marques Ribeiro

Porto Alegre  
2008

## **DEDICATÓRIA**

A Deus por todas as possibilidades de crescimento pessoal e à minha mãe pelo apoio incondicional e estímulo que me deram em todos os momentos de realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por todo o suporte e pela minha saúde e também a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Também agradeço a minha mãe por toda a paciência e ensinamentos dados por todo esse período.

Agradeço a todos os professores, com especial consideração ao professor Luiz pela amizade, confiança, incentivo e orientações que serviram como fundamento para minha formação pessoal e profissional. Obrigada por esses cinco anos de convivência, trabalho e apoio! E a professora Maria Flávia pelo suporte, consideração e orientações que servirão, com certeza, de base para o meu amadurecimento profissional.

Agradeço também a todas as pessoas do laboratório: mestrandos, doutorados e bolsistas de iniciação científica que participaram da realização deste trabalho. Porém não citarei nomes para não ser injusta com a grande contribuição de cada um, pois sem a ajuda de todos, não teria conseguido realizá-lo.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

A glicose é o principal substrato energético do encéfalo *in vivo*. A maior parte é oxidada gerando 38 ATPs, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água. Existem diferenças entre regiões do Sistema Nervoso (SN) na captação de glicose *in vivo* e na expressão de enzimas metabólicas. Evidências demonstram que astrócitos captam este substrato, sintetizam lactato a partir dele, e liberam este último para que possa ser utilizado pelos neurônios. O lactato é o substrato preferencial do SN *in vitro*. O músculo esquelético pode consumir tanto glicose como corpos cetônicos e ácidos graxos; o consumo preferencial de um deles depende apenas da intensidade da atividade física. A Desidroepiandrosterona (DHEA) é um hormônio esteróide relacionado ao aumento da sensibilidade periférica à insulina e melhora da captação de glicose, atuando sobre músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, principalmente. A DHEA é sintetizada e atua no SN, sendo chamada de neuroesteróide. Ela é capaz de regular a síntese de IGF-1 de maneira tecido-específica, além de possuir efeitos apoptóticos/ anti-proliferativos ou protetores, dependendo da dose utilizada. A presença de substrato oxidável no meio de incubação inibe seus efeitos anti-proliferativos. Também atua em receptores de membrana (GABA<sub>A</sub>, NMDA), na liberação de neurotransmissores (acetilcolina, glutamato) e inibindo enzimas da cadeia respiratória. Foram determinadas as diferenças basais na captação e oxidação de glicose na presença de lactato entre as diferentes estruturas do SN (córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, hipotálamo e bulbo olfatório), e também a influência da DHEA (10<sup>-8</sup> ou 10<sup>-12</sup>M) sobre a captação e oxidação de glicose nestas estruturas (na presença e ausência de lactato) e sobre o músculo esquelético. A presença de lactato estimulou a captação de glicose (2-<sup>14</sup>C-DG) no hipotálamo e bulbo, inibiu no córtex e cerebelo e não exerceu efeito no hipocampo. A oxidação de <sup>14</sup>C-glicose em córtex e hipotálamo, na presença de lactato, foi 6,6 vezes menor quando comparada à oxidação de <sup>14</sup>C-lactato. A DHEA não exerceu efeito sobre a captação de glicose em cerebelo, hipocampo e hipotálamo. No córtex

cerebral DHEA  $10^{-8}$ M aumentou a captação na presença de lactato e, no bulbo olfatório, a mesma dose elevou a captação de glicose, porém na ausência de lactato. No músculo, DHEA  $10^{-8}$ M inibiu a captação de glicose. DHEA não exerceu efeito significativo sobre a oxidação das diferentes estruturas do SN. No hipotálamo e bulbo olfatório o lactato estimulou a captação de 2- $^{14}$ C-DG; talvez nestas estruturas as necessidades metabólicas sejam essencialmente supridas pela glicose. O córtex cerebral e o cerebelo parecem utilizar principalmente lactato como substrato. O hipocampo foi mais sensível à utilização da glicose do que ao lactato. A DHEA não exerceu efeito sobre cerebelo, hipocampo e hipotálamo, possivelmente porque esse neuroesteróide não é metabolizado a outros esteróides de maneira efetiva ou então a esteróides que não atuam sobre a captação de glicose. No córtex cerebral a DHEA pode estimular a liberação de glutamato *in vitro* e, assim, estimular a captação de 2- $^{14}$ C-DG principalmente por astrócitos, mesmo na presença de lactato. No bulbo olfatório, a presença de lactato pode suprir as necessidades do tecido, porém a DHEA, que inibe a glicose-6-fosfato desidrogenase (enzima expressa em grandes concentrações neste local), pode aumentar a captação de 2- $^{14}$ C-DG na ausência de substrato oxidativo. No músculo esquelético, a DHEA em baixas concentrações talvez iniba a captação de glicose atuando sobre proteínas da cascata de sinalização da insulina, mesmo não atuando na oxidação.

## ABSTRACT

The glucose is the main energetic substrate in the brain. Most of it is oxidized generating 38 ATPs, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and water. There are differences between regions Nervous System (NS) in the glucose uptake and in the expression of metabolic enzymes. Evidences show that astrocytes uptake this substrate, synthesize lactate from it, and release this substrate for neurons metabolism. The lactate is the preferential substrate of NS *in vitro*. The skeletal muscle may consume glucose and fatty acids, the preferential consumption depends on the intensity of physical activity. The Desidroepiandrosterona (DHEA) is a sexual hormone related to increased peripheral sensitivity to insulin and improves the glucose uptake, acting on skeletal muscle, liver and adipose tissue. The DHEA is synthesized and acts on the NS and is called neurosteroid. It is able to regulate the IGF-1 synthesis a tissue-specific way, and have apoptotic effects / anti-proliferative or protective, depending on the dose used. The presence of oxidative substrate in incubation medium, inhibits their anti-proliferative effects. It also acts on membrane receptors (GABA<sub>A</sub>, NMDA), the release of neurotransmitter (acetylcholine, glutamate) and inhibiting enzymes of respiratory chain. It was investigated the differences in the basal uptake and oxidation of glucose in the presence of lactate between the different structures of NS (cerebral cortex, hippocampus, cerebellum, hypothalamus and olfactory bulb), and also the influence of DHEA (10<sup>-8</sup> or 10<sup>-12</sup> M) on these structures (in the presence and absence of lactate) and the skeletal muscle. The presence of lactate stimulated glucose uptake (2-<sup>14</sup>C-DG) in the hypothalamus and bulb, inhibited in the cortex and cerebellum and had no effect in the hippocampus. The <sup>14</sup>C-glucose oxidation in cortex and hypothalamus, in the presence of lactate, was 6.6 times lower when compared to the <sup>14</sup>C-lactate oxidation. The DHEA had no effect on cerebellum, hippocampus and hypothalamus. In the cortex DHEA 10<sup>-8</sup> M increased the uptake in the presence of lactate,

and in the olfactory bulb, the same dose increased the glucose uptake, but in the absence of lactate. DHEA  $10^{-8}$  M inhibited the glucose uptake in muscle. DHEA has no effect on the oxidation of the several structures of NS. In the hypothalamus and the olfactory bulb lactate stimulated uptake of  $2\text{-}^{14}\text{C}\text{-DG}$ ; perhaps in these structures the metabolic supply are done mainly by glucose. The cortex and cerebellum seem to use mainly lactate as substrate. The hippocampus, according evidence was more sensitive to the use of glucose than lactate. The DHEA had no effect on cerebellum, hippocampus and hypothalamus, possibly because this neurosteroid is not metabolized into other steroids or the steroids that do not act on the uptake of glucose. In the cerebral cortex DHEA can stimulate the release of glutamate *in vitro* and thereby stimulate the uptake of  $2\text{-}^{14}\text{C}\text{-DG}$  by astrocytes, even in the presence of lactate. In olfactory bulb, the presence of lactate can supply the needs of the tissue, but the DHEA, which inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase (enzyme expressed in high concentrations on this site), soon may increase the  $2\text{-}^{14}\text{C}\text{-DG}$  uptake in absence of oxidative substrate. In muscle, DHEA in low concentrations may inhibit the glucose uptake acting on proteins in the signalling cascade of insulin, and not acting in oxidation.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	5	
ABSTRACT.....	7	
LISTA DE FIGURAS.....	11	
LISTA DE TABELAS.....	13	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14	
1. INTRODUÇÃO		
1.1 Metabolismo Energético do Sistema Nervoso.....	16	
1.2 Metabolismo Energético do Músculo Esquelético.....	25	
1.3 Desidroepiandrosterona (DHEA).....	27	
2. OBJETIVOS		
2.1 Objetivos gerais.....	42	
2.2 Objetivos específicos.....	42	
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....		43
3.1 Preparação do Hormônio.....	43	
3.2 Captação de 2-Deoxi-D-1- <sup>14</sup> C-Glicose.....	44	
3.3 Oxidação de <sup>14</sup> C-lactato ou <sup>14</sup> C-glicose.....	45	
3.4 Tratamento Estatístico.....	46	
4. RESULTADOS		
4.1 Determinação do tempo de incubação.....	48	
4.2 Efeito da presença ou ausência de lactato sobre a captação de 2- <sup>14</sup> C-DG entre as diferentes estruturas do sistema nervoso em meio controle.....	49	
4.3 Ação da DHEA sobre a captação de 2- <sup>14</sup> C-DG no sistema nervoso.....	52	
4.4 Ação da DHEA sobre a captação de 2- <sup>14</sup> C-DG no músculo esquelético.....	56	

4.5 Oxidação de substratos radioativos ( $^{14}\text{C}$ -glicose ou $^{14}\text{C}$ -lactato) pelo sistema servoso em meio controle.....	57
4.6 Efeito da DHEA sobre a oxidação de $^{14}\text{C}$ -lactato no sistema nervoso.....	59
4.7 Efeito da DHEA sobre a oxidação de $^{14}\text{C}$ -glicose no músculo esquelético.....	61
5. DISCUSSÃO.....	62
6. PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Suprimento energético durante ativação neuronal glutamatérgica.

Figura 2: Metabolização da DHEA no sistema nervoso.

Figura 3: Curva de captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença ou ausência de lactato, para determinar o tempo de incubação (na presença de β-ciclodextrina).

Figura 4: Captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na ausência de lactato, entre diferentes estruturas do sistema nervoso em meio controle (contendo β-ciclodextrina 10<sup>-6</sup>M)

Figura 5: Captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença de lactato 10mM, entre diferentes estruturas do sistema nervoso em meio controle (contendo β-ciclodextrina 10<sup>-6</sup>M)

Figura 6: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* (10<sup>-8</sup> e 10<sup>-12</sup>M) versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina) sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença e ausência de 10 mM de lactato, por cerebelo.

Figura 7: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* (10<sup>-8</sup> e 10<sup>-12</sup>M) versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina) sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença e ausência de 10 mM de lactato, por hipocampo.

Figura 8: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* (10<sup>-8</sup> e 10<sup>-12</sup>M) versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina) sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença e ausência de 10 mM de lactato, por hipotálamo.

Figura 9: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* (10<sup>-8</sup> e 10<sup>-12</sup>M) versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina) sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença e ausência de 10 mM de lactato, por córtex cerebral.

Figura 10: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* (10<sup>-8</sup> e 10<sup>-12</sup>M) versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina) sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença e ausência de 10 mM de lactato, por bulbo olfatório.

Figura 11: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* (10<sup>-8</sup> e 10<sup>-12</sup>M) versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina) sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG por músculo esquelético.

Figura 12: Formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de <sup>14</sup>Cglicose (+ 10mM lactato + 5mM glicose) ou <sup>14</sup>C-lactato (+ 10mM lactato) por hipotálamo em meio controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina)

Figura 13: Formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de <sup>14</sup>Cglicose (+ 10mM lactato + 5mM glicose) ou <sup>14</sup>C-lactato (+ 10mM lactato) por córtex cerebral em meio controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina)

Figura 14: Efeito da DHEA  $10^{-8}$ M sobre a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -lactato por hipotálamo versus controle (CTR, contendo  $10^{-6}$ M de  $\beta$ -ciclodextrina)

Figura 15: Efeito da DHEA  $10^{-8}$ M sobre a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -lactato por córtex cerebral versus controle (CTR, contendo  $10^{-6}$ M de  $\beta$ -ciclodextrina).

Figura 16: Efeito da DHEA  $10^{-8}$ M sobre a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir do substrato radioativo  $^{14}\text{C}$ -glicose por músculo esquelético

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de DHEA e DHEAS encontrada no encéfalo e plasma de ratos machos.

Tabela 2: Composição dos meios de incubação utilizados nos experimentos de captação de 2-deoxi-1-<sup>14</sup>C-Glicose.

Tabela 3: Comparação dos valores de captação de 2-<sup>14</sup>C-DG entre incubações realizadas na presença e ausência de lactato em meio controle.

## LISTA DE ABREVIATURAS

17 $\beta$ -HSD - 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase

2-<sup>14</sup>C-DG - 2-Deoxi-1-<sup>14</sup>C-Glicose

3 $\beta$ -HSD - 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

ATP – adenosina trifosfato

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DHEA – desidroepiandrosterona

DHEAS – desidroepiandrosterona sulfatada

GABA – ácido gama-aminobutírico

GABA<sub>A</sub> – receptor<sub>A</sub> de ácido gama-aminobutírico

GLUT – transportador facilitado de glicose

GSK-3 $\beta$  – glicogênio sintase cinase-3 $\beta$

IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-1

IRS - Substrato de Receptor de Insulina

LDH – lactato desidrogenase

M – molaridade

Na<sup>+</sup> - sódio

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

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido

NADP<sup>+</sup> - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidado

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido

NMDA – N-metil-D-aspartato

NVM – Núcleo Ventromedial

O<sub>2</sub> – Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - superóxido

PEPCK – fosfoenolpiruvato carboxicinas

PI-3K - Fosfatidilinositol-3 cinase

PKB - Proteína Cinase B

PKC – proteína cinase C

PPAR – receptor ativador de proliferação de peroxissomos

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

UCP – proteína desacopladora

VIP – Peptídeo Vasoativo Intestinal

ST – sulfotransferase

SF – sulfatase

5 $\alpha$ -R - 5 $\alpha$ -Redutase

DHT - diidrotestosterona

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 METABOLISMO ENERGÉTICO DO SISTEMA NERVOSO**

Há mais de um século estuda-se a existência de um acoplamento intrínseco entre atividade neural e fluxo sanguíneo: mudanças na atividade de determinado grupo de neurônios promove um aumento no fluxo sanguíneo direcionado à região ativada, de maneira temporal e espacialmente coordenada. Este é o princípio das técnicas de imagem que visam o estudo de circuitos neurais específicos. Este aumento no fluxo também implica no aumento da utilização de glicose e consumo de oxigênio, ou seja, no gasto energético encefálico (MAGISTRETTI, 1999; MAGISTRETTI & PELLERIN, 1999; YANG & IADECOLA, 1998).

O encéfalo humano corresponde a apenas 2% do peso corporal e contribui com aproximadamente 25% do consumo corporal de glicose. A glicose é o principal substrato energético do encéfalo, pois o coeficiente respiratório deste tecido é  $\sim 1,0$ , o que indica consumo preferencial de carboidratos para a geração de energia (MAGISTRETTI, 1999).

Durante o exercício extenuante, há grande produção de lactato pelos músculos, elevando a concentração sérica deste metabólito. Durante este tipo de atividade física, parece haver diminuição no consumo de glicose e aumento concomitante no consumo de lactato sérico como substrato metabólico pelo sistema nervoso central (SNC) (SECHER & QUISTORFF, 2005). Logo após o nascimento, o lactato e os corpos cetônicos parecem ser substratos energéticos mais importantes do que a glicose. Estes dois substratos também são importantes no jejum prolongado, na diabetes e na hipoglicemia (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004; FERNÁNDEZ & MEDINA, 1986).

A glicose captada pode seguir diversas rotas metabólicas, sendo que a maior parte é convertida a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e água, através da glicólise, ciclo de Krebs e



fosforilação oxidativa (MAGISTRETTI, 1999; CLARKE & SOKOLOFF, 1999). A glicólise é o metabolismo da glicose a piruvato. Isto resulta em apenas dois ATPs por molécula de glicose. Sob condições anaeróbias, o piruvato é convertido a lactato, através da enzima lactato desidrogenase (LDH), levando à regeneração da nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado ( $\text{NAD}^+$ ) à sua forma reduzida (NADH), permitindo o fluxo da rota glicolítica. Sob condições aeróbias, o piruvato é oxidado a acetil-CoA, que entra no ciclo de Krebs, onde gera duas moléculas de  $\text{CO}_2$ . Neste ciclo há liberação de elétrons de seus intermediários, que ao serem transferidos à cadeia respiratória, formam entre 29 e 32 ATPs por molécula de glicose oxidada (MAGISTRETTI, 1999; NELSON & COX, 2005).

A glicose também pode ser metabolizada pela via pentose fosfato, porém sob condições basais, apenas 5% segue essa via. A enzima limitante é a glicose-6-fosfato desidrogenase, e através desta rota sintetiza-se ribulose-5-fosfato (necessária para síntese de nucleotídeos) e leva a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada ( $\text{NADP}^+$ ) à sua forma reduzida (NADPH) (DRINGEN *et al.*, 2006; MAGISTRETTI, 1999). Com o aumento do estresse oxidativo, a necessidade de NADPH aumenta, pois este co-fator atua na detoxificação de radicais livres. Este co-fator também participa da síntese lipídica (mielinização neuronal), formação de óxido nítrico, hidroxilação de neuroesteróides e metabolização de neurotransmissores (DRINGEN *et al.*, 2006).

Segundo Tsacopoulos & Magistretti (1996), histologicamente há uma relação estreita entre capilares, astrócitos e neurônios. Prolongamentos astrocitários envolvem os capilares, sendo a primeira etapa da entrada de glicose da circulação para o interstício. Também circundam as sinapses, participando ativamente na recaptação de neurotransmissores e de íons, e suprindo os neurônios com substratos metabólicos para a síntese de neurotransmissores e de adenosina trifosfato (ATP) (MAGISTRETTI & PELLERIN, 1999).

Há vários tipos de neurônios, com tamanhos e perfis de potencial de ação diferentes, e a número de células gliais também varia de região para região. Isto implica em demandas energéticas específicas (MAGISTRETTI, 1999), porém, pouco compreendidas. Os astrócitos possuem grande capacidade glicolítica, portanto, locais onde há maior proporção deste tipo celular, pode representar regiões de grande consumo de glicose (PIERRE & PELLERIN, 2005).

Além disso, as células que são ricas na isoforma da LDH-5 são mais glicolíticas, enquanto as que possuem grande concentração da LDH-1, mais oxidativas, pois a primeira isoforma possui grande capacidade de converter piruvato em lactato, e a última, catalisa a reação no sentido contrário (LAUGHTON et al., 2000). A LDH-5 é encontrada principalmente em astrócitos e a LDH-1 em neurônios (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004).

Borowsky & Collins (1989) propõem que existam áreas do sistema nervoso que são mais oxidativas e outras predominantemente glicolíticas, pela mensuração da atividade das enzimas LDH e citocromo oxidase (enzima da cadeia respiratória). As áreas que possuem grande atividade das duas enzimas correspondem aos terminais sinápticos. Córtex cerebral, hipocampo e cerebelo possuem grande expressão da LDH-1, bem como da enzima citocromo oxidase, indicando um perfil predominantemente oxidativo destas regiões (LAUGHTON et al., 2000).

Também existem diferenças na captação de glicose *in vivo* entre as regiões do sistema nervoso (SN). As estruturas que fazem parte da substância cinzenta têm, em geral, valores de utilização de glicose maiores do que regiões da substância branca (CLARKE & SOKOLOFF, 1999). Esta variação deve-se ao fluxo sanguíneo basal de cada estrutura e de suas necessidades intrínsecas. As regiões ricamente capilarizadas consomem grandes quantidades de glicose (BOROWSKY & COLLINS, 1989).

Porém, durante a ativação de uma via neural, o fluxo sanguíneo e o consumo de glicose aumentam consideravelmente. A 2-Deoxi-1-<sup>14</sup>C-Glicose (2-<sup>14</sup>C-DG) é uma molécula radioativa muito utilizada em experimentos *in vitro* por ser captada preferencialmente por transportadores de glicose (GLUT) e não ser totalmente metabolizada pela célula, facilitando o estudo desse transporte (MAGISTRETTI, 1999). Segundo Coopersmith & Leon (1995), a 2-<sup>14</sup>C-DG também poderia ser utilizada na síntese de glicogênio, principalmente por astrócitos, porém esta via parece ter menor importância.

A manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática é o principal processo consumidor de energia no encéfalo. Somente a bomba Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase consome 50% da energia produzida em todo o sistema nervoso (MAGISTRETTI, 1999). Aproximadamente 81% do gasto energético do encéfalo é utilizado no sinal neuronal excitatório. Quando esta estimativa é feita em nível celular, não mais do que 5% da energia utilizada no período de repouso é atribuído à glia. Esses cálculos não concluem como esta energia é gerada e distribuída, a proporção de contribuição de cada tipo celular e a possibilidade de intercâmbio de substratos entre as células. Como consequência, conclui-se que 95% da energia proveniente da glicose é utilizada por neurônios e apenas 5% satisfazem as necessidades metabólicas da glia (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2003).

Sob condições de repouso, a captação e o metabolismo da glicose são realizados por todos os tipos celulares do SN. Os transportadores desta hexose são relativamente específicos para cada tipo celular. Nos neurônios o transportador predominante é o GLUT3, nos capilares e astrócitos o GLUT1, e nas células da microglia GLUT5 (MAGISTRETTI, 1999).

A relação entre atividade neuronal e consumo de glicose é muito bem caracterizada para as sinapses glutamatérgicas. No sistema nervoso, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, liberado por cerca de 90% das sinapses. No córtex, o glutamato

é responsável pela utilização de 80 a 90% da glicose captada (MAGISTRETTI *et al.*, 1999; PELLERIN & MAGISTRETTI, 2003).

O glutamato, liberado na fenda sináptica em resposta à propagação do potencial de ação ao longo do neurônio, pode ser recaptado tanto por astrócitos quanto por neurônios. Nos astrócitos, os transportadores de glutamato realizam o co-transporte deste neurotransmissor com 3 moléculas de sódio ( $\text{Na}^+$ ). Com isso a bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase aumenta sua atividade para manter o equilíbrio eletroquímico da célula, aumentando a necessidade da síntese de ATP. Este é o estímulo para o aumento da captação de glicose pelos astrócitos (TSACOPOULOS & MAGISTRETTI, 1996).

Experimentos utilizando técnicas de imagem funcional em córtex de humanos, mostram um aumento no fluxo de sangue e no consumo de glicose (30 a 50%), mas não um aumento da mesma magnitude no consumo de oxigênio (~5%) durante a ativação de uma via. Este desacoplamento inicial entre utilização de glicose e consumo de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) leva à produção transitória e local de lactato a partir de glicose (MAGISTRETTI, 1999; PRICHARD *et al.*, 1991; BUXTON & FRANK, 1997). Estima-se que a concentração de lactato no líquido extracelular encefálico esteja entre 3 e 5 vezes acima dos valores séricos, no entanto, os valores de glicose são ~25 a 30% menores do que o encontrado no plasma (LAM *et al.*, 2005).

*In vitro*, os astrócitos sintetizam e liberam lactato em concentrações consideráveis (15 a 30 nmol/ mg de proteína/ minuto). Este substrato também é capaz de sustentar a atividade sináptica de fatias de cérebro mantidas *in vitro* em meio sem glicose (MAGISTRETTI, 1999) e a oxidação do lactato *in vitro*, por fatias de cerebelo de ratos adultos é, em média, 3,25 vezes maior quando comparada à oxidação da glicose (2.405 *versus* 740 pmol  $\text{h}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ , respectivamente) (BUENO *et al.*, 1994). A adição de glutamato no meio de incubação

aumenta a taxa glicolítica e a produção e liberação de lactato (MAGISTRETTI, 1999; SCHURR et al., 1999).

Logo, quando o glutamato é recaptado pelo astrócito juntamente com o  $\text{Na}^+$ , há estímulo para a captação de glicose e aumento da atividade glicolítica. A cada molécula de glicose que entra no astrócito, 2 moléculas de ATP são produzidas na glicólise e 2 moléculas de lactato são liberadas para o neurônio. No astrócito, 1 ATP é utilizado pela bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e o outro para a conversão de glutamato em glutamina pela enzima glutamina sintase. Nos neurônios pré- e pós-sináptico cada lactato produz 18 moléculas de ATP, no ciclo de Krebs e cadeia respiratória. Também há aumento na captação de glicose pelo próprio neurônio (Figura 1) (MAGISTRETTI, 1999; SCHURR et al., 1999; TSACOPOULOS & MAGISTRETTI, 1996).

Porém, as condições sob as quais o lactato se torna um substrato energético importante e a contribuição da glicose e do lactato no metabolismo de cada tipo celular do sistema nervoso *in vivo* continuam controversas (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2003). Vários estudos não sustentam a idéia de que o lactato seja um substrato fisiológico preferencial durante a ativação neuronal (FILLENZ, 2005).

Outra fonte importante de energia é o glicogênio, que se encontra principalmente em astrócitos. A proporção de glicogênio entre fígado, músculo e encéfalo é de 100:10:1. Há uma relação entre a atividade sináptica e o consumo de glicogênio, pois durante a sono e anestesia, quando diminui a atividade sináptica, aumenta a concentração deste polímero (BROWN *et al.*, 2004). Além disso, astrócitos ricos em glicogênio se concentram em regiões de grande atividade sináptica (BROWN *et al.*, 2004). Neurotransmissores e neuromoduladores, tais como a noradrenalina, serotonina, histamina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), ATP e adenosina, estimulam a glicogenólise (MAGISTRETTI, 1999; PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004).

Em cultura de astroglia, o lactato também participa da síntese de glicogênio, pela ação da fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), mas a relevância fisiológica deste achado ainda é incerta (SCHMOLL *et al.*, 1995).

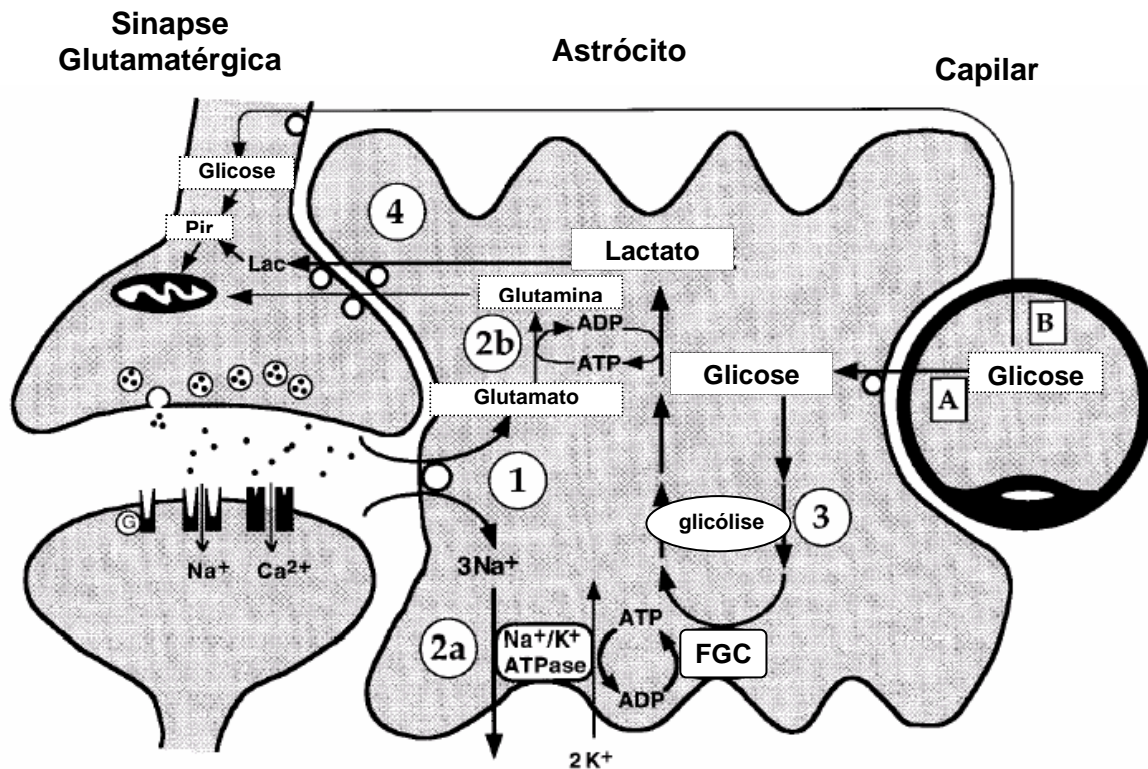


Figura 1: Suprimento energético durante a ativação neuronal glutamatérgica.

A: Captação de glicose pelos astrócitos (GLUT1); B: captação de glicose pelos neurônios (GLUT3); 1: co-transporte glutamato -  $\text{Na}^+$ ; 2a: ativação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase; 2b: via glutamina sintase o glutamato é convertido a glutamina, a qual é liberada para ser metabolizada pelos neurônios; 3: ativação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase estimula a glicólise; 4: liberação de lactato para os neurônios pré e pós-sinápticos. Lac: lactato; Pir: piruvato; G: proteína G do receptor metabotrópico do glutamato; FGC: fosfoglicerato cinase.

Modificado de Magistretti e Pellerin, 1999.

Com relação às sinapses inibitórias, supõe-se que o gasto energético destas seja bem menor do que o das sinapses excitatórias. O ácido gama aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SN e é recaptado por astrócitos em co-transporte com  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . Porém, a recaptação de GABA induz resposta metabólica astrocitária menor quando comparada à do glutamato (CHATTON *et al.*, 2003).

O lactato também tem mostrado efeitos neuroprotetores sob condições citotóxicas e isquêmicas (PIERRE & PELLERIN, 2005). Em hipocampo, o lactato protegeu as funções neurais *in vitro* na ausência de glicose, sob estimulação de concentrações excitotóxicas de glutamato (5 ou 20mM) (SCHURR et al., 1999).

Murata e colaboradores (1998) estudaram, sob condições euglicêmicas e normóxicas, a influência da presença de 20 mM de lactato sobre a captação de glicose radioativa. A perfusão de cerebelo, córtex frontal e hipocampo na presença de lactato diminui a captação de glicose, mostrando que esses tecidos preferem oxidar o lactato exógeno à glicose em condições normais.

No entanto, a incubação de fatias de hipocampo em meio suplementado com 5 mM de lactato, mas sem glicose, não impede a diminuição da atividade elétrica neuronal. Além disso, diferentes tipos celulares possuem sensibilidades distintas à diminuição de glicose do meio; os neurônios piramidais são mais sensíveis às diminuições drásticas de glicose quando comparados às células granulares (giro denteado) (WADA *et al.*, 1998). Com exposição ao lactato (5 mM) não há aumento dos níveis de ATP e de creatina fosfato (YAMANE *et al.*, 2000). A captação *in vitro* de 2-<sup>14</sup>C-DG por fatias de hipocampo não é alterada, mesmo na presença de 10 mM de lactato, e a presença de lactato em concentrações fisiológicas (1mM) não altera a oxidação de <sup>14</sup>C-glicose (GILBERT *et al.*, 2006).

Portanto, a glicose se mostra indispensável para a manutenção das funções dos neurônios do hipocampo e o lactato seria importante durante a depleção energética e outras situações de estresse celular (GILBERT *et al.*, 2006; YAMANE *et al.*, 1996).

Já no hipotálamo o lactato é capaz de recuperar a excitabilidade de neurônios glicoresponsivos após privação de glicose (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004). Nesta estrutura há a presença de glicoreceptores, ou seja, neurônios sensíveis às alterações de glicemia, no

núcleo ventromedial (NVM), núcleo arqueado e núcleo paraventricular (SONG & ROUTH, 2005; MARTY, DALLAPORTA & THORENS, 2007).

Nos núcleos hipotalâmicos foram identificados subtipos de glicoreceptores: neurônios estimulados por glicose (sensível ao aumento na concentração deste substrato) e neurônios inibidos por glicose (sensível à diminuição de glicose) (SONG & ROUTH, 2005). Em experimentos realizados por Song & Routh (2005) em neurônios do NVM, demonstrou-se que a presença de lactato excita tanto neurônios estimulados quanto os inibidos por glicose. Também eleva o limiar de sensibilidade do primeiro tipo de glicoreceptor, ou seja, aquele estimulado pela presença de glicose.

A infusão de glicose ou de lactato no NVM inibe a liberação dos hormônios contra-reguladores da insulina (BORG et al., 1997; BORG et al., 2003) e diminui a produção de glicose pelo fígado (inibe a gliconeogênese e a glicogenólise) (LAM *et al.*, 2005). A infusão periférica de lactato também reduz os efeitos hipoglicêmicos da aplicação indevida de insulina (HUSSAIN, 1997), além de suprir as necessidades metabólicas do tecido nervoso.

Os núcleos hipotalâmicos não detectam apenas a presença de glicose, mas também do lactato, porém mais estudos ainda são necessários para esclarecer os mecanismos de detecção da variação não apenas da glicemia, como também da presença de outros substratos energéticos (PIERRE & PELLERIN, 2005).

No bulbo olfatório como um todo, há diversos neurotransmissores: glutamato, acetilcolina, dopamina, GABA, noradrenalina e serotonina (AFFANNI & CERVINO, 2004), portanto a avaliação de seu gasto energético é bastante complexa. Seu gasto energético está ligado à estimulação sensorial: a presença de estímulos odorantes causa aumento do fluxo sanguíneo local e do consumo de glicose, como já foi descrito em experimentos de ressonância magnética. Quanto maior a intensidade do estímulo, maior a resposta neural (NAWROTH *et al.*, 2007). Injetando-se  $2\text{-}^{14}\text{C-DG}$  em animais experimentais, observa-se que



a região correspondente ao glomérulo e ramificações das células mitrais são as de maior captação deste análogo de glicose (JOURDAN *et al.*, 1980). A região glomerular é ricamente capilarizada e possui elevada expressão da enzima citocromo oxidase e baixa da LDH (BOROWSKY & COLLINS, 1989). O glomérulo é composto pelos neurônios olfatórios, células em tufo, mitral e periglomerulares. Apenas a última é gabaérgica; as primeiras são glutamatérgicas. É possível que ocorra o acoplamento entre a liberação de glutamato na fenda sináptica, consumo de glicose e liberação de lactato (NAWROTH *et al.*, 2007). As outras regiões desta estrutura são pobremente irrigadas, portanto, sua captação de glicose é menor. Porém, algumas destas regiões têm grande expressão da LDH, indicando a possibilidade de um metabolismo anaeróbio local (BOROWSKY & COLLINS, 1989; LAUGHTON *et al.*, 2000; JOURDAN *et al.*, 1980).

No bulbo olfatório há grande atividade da enzima glicogênio fosforilase e uma reserva de glicogênio duas vezes maior quando comparado ao córtex cerebral, indicando um rápido *turnover* de glicogênio (COOPERSMITH & LEON, 1995), essencial para o suprimento energético. O glicogênio pode ser metabolizado e liberado na forma de lactato (MAGISTRETTI, 1999).

## **1.2 METABOLISMO ENERGÉTICO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do organismo, representando 40 a 45% do peso corporal total, cuja função é produzir movimento e gerar força (MATTIAZZI, 2004). Este tecido é composto por três tipos de fibras (NELSON & COX, 2005):

1. Fibras de contração lenta: são de cor avermelhada pela presença de mioglobina (proteína semelhante à hemoglobina, que supre o tecido de O<sub>2</sub>); são ricas em mitocôndrias e irrigação sanguínea. Desenvolvem pouca tensão e são resistentes à fadiga;

2. Fibras de contração rápida: são de cor branca (pobres em mioglobina); têm poucas mitocôndrias e menos irrigadas. Desenvolvem muita tensão e são pouco resistentes à fadiga;
3. Fibras intermediárias: têm características intermediárias entre os dois tipos anteriormente citados.

Este tecido pode usar como fonte de energia ácidos graxos, corpos cetônicos e/ ou glicose. No repouso o substrato preferencial são os ácidos graxos, provenientes do tecido adiposo, e corpos cetônicos, que são sintetizados pelo fígado. Esses dois compostos são convertidos em acetil-CoA, que entra na mitocôndria para ser oxidada a CO<sub>2</sub> no ciclo de Krebs. Gera-se 131 ATP por molécula de palmitato (ácido graxo saturado de 16 carbonos). Os elétrons liberados neste ciclo são transferidos ao O<sub>2</sub> e a energia liberada neste processo é utilizada para a síntese de ATP na fosforilação oxidativa (NELSON & COX, 2005).

Durante atividade física de baixa intensidade, o músculo utiliza tanto glicose (captada da circulação), quanto ácidos graxos e corpos cetônicos. A glicose é degradada na glicólise gerando piruvato, e este último convertido em acetil-CoA. Este tipo de metabolismo é característico das fibras de contração lenta (NELSON & COX, 2005).

Porém, em atividade de alta intensidade, existe grande necessidade metabólica e rapidez para geração de ATP, portanto, a oxidação de ácidos graxos e corpos cetônicos diminui consideravelmente, dando lugar à utilização de substratos como a glicose e a fosfocreatina, que podem ser metabolizada na ausência de O<sub>2</sub>. A fosfocreatina doa seu fosfato para o ADP, formando ATP, através da enzima creatina cinase. A glicose é liberada principalmente dos estoques de glicogênio muscular, que correspondem a quase 1% do peso do músculo (NELSON & COX, 2005). Porém, como a demanda energética é elevada e o suprimento de O<sub>2</sub> não é tão efetivo, há formação de lactato a partir do piruvato. A glicólise anaeróbia acontece principalmente nas fibras de contração rápida (MARKS *et al.*, 1996).

O transporte de glicose intersticial para o músculo é mediado pelo GLUT4. Este transportador é encontrado em tecido adiposo, músculo esquelético e músculo cardíaco e é insulino-dependente, ou seja, depende da ligação da insulina ao seu receptor para ser translocado para a membrana celular (CINGOLANI, 2004). Durante o período pós-prandial, no qual há grande liberação de insulina, a captação de glicose e a síntese de glicogênio muscular são estimuladas. A insulina também ativa a glicogênio sintase, enzima responsável pela síntese de glicogênio, aumentando as reservas deste polímero para os períodos de atividade física (SALTIEL & KAHN, 2001; MARKS *et al.*, 1996). A degradação do glicogênio por ação da enzima glicogênio fosforilase libera glicose que é oxidada na glicólise gerando piruvato, que poderá ser convertido a lactato (anaerobiamente) ou a acetil-CoA (aerobiamente) (MARKS *et al.*, 1996). A glicogenólise é regulada pelos hormônios contra-reguladores da insulina (glucagon, catecolaminas) e, no músculo esquelético, pela concentração intracelular de cálcio (MARKS *et al.*, 1996; CINGOLANI, 2004).

### **1.3 DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)**

A desidroepiandrosterona (DHEA) é um hormônio esteróide precursor dos hormônios sexuais. Sua fórmula química é  $\Delta^5$ -androstên 3 $\beta$ hidroxi 17-ona e é derivado, assim como todos os hormônios sexuais, do colesterol, cuja estrutura química básica é o ciclopentano-peridrofenantreno (NICOLA, 2004; BERNADIER *et al.*, 1993).

Seu principal local de síntese em humanos e primatas é o córtex das glândulas supra-renais (zona reticular). O colesterol é metabolizado por uma enzima do citocromo P450, dando origem à pregnenolona. Esta última dá origem à DHEA (Figura 2).

A síntese de hormônios esteróides pelas supra-renais é controlada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é liberado pela hipófise no seu ritmo circadiano ou também em resposta ao estresse. O ACTH estimula a desesterificação do colesterol presente

no córtex da supra-renal e sua entrada na mitocôndria para o início da esteroidogênese (NICOLA, 2004). No entanto, o ACTH parece ser mais efetivo em aumentar as concentrações de cortisol do que a de DHEA (BERNADIER *et al.*, 1993; BAULIEU & ROBEL, 1998).

Em humanos, a DHEA é secretada pelas supra-renais tanto na forma livre (DHEA: 6-8 mg/dia) como na forma sulfatada (DHEAS: 15-18 mg/dia). Para que a DHEAS possa exercer sua função, uma sulfatase atua sobre este composto liberando sua forma livre (ROBEL *et al.*, 1999).

DHEA é convertida em hormônios sexuais (androgênios e/ou estrogênios) em tecidos periféricos classicamente esteroidogênicos, como as gônadas. No entanto, foi descrita a existência da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD), que catalisa a transformação de DHEA em androstenediona (precursor da testosterona e estradiol), na placenta, tecido adiposo, tecido mamário, pulmão, endométrio, próstata, fígado, rim, epidídimo, pele e encéfalo (LABRIE *et al.*, 2005).

Estudos realizados em humanos detectaram a existência de hormônios esteróides no SNC, entre eles a DHEA. Como a passagem de DHEA pela barreira hematoencefálica parece não ocorrer com tanta facilidade, propôs-se que o tecido nervoso seria capaz de sintetizar esteróides *de novo*, ou seja, a partir do colesterol, em parte, independentemente da produção das glândulas periféricas, sendo chamados de neuroesteróides (Figura 2) (BAULIEU & ROBEL, 1998; ROBEL *et al.*, 1999).

Outros animais, como os roedores, não possuem grandes concentrações séricas de DHEA e DHEAS, pois as supra-renais secretam pequenas quantidades destes. No entanto, Robel e colaboradores (1999) analisaram o encéfalo de ratos machos e detectaram que as concentrações deste hormônio e sua forma sulfatada eram maiores no SNC do que no plasma. A castração e adrenalectomia de ratos machos, para retirar qualquer fonte periférica



**Tabela 1: Concentração de DHEA e DHEAS encontrada em encéfalo e plasma de ratos machos**

	Animal Intacto		Animal A/C	
	Encéfalo	Plasma	Encéfalo	Plasma
<b>DHEA</b>	0,24 ± 0,33	0,06 ± 0,06	0,14 ± 0,13	<b>ND</b>
<b>DHEAS</b>	1,70 ± 0,32	0,20 ± 0,08	1,64 ± 0,43	<b>ND</b>

Valores expressos em ng/g ou ng/mL (média ± DP). **ND**: não detectado; **animal A/C**: adrenalectomizado e castrado. Modificado de Baulieu, 1998.

A incubação de células do sistema nervoso com colesterol leva à formação de pregnenolona e progesterona, assim como a incubação de mitocôndrias de oligodendrócitos com colesterol leva à síntese de pregnenolona, sugerindo uma via clássica de síntese de neuroesteróides. A síntese de DHEA ainda não foi demonstrada neste tipo de modelo experimental, porém há possibilidade de uma via envolvendo hidroperóxidos levar à formação de pregnenolona e DHEA a partir de colesterol (Figura 2) (BAULIEU & ROBEL, 1998).

Obviamente, esses dados não excluem totalmente a possibilidade de que os esteróides possam atravessar a barreira hematoencefálica e serem sulfatados. Kullak-Ublick e colaboradores (1998) identificaram a presença de um possível transportador para DHEAS em cerebelo, córtex cerebral (principalmente córtex frontal), bulbo, medula espinal e putame. Além disso, a DHEA pode ser metabolizada a outros esteróides [androgênios (androstenediol, androstenediona, testosterona e diidrotestosterona - DHT) e/ou a estrogênios (estrone e estradiol)] e exercer seus efeitos. Em cultura de células de mama, a DHEA só ativou a transcrição gênica após ser convertida em estrogênios, principalmente estradiol (SCHMITT *et al.*, 2001). A DHEA *in vivo* aumenta o número de espinhos dendríticos de

neurônios hipocampais após metabolização a estradiol, em fêmeas, e testosterona/diidrotestosterona, em machos (MacLUSKY *et al.*, 2004).

Os hormônios que atuam no SNC, independente de serem produzidos no local ou periféricamente, são chamados de esteróides neuroativos (RUPPRECHT & HOLSBOER, 1999; ZWAIN & YEN, 1999). Os esteróides neuroativos podem modular a atividade do cérebro e modificar sua estrutura para adaptação aos estímulos ambientais. Este controle permite que os sinais externos regulem a secreção hormonal e o comportamento levando o animal a se adaptar aos estímulos externos (McEWEN, 1999).

As ações dos hormônios esteróides (DHEA, estradiol, testosterona) sobre o SN podem se dar no período perinatal, alterando a organização dos tecidos neurais de maneira irreversível, ou em animais adultos, causando efeitos transitórios sobre os neurônios. Dentre esses efeitos transitórios estão a modificação da expressão gênica, modulação alostérica de receptores de neurotransmissores, alteração da atividade de enzimas metabólicas e da plasticidade sináptica (BEAR *et al.*, 2007; RUPPRECHT & HOLSBOER, 1999; McEWEN, 1999; BIAGIOTTI *et al.*, 2001).

Em seres humanos a DHEA poder ter efeitos no aumento da densidade óssea e da massa magra, diminuição da gordura subcutânea e da resistência à insulina, aumento da libido e sensação de bem estar, além de diminuir sintomas de depressão e ansiedade (LABRIE *et al.*, 2005). Também há correlação inversa entre as concentrações séricas da DHEAS e o risco cardiovascular. Num estudo de corte prospectivo, homens acima de 50 anos, com os menores valores de DHEAS plasmáticos tiveram maior risco de morte por doenças cardiovasculares. Esta correlação não foi encontrada em mulheres (BERR *et al.*, 1996). Baixas concentrações de DHEAS foram encontradas também no lupus eritematoso, no câncer de mama e na artrite reumatóide (DEIGHTON *et al.*, 1992). A suplementação com DHEA melhora o sistema imune, cognição, memória, sintomas depressivos e o quadro de

pacientes esquizofrênicos. Porém, outros autores mostram que nem sempre os estudos concordam nos resultados, levantando dúvida sobre os reais benefícios da suplementação de DHEA e sua forma sulfatada (ARLT, 2004).

Vários estudos em animais e culturas de células já demonstraram efeitos metabólicos da DHEA sobre os tecidos periféricos, como tecido adiposo, fígado, músculo esquelético (BERNADIER *et al.*, 1993; CLEARY, 1991) e sobre o sistema nervoso (ROBEL *et al.*, 1999).

A administração de DHEA em animais geneticamente obesos, leva à diminuição do ganho de peso, da massa corporal adiposa (principalmente, gordura visceral), da secreção de insulina e da glicemia. Além disso, melhora a tolerância à glicose e aumenta a massa magra e a termogênese. A diminuição da perda de peso pode ou não ser acompanhada de redução na ingestão alimentar (BERNADIER *et al.*, 1993; CLEARY, 1991; RYU *et al.*, 2003).

No entanto, a relação entre DHEA e efeitos hipolipidêmicos é controversa, pois existem influências genéticas e alimentares. Em animais alimentados com dieta hiperlipídica, o tratamento com este esteróide diminuiu o colesterol e os triglicerídeos. O tratamento de animais que receberam dieta com alto teor de colesterol e sacarose ou de ratos geneticamente obesos (Zucker), diminuiu o colesterol sem alterar os triglicerídeos (CLEARY, 1991).

Além disso, injeções de DHEA 10mg/kg em ratos de um ano de vida produziu melhora da sensibilidade à presença de glicose e o aumento do número de células  $\beta$  pancreáticas. Houve redução dos níveis do receptor de insulina e de algumas proteínas intracelulares que fazem parte de sua cascata de sinalização, como o substrato do receptor de insulina -1 e 2 (IRS-1 e 2), mas não de outras como a enzima fosfatidilinositol-3 cinase (PI-3K) e proteína cinase B-2 (PKB-2). No entanto, a PKB - 1 foi superexpressa, e está correlacionada com o aumento do número e tamanho das células  $\beta$  (MEDINA *et al.*, 2006).



As ações periféricas da DHEA no tecido adiposo, assim como no fígado e músculo, são muito estudadas relacionando este esteróide ao tratamento da obesidade e da síndrome metabólica, por isso muitos experimentos que visam esclarecer as interações da DHEA e o metabolismo intermediário utilizam animais obesos ou diabéticos ou, até mesmo, culturas de células provenientes destes.

No tecido adiposo, a DHEA parece ter efeito anti-obesidade pela inibição da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, diminuindo a gordura corporal por inibir a replicação e o crescimento dos adipócitos. Esta enzima faz parte da via de síntese de nucleotídeos, essenciais para a proliferação celular (GORDON *et al.*, 1986). Entretanto, outros estudos indicam que os efeitos anti-obesidade deste hormônio se dão através da diminuição da insulina sérica que, no tecido adiposo, estimula a atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, ácido graxo sintase, lipase lipoproteica e enzima málica (CLEARY, 1991). Assim, menos insulina circulante diminui a atividade dessas enzimas, o que poderia causar a redução na deposição de massa gorda.

DHEA *in vivo* também altera proteínas de transcrição gênica no tecido adiposo da família do receptor ativador de proliferação de peroxissomos (PPAR). Aumenta a expressão de PPAR $\alpha$  em cultura de adipócitos, que transcreve enzimas necessárias para a  $\beta$ -oxidação e formação de corpos cetônicos (NELSON & COX, 2005; APOSTOLOVA *et al.*, 2005), e exerce *down-regulation* sobre o PPAR $\gamma$  de animais obesos, que atua na transcrição de genes responsáveis pela diferenciação de fibroblastos em adipócitos e proteínas relacionadas à síntese lipídica (NELSON & COX, 2005; KAJITA *et al.*, 2003). A DHEA também diminui a expressão e secreção de leptina (KAJITA *et al.*, 2003; APOSTOLOVA *et al.*, 2005; RYU *et al.*, 2003).

Animais obesos e diabéticos tratados com este esteróide tiveram aumento da expressão das proteínas desacopladoras (UCP) do tipo 1 no tecido adiposo marrom, mas sua

expressão não foi alterada no tecido adiposo branco. O tecido adiposo marrom é o grande responsável pela termogênese em roedores. Essas proteínas se encontram na mitocôndria e são responsáveis pela perda de energia química fornecida pelos substratos em forma de calor, estimulando a termogênese (RYU *et al.*, 2003).

Outro efeito seria o aumento na captação de glicose *in vitro*. O tratamento de cultura de adipócitos com  $10^{-6}$ M de DHEA aumentou a captação de glicose radioativa, sob estimulação insulínica. O tratamento com este esteróide não altera a ligação da insulina com seu receptor, no entanto, há ativação da IRS-1/2, PI-3K e proteína cinase C (PKC) e translocação de GLUT 1 e 4 (ISHIZUKA *et al.*, 1999; PERRINI *et al.*, 2004).

Entretanto é difícil estabelecer qual a melhor dose para ação da DHEA, já que alguns estudos mostram que concentrações próximas às fisiológicas são mais efetivas ( $10^{-8}$ M) (ISHIZUKA *et al.*, 1999), enquanto outros sugerem que doses maiores possuem melhor efeito ( $10^{-4}$ M). Outros esteróides, como estradiol, testosterona, diidrotestosterona, androstenediona e progesterona, não melhoraram a sensibilidade das células à presença de insulina (PERRINI *et al.*, 2004).

A diminuição no número de adipócitos e melhora da sensibilidade periférica à insulina causada pela DHEA, poderia ser responsável pela diminuição da necessidade de secreção pelas células  $\beta$  (BERNADIER *et al.*, 1993).

A DHEA também possui efeitos anabólicos sobre músculo esquelético e sobre a composição corporal em animais alimentados com dieta rica em lipídios; este hormônio aumentou a quantidade protéica corporal e do músculo gastrocnêmio, e diminuiu a quantidade de gordura corporal total e muscular (HEREDIA *et al.*, 2007). Também atua aumentando a captação de glicose. Em cultura de mioblastos, DHEA elevou a captação, porém apenas quando foi adicionada em altas doses ( $10^{-5}$  e  $10^{-4}$ M). Em baixas concentrações não exerceu efeito, mesmo na presença de insulina (NAKASHIMA *et al.*, 1995). A DHEA

também ativa as enzimas glicogênio sintase (estimula síntese de glicogênio), fosfofrutocinase (enzima da via glicolítica) e piruvato desidrogenase (transforma piruvato em acetil-CoA) no músculo esquelético (LIU *et al.*, 2003).

Ratos de seis meses de idade, injetados durante uma semana (tratamento agudo) com DHEA 10mg/kg, mostraram melhora na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina corporal, assim como aumento na taxa de fosforilação das proteínas IRS-1 (que neste tecido é essencial para a ação da insulina) / PI-3K / PKB / PKC nos miócitos esqueléticos (CAMPBELL *et al.*, 2004).

O músculo sóleo de ratos diabéticos com dieta suplementada com DHEA 0,4% captou mais glicose radioativa do que os músculos de animais diabéticos não tratados, após estimulação pela insulina (ISHIZUKA *et al.*, 1999). Isso pode demonstrar que, *in vivo*, a DHEA pode ativar vias de sinalização celular que estimulam a captação de glicose por músculos.

Porém, em ratos obesos este hormônio esteróide causa diminuição da síntese de glicogênio e eleva os níveis da glutathione peroxidase e superóxido dismutase em músculo esquelético. Isto pode indicar que o tratamento com este hormônio esteróide pode aumentar a produção de radicais livres (BERNADIER *et al.*, 1993).

Já nos hepatócitos, a ação deste hormônio esteróide causa diminuição da síntese de lipídios, das reservas de glicogênio e aumento da síntese de proteína (CLEARY, 1991). Este esteróide inibe as enzimas relacionadas à gliconeogênese: glicose-6-fosfatase, PEPCK, frutose-1,6-bifosfatase e piruvato carboxilase; estimula a oxidação de glicose a CO<sub>2</sub> (em animais obesos) e em altas concentrações pode aumentar a captação de glicose em cultura de células (CLEARY, 1991; YAMASHITA *et al.*, 2005; BERNADIER *et al.*, 1993). Também aumenta a atividade da lactato desidrogenase e da enzima málica (CLEARY, 1991).

Tratamento com DHEA 10mg/kg em ratos, aumenta a taxa de fosforilação das proteínas IRS-2 (substrato indispensável para a ação da insulina nesse tecido) / PI-3K / PKB / PKC (CAMPBELL *et al.*, 2004). O estímulo para captação de glicose e inibição da PEPCK, verificado em outros estudos, poderiam ser mediadas por essa via (YAMASHITA *et al.*, 2005; BERNADIER *et al.*, 1993).

Além disso, é relatado que a DHEA é capaz de inibir a glicogênio fosforilase no fígado, enzima responsável pela degradação do glicogênio (CLEARY, 1991); e a via IRS / PI-3K / PKB / PKC poderia estimular a glicogênio sintase, enzima que sintetiza glicogênio (CAMPBELL *et al.*, 2004). Essas evidências contrariam dados anteriores, que mostram diminuição das reservas de glicogênio hepáticas (CLEARY, 1991).

Este esteróide também influencia o metabolismo lipídico de animais obesos, estimulando ciclos fúteis que levam ao gasto de energia, ativando enzimas de síntese (ácido graxo sintetase) e degradação (hidrolase de ácidos graxos) de lipídios no fígado, ou seja, leva ao aumento da termogênese. DHEA também parece induzir a proliferação de peroxissomos, envolvidos na oxidação lipídica. Isto contribui para a perda de peso desses animais (CLEARY, 1991; BERNADIER *et al.*, 1993).

Suplementação de 0,6% de DHEA na alimentação de ratos por 16 meses, mostram a hepatotoxicidade deste esteróide, com acentuada proliferação mitocondrial (SAFIULINA *et al.*, 2006). Em animais obesos este hormônio aumenta a produção de radicais livres (BERNADIER *et al.*, 1993).

Mais estudos são necessários para entender os processos pelos quais a DHEA modifica a tolerância à glicose independente da ação da insulina, e seus possíveis efeitos fisiológicos e farmacológicos no tratamento da obesidade e Síndrome Metabólica.

Esteróides, como a pregnenolona e a DHEA, são sintetizados no encéfalo de animais no período fetal, neonatal e adulto. No encéfalo de animais imaturos a neuroexcitabilidade é

fundamental para o desenvolvimento das conexões neurais e pode ser modulada por esteróides. Há evidências de que a administração de neuroesteróides influencia o desenvolvimento dos sistemas neurais, como o dopaminérgico e serotoninérgico (IAWATA *et al.*, 2005). A DHEA pode exercer ação neurotrófica *in vitro* sobre neurônios e glia retirados de embriões de ratos, de forma dependente da dose (BAULIEU & ROBEL, 1998) além de atuar na maturação e desenvolvimento das mitocôndrias e da função respiratória mitocondrial, principalmente, após o nascimento (PATEL & KATYARE, 2006).

A DHEA também altera os níveis de expressão de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) no SN. Injeções de DHEA 50mg/kg em ratos eleva os níveis de IGF-1 e causa *down-regulation* em seus receptores (IGF-1R) no hipotálamo. Em outras áreas, como córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, não foi demonstrado o mesmo efeito, bem como em doses menos concentradas. Atuando no hipotálamo, este neuroesteróide pode diminuir a ingestão alimentar regulando os níveis de serotonina, além de diminuir os níveis de leptina circulantes (RIBEIRO & GARCIA-SEGURA, 2002).

Em cultura de astrócitos de animais neonatos, o IGF-1 e a insulina atuaram aumentando as concentrações de glicogênio, porém o IGF foi mais eficaz (DRINGEN & HAMPRECHT, 1992). Sabe-se que o IGF atua no desenvolvimento encefálico neonatal e perinatal, e que aumenta a captação de glicose durante este período para suprir as necessidades energéticas do tecido nervoso. Na fase adulta, este fator de crescimento atua principalmente, como neuromodulador. Porém, durante injúria neural, o aumento da expressão de IGF-1 está associado a aumento da captação de 2-<sup>14</sup>C-DG (BONDY *et al.*, 2006).

DHEA também tem efeitos modulatórios sobre os receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor<sub>A</sub> de ácido gama-aminobutírico (GABA<sub>A</sub>) e receptores sigma (receptor de opióides), além de estimular *in vitro* a liberação sináptica de glutamato

(LHULLIER *et al.*, 2004). Esses receptores e neurotransmissores são importantes na plasticidade neuronal, excitotoxicidade, além de estarem envolvidos nos processos de aprendizagem e memória, comportamento, humor, depressão e sono (TAGAWA *et al.*, 2006).

Os efeitos anteriormente citados são mediados por receptores dos neurotransmissores, ou seja, receptores de membrana. Também há possibilidade de que a DHEA exerça suas ações através de receptores nucleares modificando a transcrição de genes específicos (RUPPRECHT & HOLSBOER, 1999). Nenhum receptor específico para DHEA foi encontrado, porém, Mo e colaboradores (2004) indicaram que este neuroesteróide poderia atuar sobre receptores de androgênios.

Metabólitos deste neuroesteróide, como por exemplo, o estradiol, está associado à neuroproteção em experimentos que envolvem isquemia do SN. Áreas de lesão isquêmica do cérebro de ratas ovariectomizadas injetadas previamente com 17  $\beta$ -estradiol foram menores quando comparadas às das ratas tratadas com veículo. O estradiol exerce essa função mantendo os níveis de expressão de GLUT 1 na barreira hematoencefálica e, conseqüentemente, os níveis de glicose no tecido, pois durante a deficiência de oxigênio aumenta a necessidade de substrato energético no meio extracelular para manter os níveis de ATP celulares (SHI *et al.*, 1997). Em outro estudo, o estradiol atuou como neuroprotetor após isquemia em cultura de células de hipocampo, estimulando as proteínas PI-3K e PKB e inibindo a glicogênio sintase cinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), inibindo a apoptose (CIMAROSTI *et al.*, 2005). Obviamente, não exclui-se a concomitância dos dois efeitos anteriormente citados.

Ainda existe muita controvérsia com relação aos efeitos protetores ou nocivos da DHEA sobre o SN. Alguns estudos demonstram efeitos antioxidantes e anti-apoptóticos e outros ao contrário.

Animais injetados com estreptozotocina, para indução de diabetes, e tratados com DHEA, tiveram os níveis de glutathiona mantidos quando comparados aos controles (diabéticos e não tratados com DHEA). A diabetes também aumentou a peroxidação lipídica em fígado, rim e encéfalo. A peroxidação foi diminuída pelo tratamento com DHEA (ARAGNO, 1999).

Células de microglia *in vitro*, quando expostas a altas doses (100 $\mu$ M) mostram os efeitos antiproliferativos da DHEA. Esse efeito é potencializado pela diminuição progressiva ou ausência de glicose. Na ausência de glicose houve inibição do crescimento em todas as doses de DHEA utilizadas (25, 50 e 100  $\mu$ M). Os efeitos anti-proliferativos se devem à depleção dos níveis ATP, e a presença de glicose 4,5 mg/dL (concentração plasmática) suprime as ações do hormônio (YANG *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2002). Uma das maneiras pela qual a DHEA pode induzir a diminuição de ATP é estimulando ciclos fúteis metabólicos, como os encontrados em tecidos periféricos (CLEARY, 1991; RYU, *et al.*, 2003; BERNADIER *et al.*, 1993), porém essa ação sobre o SN precisa ser elucidada.

Este neuroesteróide inibe a respiração mitocondrial *in vitro*, levando assim à diminuição da síntese de ATP. O complexo I mitocondrial (primeira enzima da oxidação fosforilativa), de células cerebelares em cultura, foi inibido por DHEA 10<sup>-4</sup>M. A inibição da função mitocondrial, levou à ativação da glicólise, para suprir a falta de ATP. A DHEA também alterou o balanço entre oxidação fosforilativa e glicólise, aumentando a captação de glicose e o acúmulo de lactato, pois não havia possibilidade de oxidar aerobicamente o piruvato produzido pela glicólise (40% do piruvato foi convertido a lactato). A taxa de mortalidade neuronal na presença de altas doses de DHEA *in vitro* foi dependente do tempo; quanto maior o tempo de exposição ao neuroesteróide, maior a taxa de inviabilidade celular e sob condições hipoglicêmicas esse efeito foi potencializado. Por outro lado, a adição de substratos como a glicose, reverte o processo. *In vivo* a suplementação de 0,6% de DHEA

causa neurodegeneração de áreas sensíveis ao estresse energético (córtex motor e hipocampo), além de alterações na substância negra (efeito sobre neurônios dopaminérgicos). Doses menores de DHEA ( $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ M) *in vitro* também foram testadas, porém não mostraram efeito inibitório sobre a respiração mitocondrial (SAFIULINA *et al.*, 2006).

Em mitocôndrias isoladas de telencéfalo, a DHEA e o  $\alpha$ -estradiol diminuem o consumo de oxigênio e a atividade da ATPase (MORIN *et al.*, 2002). Este último efeito pode estar relacionado à depleção de ATP encontrada por outros autores (YANG *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2000).

Quando as mitocôndrias foram submetidas à anoxia e reoxigenação, a DHEA protegeu a organela dos efeitos causados pelos dois procedimentos, com as doses de  $10^{-6}$  e  $10^{-10}$  M; doses mais baixas não tiveram efeito. Já o  $\alpha$ -estradiol protegeu apenas na anoxia, nas doses  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ M. Estes dois esteróides também protegeram contra a formação de superóxido ( $O_2^-$ ), entre as doses de  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ M, porém não protegeram contra a lipoperoxidação das membranas mitocondriais. Ainda sim, houve um efeito protetor importante, limitando o consumo de oxigênio, antes e após a anoxia e reoxigenação, a atividade da ATPase e, conseqüentemente, a produção de radicais livres. A inserção destes neuroesteróides na membrana, causando alteração da fluidez e da funcionalidade de enzimas (ATPase), parece ser responsável pelos efeitos encontrados (MORIN *et al.*, 2002).

A DHEA e o  $\alpha$ -estradiol também inibiram os primeiros passos da apoptose celular, que é mediada pela mitocôndria, por causar uma diminuição moderada dos níveis de ATP, revelando um efeito anti-apoptótico (MORIN *et al.*, 2002), contrariando estudos anteriores, utilizando outros modelos experimentais de estresse celular (YANG *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2000).

Portanto, visto que a DHEA possui efeitos metabólicos importantes tanto sobre estruturas periféricas como sobre o SN, o objetivo do presente trabalho foi determinar a ação



deste esteróide neuroativo sobre o metabolismo da glicose no músculo esquelético e em diferentes estruturas do SN e a interação da DHEA com o lactato.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar:

1. A utilização de glicose por diferentes estruturas do SN (bulbo olfatório, córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e hipotálamo) de ratos Wistar;
2. O efeito da DHEA *in vitro* sobre a captação de glicose e oxidação de lactato em diferentes estruturas do SN de ratos;
3. E o efeito da DHEA *in vitro* sobre a captação e oxidação de glicose no músculo esquelético (gastrocnêmio) de ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar:

- Efeito *in vitro* da ausência ou presença de lactato sobre a captação de 2-Deoxi-1-<sup>14</sup>C-Glicose nas diferentes estruturas do SN;
- Efeito da presença de lactato não marcado no meio de incubação sobre a oxidação de <sup>14</sup>C-glicose em hipotálamo e córtex;
- Efeito *in vitro* da DHEA sobre a captação de 2-Deoxi-1-<sup>14</sup>C-Glicose nas estruturas do SN, na presença ou ausência de lactato;
- Efeito *in vitro* da DHEA sobre a oxidação de <sup>14</sup>C-lactato em hipotálamo e córtex;
- Efeito *in vitro* da DHEA sobre a captação de 2-Deoxi-1-<sup>14</sup>C-Glicose no músculo esquelético;
- Efeito *in vitro* da DHEA sobre a oxidação de <sup>14</sup>C-glicose no músculo esquelético.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando aproximadamente 250g, com média de 90 dias de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS-UFRGS). Os animais tiveram livre acesso à ração e água e permaneceram em ambiente controlado, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 7 às 19h) e temperatura ambiental de  $22 \pm 4^\circ\text{C}$ .

O sacrifício dos animais foi realizado por decapitação e as diferentes estruturas do SN e músculo esquelético (gastrocnêmio) foram rapidamente dissecados, colocados em gelo e imediatamente utilizadas nos experimentos de incubação.

O protocolo experimental foi de acordo com os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (publicação NIH, número 80-23, revisado 1996). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e seu sofrimento. As carcaças dos animais foram entregues ao Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da UFRGS para procedimento de eliminação.

#### 3.1 PREPARAÇÃO DO HORMÔNIO

O hormônio era preparado no dia do experimento: primeiramente diluía-se a  $\beta$ -ciclodextrina (Fluka) em água deionizada, atingindo a concentração de 10%. Posteriormente, solubilizava-se a DHEA (Calbiochem) na solução de  $\beta$ -ciclodextrina 10%; chegando à concentração de  $10^{-2}\text{M}$  de DHEA. A DHEA era diluída em solução fisiológica e, posteriormente adicionada aos meios de incubação, chegando às concentrações finais de  $10^{-8}\text{M}$  (DHEA  $10^{-8}$ ) ou  $10^{-12}\text{M}$  (DHEA  $10^{-12}$ ).

No meio controle (CTR) colocava-se a  $\beta$ -ciclodextrina, sendo que sua concentração neste meio era de  $10^{-6}\text{M}$ . Nos meios de incubação contendo DHEA, a concentração de  $\beta$ -

ciclodextrina era  $10^{-12}$ M no primeiro meio (DHEA  $10^{-8}$ M), e  $10^{-16}$ M no segundo (DHEA  $10^{-12}$ M).

### 3.2 CAPTAÇÃO DE 2-DEOXI-D-1- $^{14}$ C-GLICOSE

Após a retirada dos tecidos estes foram colocados em placas de Petri com solução fisiológica gelada (Ringer Bicarbonato – NaCl 118mM, KCl 4,61mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,19mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,74mM,  $\text{NaHCO}_3$  25mM, pH 7,4) e fatiados. Posteriormente, foram colocados em tubos eppendorf contendo os seguintes meios de incubação (Tabela 2):

**Tabela 2: Composição dos meios de incubação utilizados nos experimentos de captação de 2-Deoxi-1- $^{14}$ C-Glicose**

Estruturas do SN	Estruturas do SN e Músculo Esquelético
Com Lactato	Sem Lactato
- 0,5 mL de solução fisiológica;	- 0,5 mL de solução fisiológica;
- 10 mM de lactato;	- 0,15 $\mu\text{Ci}$ de 2-Deoxi-1- $^{14}$ C-Glicose;
- 0,15 $\mu\text{Ci}$ de 2-Deoxi-1- $^{14}$ C-Glicose (55mCi/mmol – Amersham International);	- $\beta$ -ciclodextrina (CTR) ou DHEA $10^{-8}$ ou DHEA $10^{-12}$ M.
- $\beta$ -ciclodextrina (CTR) ou DHEA $10^{-8}$ ou DHEA $10^{-12}$ M.	

A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ , na proporção 95:5%, v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante à  $37^\circ\text{C}$  por noventa minutos.

Ao final do tempo experimental, os tubos foram imersos imediatamente em recipiente com gelo para interromper os processos metabólicos. Imediatamente após as amostras foram removidas do meio de incubação, lavadas duas vezes em solução fisiológica gelada, com o

objetivo de retirar o excesso de radioatividade adsorvida ao tecido. Depois de secas em papel filtro, foram colocadas em frascos com tampa de rosca contendo 1,0 mL de água destilada. Após, estes frascos foram congelados e fervidos alternadamente por três vezes, para romper as células e liberar o conteúdo captado pelo tecido. Este conteúdo liberado foi considerado o meio interno, e o meio de incubação, o externo.

Para avaliar a captação de glicose foi colocado 0,1 mL do meio interno ou do meio externo em 2,5 mL de líquido de cintilação [tolueno– triton X-100 (2:1), PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] para medida de radioatividade. Esta medida foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac) com 97% de eficiência. Os resultados da captação de glicose foram expressos pela medida da radioatividade contida no meio interno (2-Deoxi-1-<sup>14</sup>C-Glicose captada pelo tecido) e no meio externo (meio de incubação) (T/M: dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo), conforme descrito por Machado et al. (1991).

### 3.3 OXIDAÇÃO DE L-<sup>14</sup>C-LACTATO OU DE D-U-<sup>14</sup>C-GLICOSE

A determinação da formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> foi feito de acordo com Torres e colaboradores (2001). Hipotálamo, fatias de córtex cerebral e músculo esquelético foram coletados e colocados em solução fisiológica gelada. Em seguida, os tecidos foram secos em papel filtro e colocados em vidros com tampa de borracha contendo 1mL de um dos meios de incubação.

Para as estruturas do SN foram utilizados os seguintes meios:

1. CTR <sup>14</sup>C-glicose+lactato: 0,15 µCi de D-U-<sup>14</sup>C-glicose (3,0 mCi/ mmol – Amersham International), 5 mM de glicose, 10 mM de lactato e 10<sup>-6</sup> M de β-cilclodextrina;
2. CTR <sup>14</sup>C-lactato: 0,15 µCi de L-<sup>14</sup>C-lactato (108,3 mCi/ mmol – Amersham International), 10mM de lactato e 10<sup>-6</sup> M de β-cilcodextrina;
3. DHEA 10<sup>-8</sup>: 0,15 µCi de L-<sup>14</sup>C-lactato, 10 mM de lactato e DHEA 10<sup>-8</sup> M.

Para a verificação da formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de D-U- $^{14}\text{C}$ -glicose em músculo esquelético foram usados os meios abaixo:

1. CTR  $^{14}\text{C}$ -glicose: 0,15  $\mu\text{Ci}$  de D-U- $^{14}\text{C}$ -glicose, 5 mM de glicose e  $10^{-6}$  M de  $\beta$ -cildodextrina;
2. DHEA  $10^{-8}$ : 0,15  $\mu\text{Ci}$  de D-U- $^{14}\text{C}$ -glicose e DHEA  $10^{-8}$  M.

Às tampas de borracha estava acoplado um vidro em formato de “J” com um poço com papel filtro para a captação do  $^{14}\text{CO}_2$  resultante da oxidação do substrato radioativo. Os tecidos foram aerados com carbogênio ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ , 95:5% v/v), os tubos fechados e vedados com parafilme. A incubação foi de 90 minutos, a  $37^\circ\text{C}$  com agitação constante. A reação de oxidação foi interrompida injetando-se 0,25 mL de TCA 50% no meio de incubação, através da tampa de borracha, e 0,25 mL de NaOH nos poços de captação do  $\text{CO}_2$ . A reação de “captação do  $^{14}\text{CO}_2$ ” ocorreu *overnight*. Na manhã seguinte, foram retirados os vidros em formato de “J” e colocados em viais com 9 mL do líquido de cintilação, os quais foram levados a um contador LKB-Wallac com 95% de eficiência, para determinar a formação do  $^{14}\text{CO}_2$ . Os resultados foram expressos em  $^{14}\text{C}$ -lactato ou  $^{14}\text{C}$ -glicose incorporado em  $^{14}\text{CO}_2$ /grama de tecido/ hora de incubação.

### 3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para analisar a influência do lactato sobre a captação de 2- $^{14}\text{C}$ -DG em cada tecido foi utilizando o teste t de Student para dados não pareados.

Diferenças na captação de 2- $^{14}\text{C}$ -DG entre as várias estruturas foram analisados por ANOVA (análise de variância) de uma via e para verificar a relação entre doses de DHEA, tempo de incubação e influência do lactato foi realizada ANOVA de duas vias, com teste de comparação de Student-Newman Keuls (SNK).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.

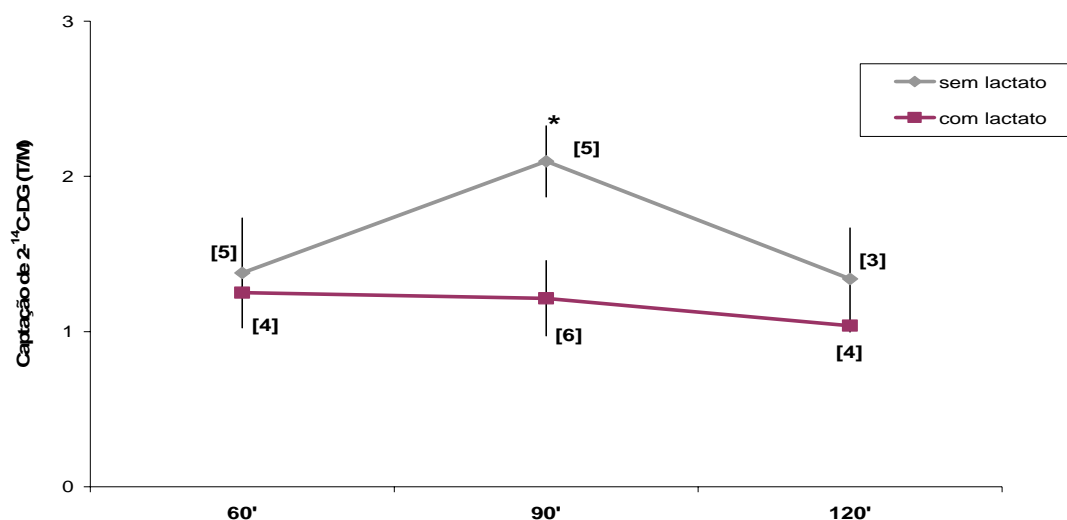
As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05 e as análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO

Para determinação do tempo de captação a ser utilizado nos demais experimentos, fatias de cerebelo foram incubadas com 2-<sup>14</sup>C-Deoxi-Glicose por sessenta, noventa ou cento e vinte minutos, num meio de incubação controle, ou seja, na presença de β-ciclodextrina (Figura 3). Também foi analisada a influência da presença de lactato sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG.

Houve diferença estatística significativa entre 90 minutos versus 60 e 120 minutos na ausência de lactato ( $p = 0,014$ ), sendo o primeiro o tempo de incubação escolhido.



**Figura 3: Curva de captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença ou ausência de lactato, para determinar o tempo de incubação (na presença de β-ciclodextrina).**

Os resultados foram expressos em média ± DP. O número de animais utilizados está representado entre colchetes. Resultados expressos em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo). Análise de variância indicou diferença estatística ( $p = 0,014$ ):

\* diferença entre 90 minutos versus 60 e 120 minutos na ausência de lactato.



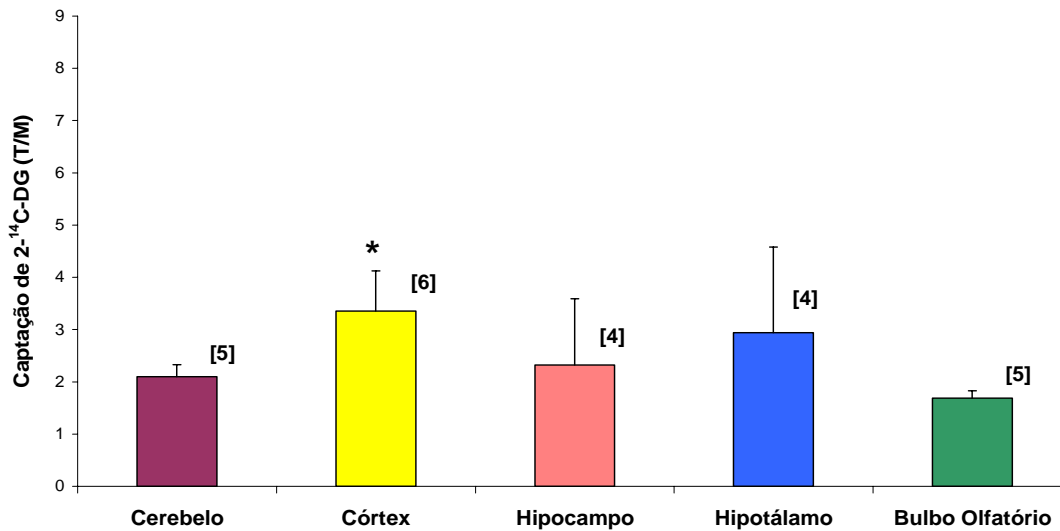
## 4.2 EFEITO DA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LACTATO SOBRE A CAPTAÇÃO DE 2-<sup>14</sup>C-DG NAS DIFERENTES ESTRUTURAS DO SISTEMA NERVOSO EM MEIO CONTROLE

A Figura 4 mostra a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG na ausência de lactato, pelas diferentes estruturas estudadas, em meio de incubação controle (contendo  $\beta$ -ciclodextrina  $10^{-6}$ M). O córtex cerebral teve os maiores valores de captação ( $3,35 \pm 0,77$ ), e diferiu significativamente apenas das taxas obtidas pelo bulbo olfatório ( $1,69 \pm 0,14$ ;  $p = 0,041$ ), que foi a menor dentre todos os tecidos testados.

Já a presença de lactato (Figura 5), alterou o perfil de captação de 2-<sup>14</sup>C-DG. O hipotálamo alcançou as maiores médias de captação de 2-<sup>14</sup>C-DG ( $7,24 \pm 0,81$ ). Hipocampo e bulbo olfatório alcançaram valores muito próximos ( $3,04 \pm 0,46$  e  $2,88 \pm 0,38$ , respectivamente) e significativamente maiores que as taxas de captação do córtex ( $1,61 \pm 0,52$ ) e cerebelo ( $1,25 \pm 0,04$ ).

Quando comparamos a captação na ausência ou presença de lactato (tabela 3), observa-se a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG pelo bulbo olfatório ( $p \leq 0,001$ ) e hipotálamo ( $p=0,001$ ) foi maior na presença de lactato. Córtex e cerebelo, ao contrário das estruturas anteriores, diminuíram a captação na presença deste substrato ( $p = 0,002$  e  $p \leq 0,001$ , respectivamente).

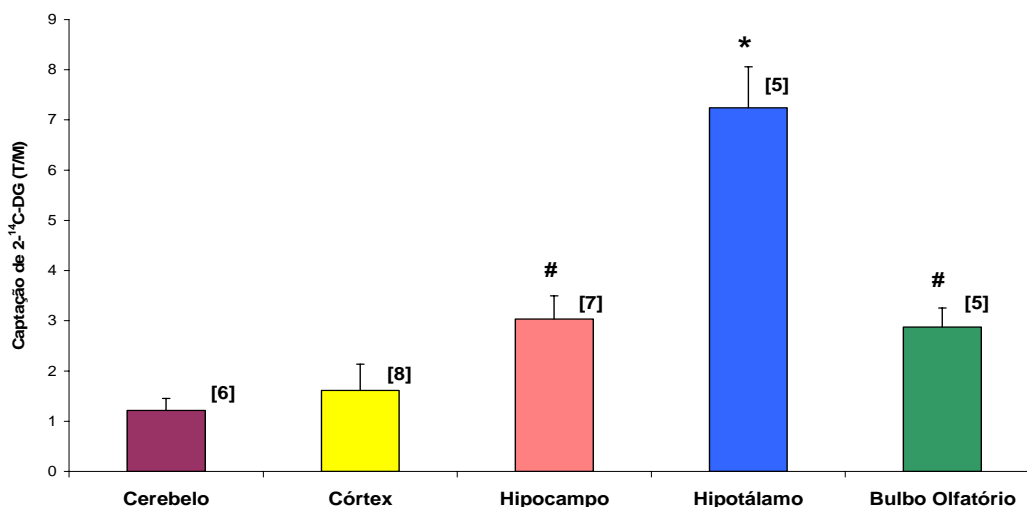
O hipocampo foi a única área do sistema nervoso que não modificou a captação de glicose na presença ou ausência de lactato ( $p = 0,199$ ).



**Figura 4: Captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na ausência de lactato, entre diferentes estruturas do sistema nervoso em meio controle (contendo  $\beta$ -ciclodextrina 10<sup>-6</sup>M)**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. O número de animais utilizados está representado entre colchetes. Resultados expressos em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo). Análise de variância indicou as seguintes diferenças estatísticas ( $p = 0,041$ ):

\* significativamente diferente do bulbo olfatório



**Figura 5: Captação de 2-<sup>14</sup>C-DG, na presença de lactato 10mM, entre diferentes estruturas do sistema nervoso em meio controle (contendo  $\beta$ -ciclodextrina 10<sup>-6</sup>M)**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. O número de animais utilizados está representado entre colchetes. Resultados expressos em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo)

Análise de variância indicou as seguintes diferenças estatísticas ( $p \leq 0,001$ ):

- \* diferente de todas as estruturas
- # diferente de cerebelo e córtex

**Tabela 3: Comparação dos valores de captação de 2-<sup>14</sup>C-DG entre incubações realizadas na presença e ausência de lactato em meio controle**

Tecido	Sem lactato	Com lactato	Significância Estatística
Cerebelo	2,10 $\pm$ 0,23 (5)	1,21 $\pm$ 0,24 (6) *	$p \leq 0,001$
Córtex	3,35 $\pm$ 0,77 (6)	1,61 $\pm$ 0,52 (8) *	$p = 0,002$
Hipocampo	2,32 $\pm$ 1,27 (4)	3,04 $\pm$ 0,46 (7)	$p = 0,199$
Hipotálamo	2,94 $\pm$ 1,64 (4)	7,24 $\pm$ 0,81 (5) *	$p = 0,001$
Bulbo Olfatório	1,69 $\pm$ 0,14 (5)	2,88 $\pm$ 0,38 (5) *	$p \leq 0,001$

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. O número de animais utilizados está representado entre parênteses. Resultados expressos em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo). Análise estatística: teste t de Student:

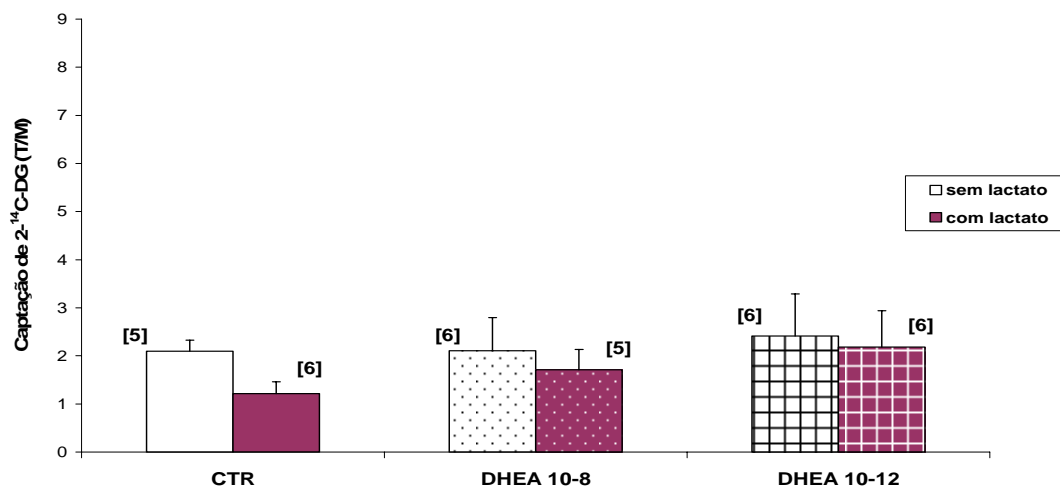
- \* diferença estatística entre meio contendo lactato versus meio sem lactato

### 4.3 AÇÃO DA DHEA SOBRE A CAPTAÇÃO DE 2-<sup>14</sup>C-DG NO SISTEMA NERVOSO

Testou-se a interação entre a presença ou ausência de um substrato energético (10 mM de lactato) e a ação da DHEA sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG.

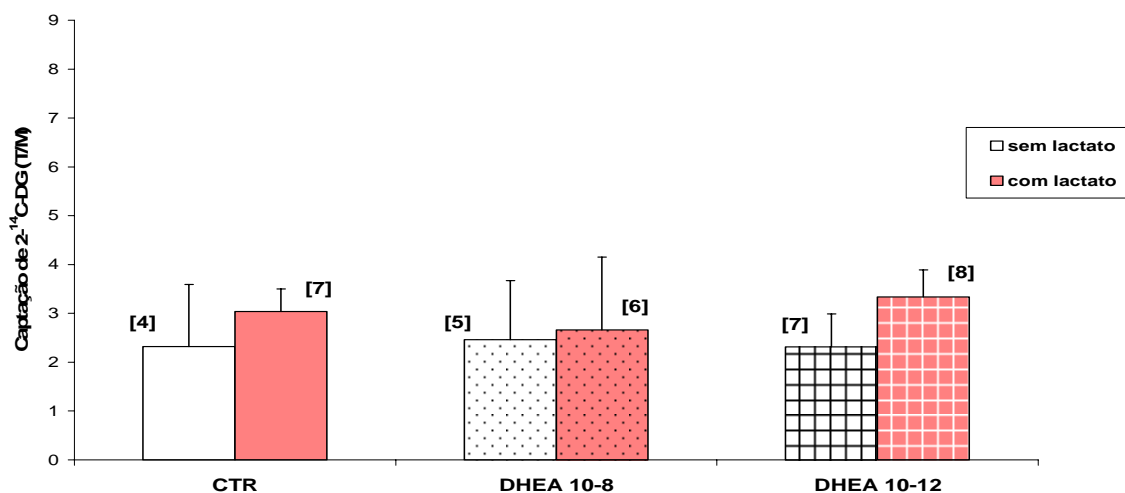
Cerebelo (Figura 6;  $p = 0,433$ ), hipocampo (Figura 7;  $p = 0,561$ ) e hipotálamo (Figura 8;  $p = 0,364$ ), segundo a análise de variância de duas vias, não há interação estatisticamente significativa entre as doses de DHEA e a composição do meio de incubação, ou seja, não sofreram efeito do hormônio, tanto na presença quanto na ausência de lactato.

Já no córtex cerebral (Figura 9) houve aumento da captação de glicose radioativa na dose de DHEA  $10^{-8}$ M na presença de lactato ( $p \leq 0,001$ ). No bulbo olfatório (Figura 10) este aumento foi verificado na mesma dose, porém na ausência de lactato ( $p=0,009$ ).



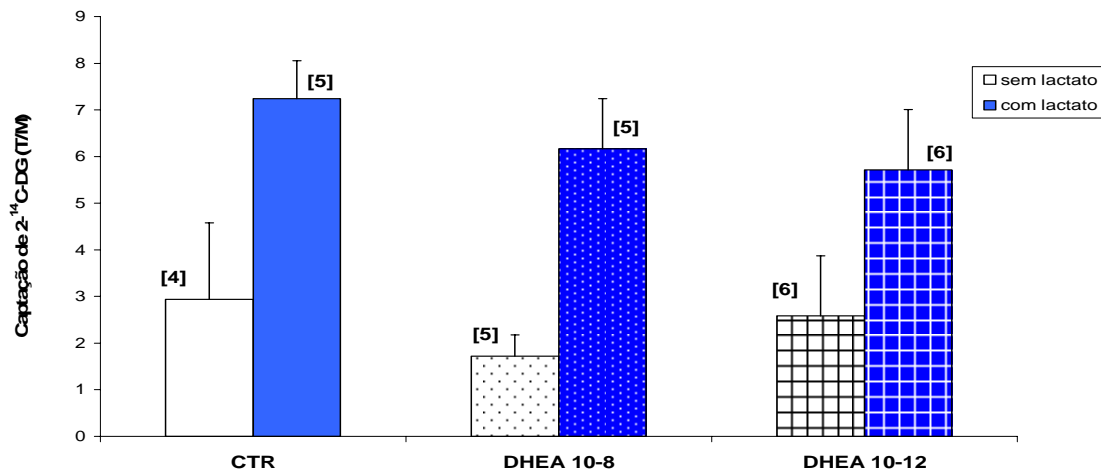
**Figura 6: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* ( $10^{-8}$  e  $10^{-12}$ M) versus controle (CTR, contendo  $10^{-6}$ M de  $\beta$ -ciclodextrina) sobre a captação de  $2^{-14}$ C-DG, na presença e ausência de 10 mM de lactato, por cerebello.**

O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. Resultado expresso em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo). ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa entre os grupos ( $p=0,433$ ).



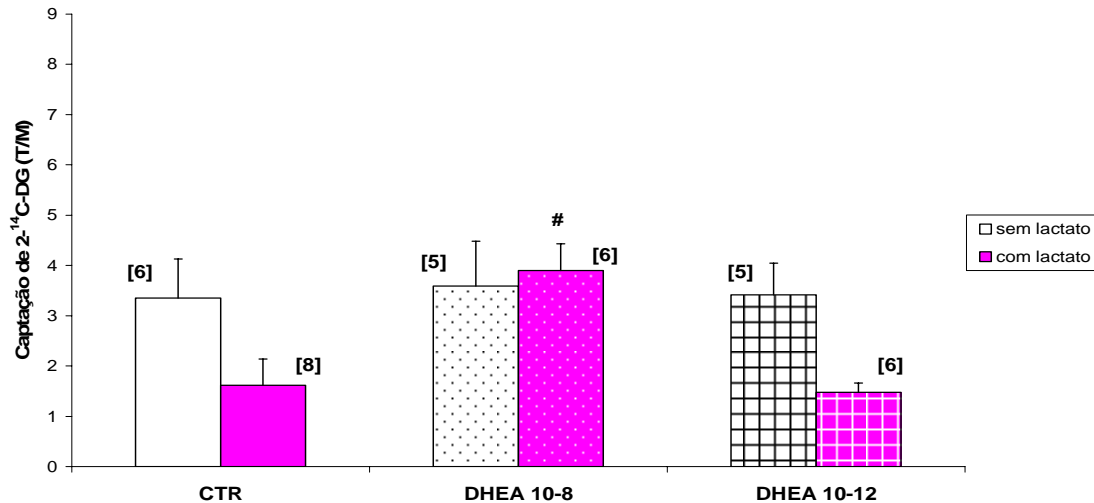
**Figura 7: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* ( $10^{-8}$  e  $10^{-12}$ M) versus controle (CTR, contendo  $10^{-6}$ M de  $\beta$ -ciclodextrina) sobre a captação de  $2^{-14}$ C-DG, na presença e ausência de 10 mM de lactato, por hipocampo.**

O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. Resultado expresso em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo). ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,561$ ).



**Figura 8:** Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* ( $10^{-8}$  e  $10^{-12}$ M) versus controle (CTR, contendo  $10^{-6}$ M de  $\beta$ -ciclodextrina) sobre a captação de  $2\text{-}^{14}\text{C-DG}$ , na presença e ausência de 10 mM de lactato, por hipotálamo.

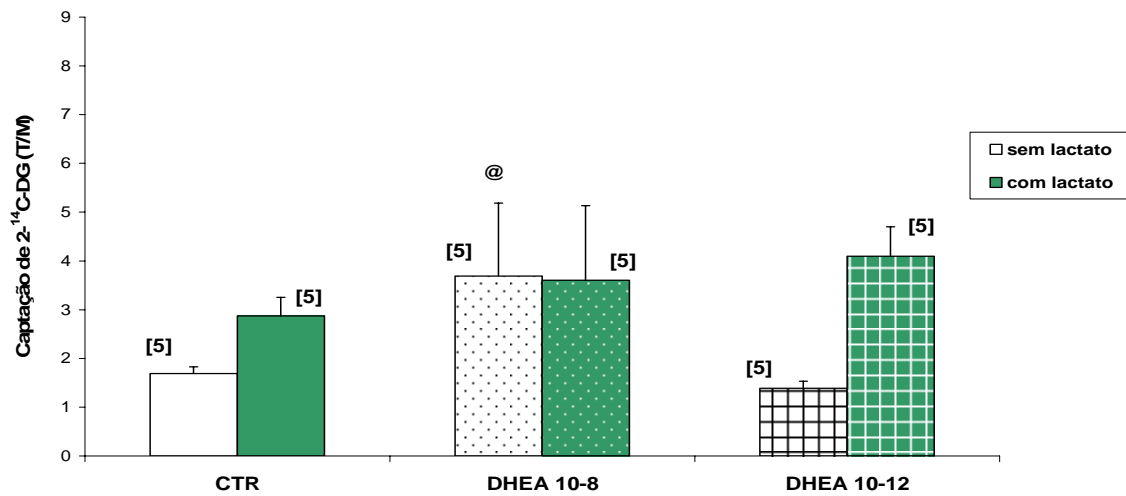
O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. Resultado expresso em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo). ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,364$ ).



**Figura 9:** Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* ( $10^{-8}$  e  $10^{-12}$ M) versus controle (CTR, contendo  $10^{-6}$ M de  $\beta$ -ciclodextrina) sobre a captação de  $2\text{-}^{14}\text{C-DG}$ , na presença e ausência de 10 mM de lactato, por córtex cerebral.

O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. Resultado expresso em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo).

# Diferença significativa em relação ao CTR e à DHEA  $10^{-12}$ M (ANOVA uma via;  $p < 0,05$ ). ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa entre os grupos ( $p \leq 0,001$ ).



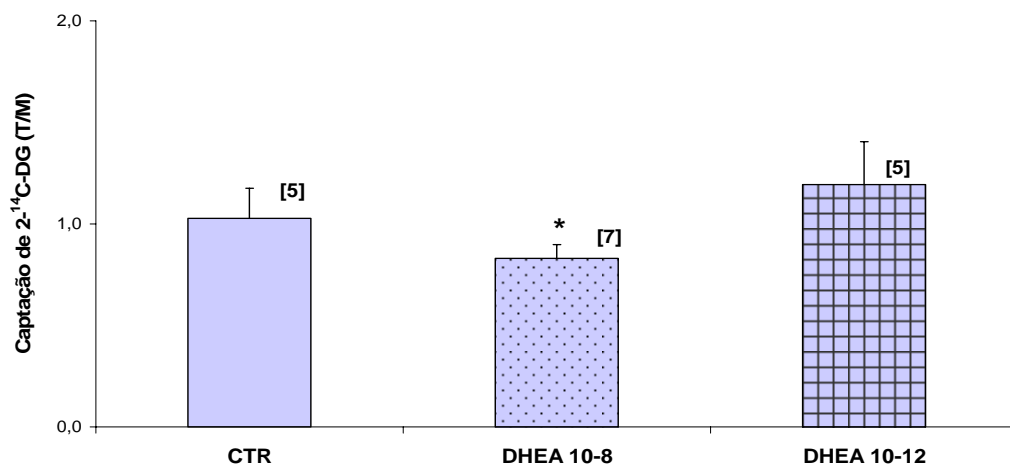
**Figura 10: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* ( $10^{-8}$  e  $10^{-12}$ M) versus controle (CTR, contendo  $10^{-6}$ M de  $\beta$ -ciclodextrina) sobre a captação de  $2^{-14}$ C-DG, na presença e ausência de 10 mM de lactato, por bulbo olfatório.**

O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. Resultado expresso em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo).

@ Diferença significativa em relação ao CTR e à DHEA  $10^{-12}$ M (ANOVA uma via;  $p < 0,05$ ). ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,009$ ).

#### 4.4 AÇÃO DA DHEA SOBRE A CAPTAÇÃO DE 2-DEOXI-1-<sup>14</sup>C-GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético (Figura 11) teve uma captação de 2-<sup>14</sup>C-DG menor que todas as estruturas do SN testadas. A dose de DHEA que teve efeito sobre este tecido foi 10<sup>-8</sup>M, diminuindo a captação (p = 0,003), tanto em relação ao controle quanto à dose de 10<sup>-12</sup>M.



**Figura 11: Efeito de duas doses de DHEA *in vitro* (10<sup>-8</sup> e 10<sup>-12</sup>M) versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de  $\beta$ -ciclodextrina) sobre a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG no músculo esquelético.**

O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. Resultado expresso em Tecido/Meio (dpm/mL meio interno dividido por dpm/mL de meio externo).

\* DHEA 10<sup>-8</sup> versus CTR e DHEA 10<sup>-12</sup> (p = 0,003).

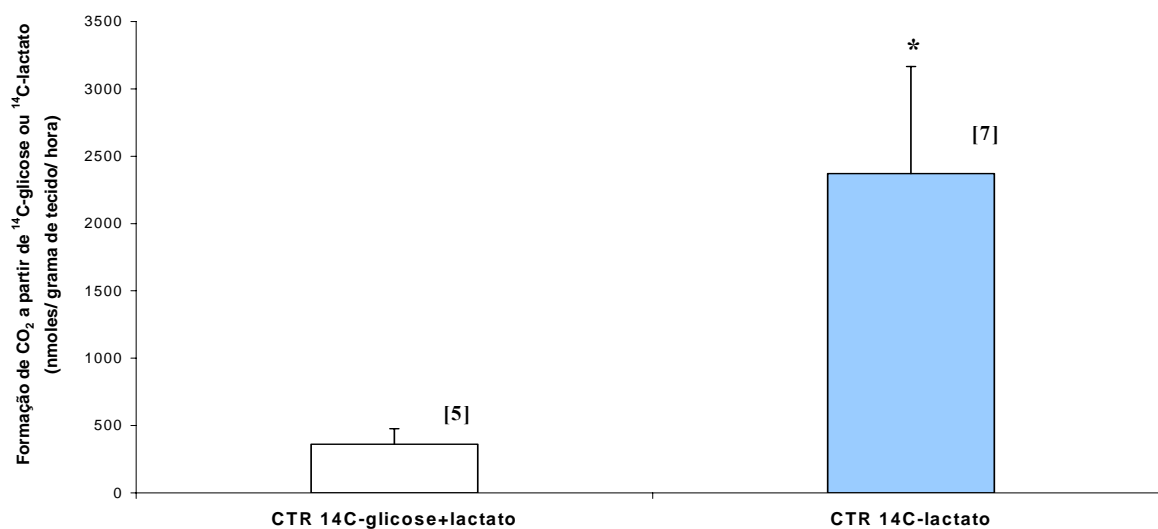


#### 4.5 OXIDAÇÃO DE <sup>14</sup>C-GLICOSE OU <sup>14</sup>C-LACTATO PELO SISTEMA NERVOSO EM MEIO CONTROLE

Bueno e colaboradores (1994) demonstraram que fatias de cerebelo foram capazes de, em média, oxidar 3,25 vezes mais lactato (10 mM) quando comparado à glicose (5 mM). Assim, testou-se a possível influência da presença de lactato 10 mM sobre a oxidação de <sup>14</sup>C-glicose no hipotálamo, onde se localizam glicceptores (SONG & ROUTH, 2005), e no córtex cerebral. Também foi comparado com a oxidação realizada utilizando apenas <sup>14</sup>C-lactato. Estes parâmetros foram avaliados utilizando meio de incubação controle (que contém β-ciclodextrina) e o mesmo tempo escolhido para a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG (Figura 3).

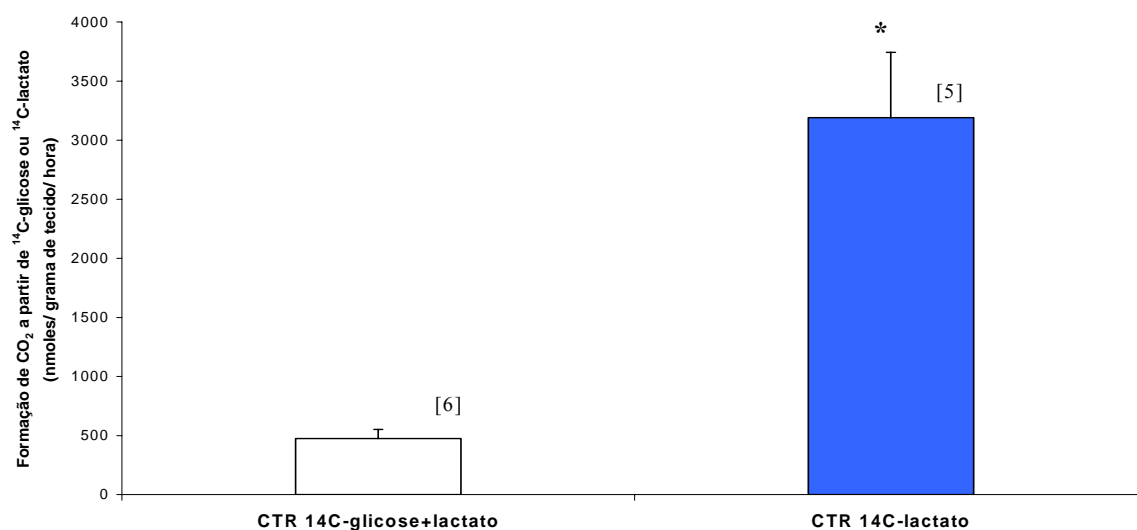
A oxidação de <sup>14</sup>C-lactato no hipotálamo (Figura 12;  $p \leq 0,001$ ) e no córtex (Figura 13;  $p \leq 0,001$ ) foi em média, 6,6 vezes maior do que os valores obtidos com <sup>14</sup>C-glicose na presença de lactato 10 mM. Portanto, o lactato é oxidado preferencialmente *in vitro*, quando comparado à glicose.

Os resultados aqui apresentados também mostraram que existe uma diferença na oxidação de glicose no meio com lactato e sem lactato.



**Figura 12: Formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de <sup>14</sup>Cglicose (+ 10mM lactato + 5mM glicose) ou <sup>14</sup>C-lactato (+ 10mM lactato) no hipotálamo em meio controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina)**

Os resultados foram expressos em média ± DP. O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Resultados expressos em μMolar/grama de tecido/hora de incubação. Análise: Teste t de Student \* CTR <sup>14</sup>C-glicose (10 mM de lactato e 5 mM de glicose) versus CTR <sup>14</sup>C-lactato (10mM de lactato) (p ≤ 0,001)



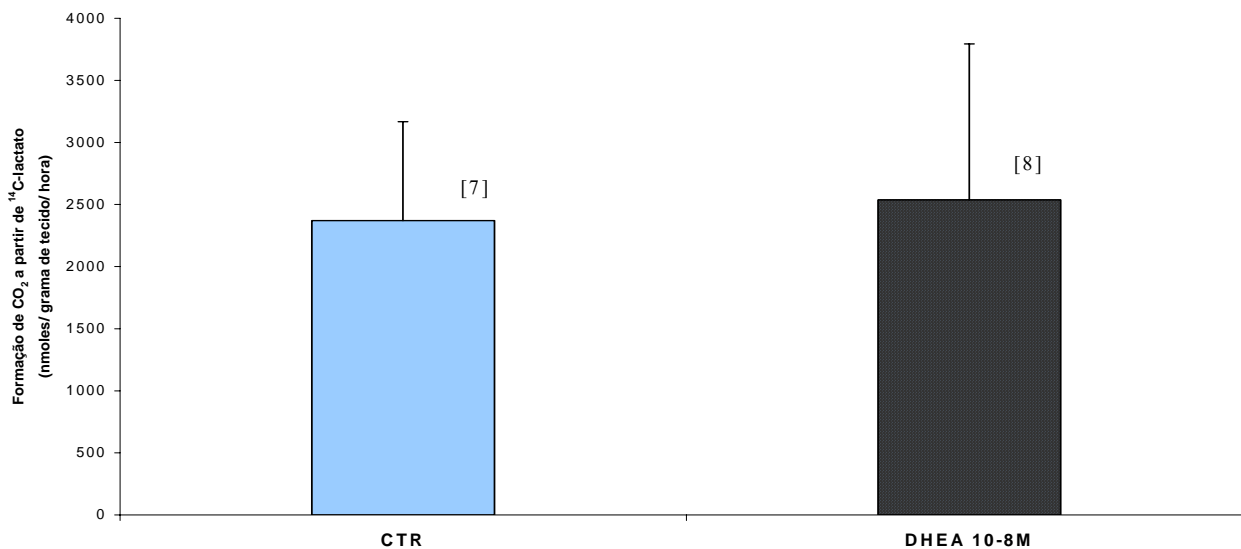
**Figura 13: Formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de <sup>14</sup>Cglicose (+ 10mM lactato + 5mM glicose) ou <sup>14</sup>C-lactato (+ 10mM lactato) no córtex cerebral em meio controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina)**

Os resultados foram expressos em média ± DP. O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Resultados expressos em μMolar/grama de tecido/hora de incubação. Análise: Teste t de Student. \* CTR <sup>14</sup>C-glicose (10 mM de lactato e 5 mM de glicose) versus CTR <sup>14</sup>C-lactato (10mM de lactato) (p ≤ 0,001)

#### **4.6 EFEITO DA DHEA SOBRE A OXIDAÇÃO DE <sup>14</sup>C-LACTATO NO SISTEMA NERVOSO**

Testou-se o efeito da DHEA sobre a oxidação de <sup>14</sup>C-lactato utilizando-se a dose de 10<sup>-8</sup>M, pois esta estimulou a captação no córtex (Figura 7), e como tecido controle foi escolhido o hipotálamo, pelos altos valores de captação de glicose alcançados na presença de lactato.

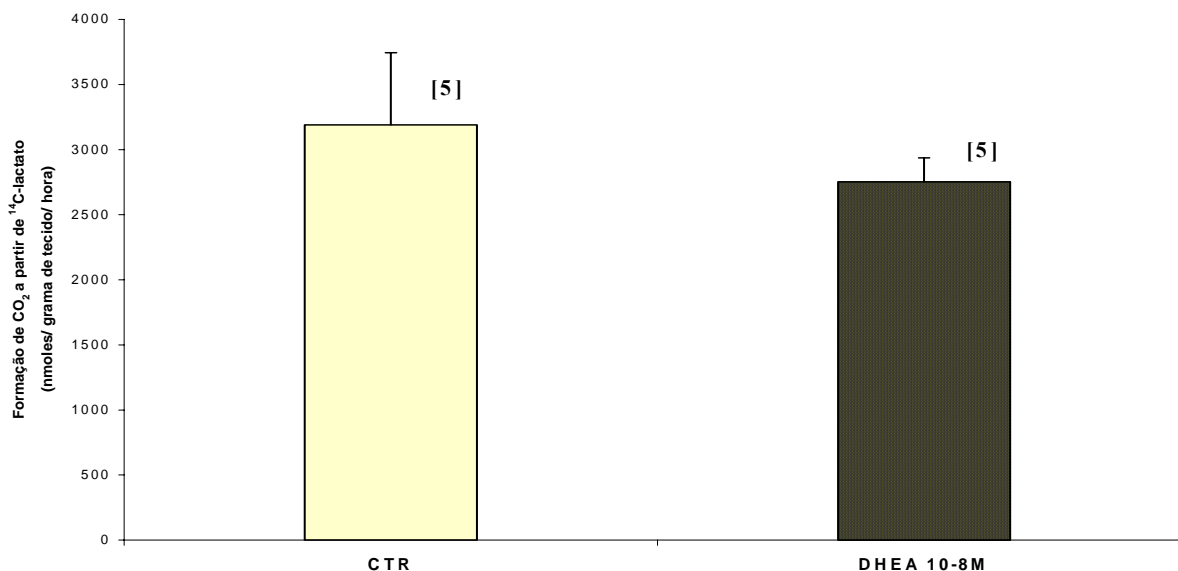
A dose de DHEA utilizada não modificou a oxidação de <sup>14</sup>C-lactato em hipotálamo (Figura 14; p = 0,770) e córtex cerebral (Figura 15; p = 0,131) quando comparadas aos seus respectivos controles (CTR).



**Figura 14: Efeito da DHEA 10<sup>-8</sup>M sobre a formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de <sup>14</sup>C-lactato por hipotálamo versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina)**

Os resultados foram expressos em média ± DP. O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Resultados expressos em μMolar/grama de tecido/hora de incubação.

Análise: Teste t de Student. Não houve diferença estatística entre Controle (CTR) e DHEA 10<sup>-8</sup>M (p = 0,770)

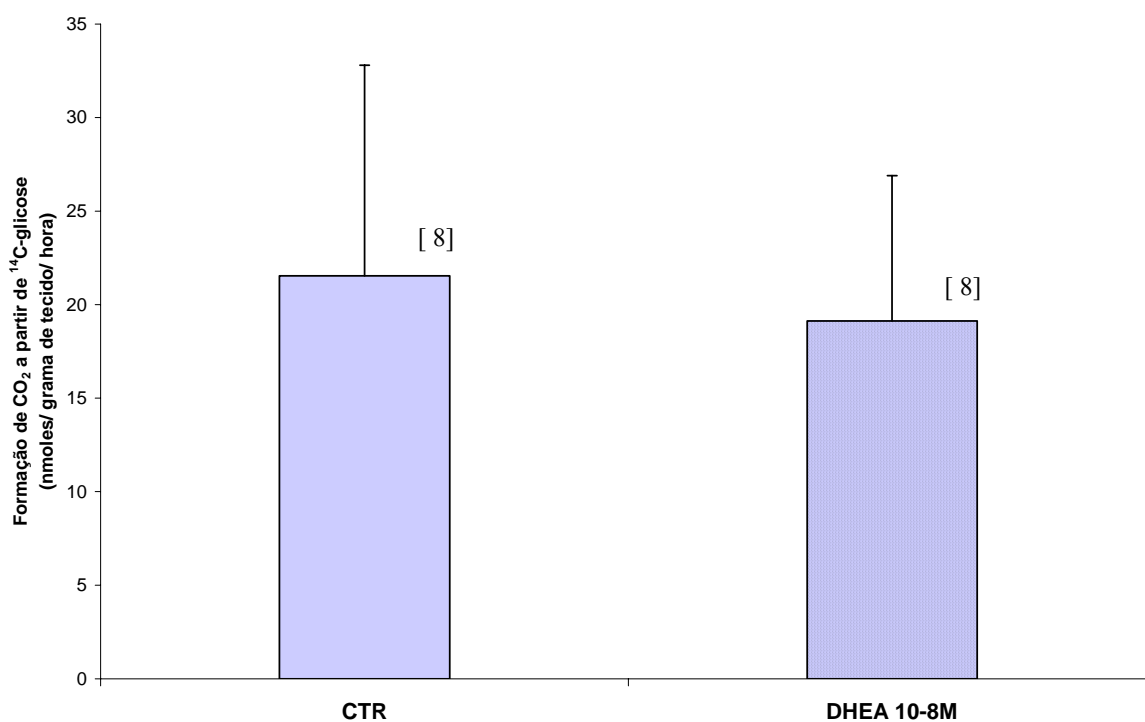


**Figura 15: Efeito da DHEA 10<sup>-8</sup>M sobre a formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de <sup>14</sup>C-lactato por córtex cerebral versus controle (CTR, contendo 10<sup>-6</sup>M de β-ciclodextrina).**

Os resultados foram expressos em média ± DP. O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Resultados expressos em μMolar/grama de tecido/hora de incubação. Análise: Teste t de Student. Não houve diferença estatística entre Controle (CTR) e DHEA 10<sup>-8</sup>M (p = 0,131).

#### 4.7 AÇÃO DA DHEA SOBRE A OXIDAÇÃO DE $^{14}\text{C}$ -GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Testou-se a ação da DHEA  $10^{-8}\text{M}$  (dose que teve efeito sobre a captação de 2- $^{14}\text{C}$ -DG) sobre a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose no músculo esquelético (Figura 16) e observou-se que o hormônio *in vitro* não exerceu efeito sobre este parâmetro.



**Figura 16: Efeito da DHEA  $10^{-8}\text{M}$  sobre a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir do substrato radioativo  $^{14}\text{C}$ -glicose no músculo esquelético**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. O número de animais utilizados está expresso entre colchetes. Resultado expresso em  $\mu\text{Molar}$ /grama de tecido/hora de incubação.

Análise: Teste t de Student. Não há diferença estatística ( $p = 0,627$ ) entre a dose de DHEA testada quando comparada ao controle (contendo  $10^{-6}\text{M}$  de  $\beta$ -ciclodextrina).

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de captação de 2-Deoxi-<sup>14</sup>C-1-glicose *in vitro* em diferentes estruturas do SN (córtex cerebral, cerebelo, hipocampo, hipotálamo e bulbo olfatório) e a influência do lactato sobre este parâmetro. Também foi determinado se, a presença de lactato no meio de incubação, altera a oxidação da <sup>14</sup>C-glicose quando comparada a um meio no qual havia apenas <sup>14</sup>C-lactato em duas das estruturas testadas (córtex e hipotálamo).

Também determinou-se o efeito da DHEA *in vitro* sobre a captação de 2-Deoxi-<sup>14</sup>C-1-glicose pelas mesmas estruturas do SN, também na presença e ausência de lactato, e foi avaliado a ação deste neuroesteróide sobre a oxidação de <sup>14</sup>C-lactato.

Existem diferenças na captação de glicose *in vivo* em diferentes regiões do SN e isto varia de acordo com o fluxo sanguíneo basal de cada estrutura, suas necessidades intrínsecas e expressão de enzimas que fazem parte do metabolismo energético. Também existem diferenças na expressão enzimática de neurônios e da glia, indicando capacidades diferentes de metabolização de nutrientes (CLARKE & SOKOLOFF, 1999; BOROWSKY & COLLIN, 1989; LAUGHTON *et al.*, 2000). Porém, neste trabalho, todos os experimentos foram realizados *in vitro* e sob condições basais, ou seja, na ausência de estimulação elétrica. Também não é possível estabelecer a contribuição de cada tipo celular (microglia, astrócitos, neurônios) nestes resultados.

Apesar de ser inicialmente fosforilada (MAGISTRETTI, 1999) e, até mesmo, entrar na rota de síntese de glicogênio (COOPERSMITH & LEON, 1995), a 2-<sup>14</sup>C-DG não pode ser oxidada e gerar ATP. Portanto, pode haver déficit na produção de ATP, visto que, os níveis de glicogênio no SN, que têm capacidade de manter a atividade sináptica, são baixos (BROWN *et al.*, 2004).

Fatias de hipocampo *in vitro* têm depleção de 50% nos níveis de ATP e creatina fosfato após 60 minutos de incubação em meio sem glicose (WADA *et al.*, 1998), além de esta, ser considerada uma condição pró-apoptótica (LIN *et al.*, 2004). Logo, a suplementação com substrato energético poderia reverter esta condição e até mesmo influenciar a captação de glicose (YANG *et al.*, 2000; MURATA *et al.*, 1998). O substrato energético escolhido para suplementar os meios de incubação foi o lactato, pois estudos *in vitro* demonstram a grande capacidade que o SN tem de oxidar o lactato (BUENO *et al.*, 1994).

Na ausência de lactato (Figura 4), os valores de captação de glicose radioativa foram baixos e não houve diferenças significativas entre as estruturas, com exceção do córtex cerebral, que possui os maiores valores de captação de glicose, e bulbo olfatório, que teve os menores. Porém, na presença de lactato (Figura 5), percebe-se diferenças significativas entre as estruturas: o hipotálamo possui os maiores valores, seguido de hipocampo e bulbo olfatório e, os menores, córtex cerebral e cerebelo.

Quando compara-se o efeito da adição de lactato 10mM no meio (Tabela 3), observa-se que este substrato atua de maneira diferente nas diferentes estruturas. No bulbo olfatório e hipotálamo foi capaz de estimular a captação; no córtex e cerebelo inibiu; e no hipocampo não exerceu efeito.

No hipotálamo há glicceptores, ou seja, neurônios sensíveis às alterações nas concentrações de glicose no interstício hipotalâmico (SONG & ROUTH, 2005; MARTY *et al.*, 2007). Porém, especula-se que estas células sejam sensíveis não apenas à glicose, mas também ao lactato (PIERRE & PELLERIN, 2005), fazendo desta região um sensor do status energético e não apenas glicêmico.

O lactato é capaz de aumentar a responsividade dos glicceptores na presença de glicose *in vitro*, aumentando a frequência de disparo mesmo na presença de concentrações de glicose próximas do limiar de sensibilidade do receptor (SONG & ROUTH, 2005). O lactato

também mimetiza os efeitos da glicose sobre a liberação sistêmica dos hormônios contra-reguladores à ação da insulina (BORG et al., 1997; BORG et al., 2003) e sobre a inibição da gliconeogênese e glicogenólise hepáticas (LAM *et al.*, 2005).

No presente trabalho, a adição de lactato ao meio de incubação dobrou a captação de 2-<sup>14</sup>C-DG no hipotálamo (Tabela 3). Isto pode ocorrer pela sensibilização dos glicceptores pela presença de lactato, levando a um aumento na captação de glicose radioativa.

Estes dois substratos são fontes para geração de ATP pelas células do hipotálamo, logo os altos valores de captação podem dever-se à alta demanda energética desta região verificada *in vitro* (Figura 5). Sob condições de déficit energético (Figura 4), esse perfil não pode se manter, e a captação diminui. Assim, são necessários mais estudos para compreender a interação entre os dois substratos e a relação destes achados com os demais núcleos e tipos de células hipotalâmicas, pois a metodologia utilizada não fornece outras informações a respeito do metabolismo energético do hipotálamo.

No bulbo olfatório o aumento na captação de 2-<sup>14</sup>C-DG foi de 170%, quando comparado ao tecido incubado sem lactato (Tabela 3). A glicose poderia ser captada por células da glia e metabolizada a lactato, como ocorre no córtex. O perfil encontrado indica que o lactato e a glicose podem ser usados como fonte de ATP, porém, sob condições de não estimulação o substrato preferencial deste tecido parece ser a glicose (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2003). Esta estrutura possui grande reserva de glicogênio, logo a captação aumentada de glicose pode ser utilizada para a preservação do glicogênio para suprir as necessidades nutricionais do tecido, pois, segundo experimentos realizados por Coopersmith & Leon (1995), quando o bulbo foi incubado com glicose, o pico de formação de glicogênio foi alcançado exatamente aos 90 minutos.

Já o hipocampo não se mostrou sensível à presença de lactato (Tabela 3). Estudos indicam que o lactato pode manter as funções do tecido nervoso sob condições adversas (na



ausência de glicose, sob estimulação de altas concentrações de glutamato) (IZUMI *et al.*, 1997; SCHURR *et al.*, 1999). Porém, mesmo na ausência de glicose, o lactato não mantém a atividade elétrica de neurônios hipocampais tanto *in vivo* como *in vitro* (WADA *et al.*, 1998; GILBERT *et al.*, 2006), nem aumenta os níveis de ATP e creatina fosfato (YAMANE *et al.*, 1996). Além disso, a concentração alta de lactato (10 mM) não altera a captação de 2-DG radioativa do hipocampo (GILBERT *et al.*, 2006). Logo, a glicose parece ser o substrato fisiológico preferencial para o hipocampo, pois, este tecido o oxida *in vitro*, preferencialmente quando comparado ao lactato (GILBERT *et al.*, 2006). Porém, não se pode excluir que, na deficiência energética (Figuras 4 e 5), o lactato possa ser oxidado para manter o metabolismo energético e as funções hipocampais.

Córtex cerebral e cerebelo, quando perfundidos por solução rica em lactato (20 mM), diminuíram sua captação de glicose (MURATA *et al.*, 1998). No presente trabalho, a inibição da captação foi de 208% e 173%, respectivamente. Estudos *in vitro* já demonstraram a grande capacidade de utilização de lactato por fatias de cerebelo (BUENO *et al.*, 1994) e córtex cerebral (WADA *et al.*, 1998).

Prichard e colaboradores (1991) realizaram um estudo com imagem funcional do córtex cerebral visual de humanos, no qual demonstraram que, durante a estimulação sensorial, o desacoplamento entre aumento do fluxo sanguíneo e utilização de glicose e o consumo de O<sub>2</sub> leva à produção transitória de lactato, e este seria utilizado como substrato energético preferencial pelos neurônios nesta estrutura.

Com relação à comparação da oxidação de <sup>14</sup>C-glicose com 10 mM de lactato versus meio contendo somente <sup>14</sup>C-lactato, observou-se que os valores de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produzido pelo primeiro meio foi aproximadamente 6,6 vezes menor quando comparado ao meio contendo apenas lactato no córtex cerebral (Figura 13) e hipotálamo (Figura 12).

Bueno e colaboradores (1994) demonstraram que fatias de cerebelo foram capazes de, em média, oxidar 3,25 vezes mais lactato (10 mM) quando comparado à glicose (5 mM). A mesma preferência pela oxidação de lactato em relação à glicose foi demonstrado para córtex cerebral (MAGISTRETTI, 1999).

No entanto, o hipotálamo, na presença de 10 mM de lactato, possui maior captação (Figura 5), porém, menor oxidação de glicose (Figura 12). A presença de lactato, substrato preferencial para oxidação *in vitro*, provavelmente desvie a glicose para outras rotas biossintéticas, como a formação de glicogênio e até mesmo para sinalização da ingestão alimentar e concentração de glicose intersticial.

Também não se pode excluir a hipótese de que concentrações supra- fisiológicas de lactato possam influenciar os resultados, e que o uso de concentrações mais baixas deste substrato podem demonstrar um perfil metabólico diferente do encontrado no presente trabalho.

Além disso, testou-se o efeito de duas doses de DHEA *in vitro*,  $10^{-8}$  e  $10^{-12}$ M, sobre a captação de  $2\text{-}^{14}\text{C-DG}$  na diferentes estruturas do SN (cerebelo, hipocampo, hipotálamo, córtex cerebral e bulbo olfatório) na ausência (condição pró-apoptótica) e presença de substrato oxidativo, neste caso, o lactato.

Nenhuma das duas doses alterou a captação de glicose no cerebelo (Figura 6), no hipocampo (Figura 7) e no hipotálamo (Figura 8), independentemente da presença de lactato. No córtex cerebral (Figura 9), a DHEA  $10^{-8}$ M causou um aumento na captação de glicose na presença de lactato e no bulbo olfatório (Figura 10) a mesma dose do hormônio elevou a captação, porém, na ausência deste substrato. As ações do hormônio foram específicos de cada tecido e da dose, e também foram influenciadas pela presença de lactato, no córtex e bulbo olfatório.

A dose de  $10^{-8}$ M de DHEA já havia se mostrado efetiva no aumento da captação de glicose estimulada por insulina, em cultura de adipócitos *in vitro* (ISHIZUKA *et al.*, 1999). Doses menores de DHEA ( $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ M) *in vitro* não mostraram efeito inibitório sobre a respiração mitocondrial (SAFIULINA *et al.*, 2006). No entanto, em outras linhagens celulares (adipócitos e miócitos) (PERRINI *et al.*, 2004; NAKASHIMA *et al.*, 1995) encontrou-se uma elevação da captação apenas em doses maiores (entre  $10^{-6}$  e  $10^{-4}$ M), mesmo sob estimulação insulínica. Portanto, não apenas a dose, mas também o tipo celular e o modelo experimental influenciam nos resultados encontrados.

A atuação deste neuroesteróide sobre a viabilidade celular e o metabolismo intermediário é controversa, visto que observa-se tanto efeitos anti-proliferativos e apoptóticos como protetores (YANG *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2004; MORIN *et al.*, 2002). Altas concentrações de DHEA *in vitro* exercem efeitos anti-proliferativos de maneira dependente da dose: quanto maior a dose maior a mortalidade celular (células de microglia e hipotálamo). Este é potencializado pela diminuição ou ausência de glicose no meio (YANG *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2004); a presença de glicose suprime os efeitos anti-proliferativos (YANG *et al.*, 2000). Também se observa que em meio sem glicose a DHEA depleta os níveis de ATP, possivelmente por inibir a respiração mitocondrial *in vitro* (YANG *et al.*, 2002; SAFIULINA *et al.*, 2006). A inibição da função mitocondrial leva à ativação da glicólise, para suprir a falta de ATP, aumentando a captação de glicose (SAFIULINA *et al.*, 2006).

Quando este neuroesteróide é usado em concentrações menores (entre  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ M) em experimentos de estresse celular, tem efeito inibitório sobre a respiração mitocondrial (limitando o consumo de oxigênio), causa decréscimo moderado da síntese de ATP e, conseqüentemente, evita a formação do radical superóxido ( $O_2^-$ ). Também inibe os primeiros passos da apoptose celular, mediada pela mitocôndria, revelando assim um efeito anti-

apoptótico (MORIN *et al.*, 2002). A diminuição da síntese de ATP, poderia estimular a captação de glicose.

Porém, Gil e colaboradores (2001) demonstraram que a DHEA adicionada em meio de cultura de neurônios causa diminuição da viabilidade celular, independente da dose utilizada. Em cultura de células mistas (neurônios e células da glia) os efeitos anti-proliferativos do neuroesteróide são suprimidos, pois a glia é rica em compostos antioxidantes (glutathiona, vitamina E e C), além de secretarem fatores de crescimento que sustentam as células neurais. Um desses fatores é o IGF-1, que atua na reparação celular causada por injúria em células de hipocampo. O aumento de sua expressão está associada à elevação da captação de 2-<sup>14</sup>C-DG (BONDY *et al.*, 2006).

A DHEA utilizada *in vivo* apresenta uma atuação específica para o tecido e dose utilizada. Animais injetados com DHEA tiveram aumento da produção de IGF-1 quando a dose foi 50mg/kg e apenas no hipotálamo; não em outras regiões do encéfalo (RIBEIRO & GARCIA-SEGURA, 2002). No SN a maior parte das enzimas esteroideogênicas parecem se localizar no córtex, hipocampo, bulbo olfatório, hipotálamo e cerebelo (MELLON, GRIFFIN & CAMPAGNONE, 2001), logo, não se pode excluir a possibilidade de que a DHEA tenha sido metabolizada a outros esteróides neuroativos e estes tenham exercido o efeito sobre a captação de glicose. As diferenças regionais de metabolização deste esteróide podem ter influenciado os resultados obtidos. No entanto, a velocidade de conversão de DHEA *in vitro* por linhagens celulares obtidas de roedores é lenta e limitada. Em cultura de células de hipocampo e cerebelo a maior fração deste neuroesteróide é hidroxilado, mas não metabolizado a estradiol ou testosterona (JELLINK *et al.*, 2005).

*In vivo*, os resultados parecem ser um pouco diferentes. Em animais injetados com a forma sulfatada da DHEA houve estímulo para a liberação de glutamato (DONG *et al.*, 2007) e acetilcolina (RHODES *et al.*, 1996) no hipocampo. A DHEA também estimula a formação

de espinhos dendríticos em células CA1. Porém, este efeito parece ser mediado pela metabolização da DHEA a estradiol, em fêmeas, e testosterona/ diidrotestosterona, em machos (MacLUSKY *et al.*, 2004).

Em humanos, um experimento utilizando amostras de regiões do encéfalo de homens idosos demonstrou que a DHEA é metabolizada *in vitro* principalmente a androstenediol no hipocampo, amígdala, estriado e cerebelo. O córtex frontal sintetiza tanto androstenediol como 7 $\alpha$ -hidroxi-DHEA, mostrando que há diferenças entre as estruturas na metabolização dos neuroesteróides (WEILL-ENGERER *et al.*, 2003).

A metabolização deste neuroesteróide a outros esteróides neuroativos pode não ocorrer de maneira efetiva em algumas estruturas ou então a esteróides que não atuam sobre a captação de glicose, por isso não se observa efeito da DHEA sobre a captação de glicose no hipocampo (Figura 7), no hipotálamo (Figura 8) e no cerebelo (Figura 6).

A DHEA é capaz de estimular *in vitro* a liberação sináptica de glutamato por sinaptossomas no córtex cerebral (LHULLIER *et al.*, 2004), e possivelmente, pode influenciar a captação de glicose e o metabolismo energético. No córtex, o glutamato é responsável pela utilização de 80 a 90% da glicose captada e cerca de 50% do volume cortical é composto por neurônios e o restante por células da glia (MAGISTRETTI *et al.*, 1999; PELLERIN & MAGISTRETTI, 2003). O substrato oxidativo preferencial do córtex é o lactato (MAGISTRETTI & PELLERIN, 1999), logo sob condições basais este mantém a integridade do tecido. Com a exposição à DHEA e a possível liberação de glutamato, o córtex (Figura 9) pode captar mais glicose, mesmo na presença de lactato, pois este neurotransmissor causa elevação da captação de glicose e da taxa glicolítica nos astrócitos que circundam a sinapse. Além disso, a 2-<sup>14</sup>C-DG não é metabolizável, e isto pode potencializar a captação de glicose.

Já as vias neurais do bulbo olfatório envolvem uma grande quantidade de neurotransmissores (AFFANNI & CERVINO, 2004). Durante a restrição da irrigação sanguínea *in vivo*, há remodelação neuroanatômica e neuroquímica das vias neurais, aumentando a inervação noradrenérgicas (nas primeiras 24 horas após a privação) e colinérgica e causando *down-regulation* das vias dopaminérgicas (máxima depleção ocorre após sete semanas da oclusão) (BRIÑÓN *et al.*, 2001). Estes neurotransmissores causam glicogenólise para manter o suprimento energético (MAGISTRETTI, 1999).

O bulbo olfatório possui grandes quantidades de glicogênio (COOPERSMITH & LEON, 1995). A presença de lactato pode suprir as necessidades energéticas, mas na ausência deste pode haver necessidade de captação de glicose (Figura 10) para repor os estoques de glicogênio, causada por um aumento na liberação de neurotransmissores, como o glutamato como já demonstrado no córtex cerebral (LHULLIER *et al.*, 2004).

O bulbo olfatório também possui grande expressão da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima-chave do ciclo das pentoses. Sua expressão nesta região é maior do que em outras regiões do encéfalo (NINFALI *et al.*, 1997), possivelmente por sua participação na metabolização de neurotransmissores e plasticidade sináptica (NINFALI *et al.*, 1999). O aumento na captação de glicose observado pode ocorrer por uma maior necessidade de metabolização de neurotransmissores, na detoxificação de radicais livres gerados pela exposição à DHEA, pela detoxificação da própria DHEA, ou, até mesmo, pela inibição que este neuroesteróide exerce sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase, e este efeito é potencializado pela ausência de substrato metabolizável para geração de ATP.

A captação aumentada de glicose no bulbo e no córtex cerebral também pode dever-se a uma redução na respiração mitocondrial e, conseqüente diminuição dos níveis de ATP, podendo levar à mortalidade celular. Com isso, aumenta a velocidade da glicólise e captação de glicose, visando aumentar os níveis de ATP celulares.

O motivo da não atuação deste neuroesteróide no hipocampo, hipotálamo e cerebelo é incerta. Pode haver uma sensibilidade diferente de cada estrutura à atuação da DHEA, como já observado por Ribeiro e Garcia-Segura (2002).

A interação entre regiões do SN também não foi possível avaliar no modelo experimental adotado e, possivelmente, isto tenha interferido nos resultados obtidos. A razão da especificidade e mecanismos da ação do hormônio *in vitro* sobre o córtex e bulbo olfatório também precisa ser elucidada, bem como as ações da DHEA sobre as vias metabólicas.

No entanto, a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -lactato, substrato preferencial de oxidação do hipotálamo (Figura 14) e córtex (Figura 15) *in vitro*, não foi modificada pela DHEA quando comparado aos respectivos controles. O principal sítio de oxidação deste substrato são os neurônios e o principal local de captação de glicose são os astrócitos (MAGISTRETTI & PELLERIN, 1999). Então, os resultados obtidos no córtex corroboram a hipótese de estimulação da liberação de glutamato pelos terminais sinápticos e recaptação deste pelos astrócitos, pois aumenta a captação de glicose, mas não a oxidação de lactato. No hipotálamo, a DHEA continua não mostrando efeito sobre o perfil metabólico do tecido. No entanto, a atuação da DHEA sobre a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose ainda precisa ser elucidado no córtex e hipotálamo, estudando a oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose em meio com glicose e testando a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose e  $^{14}\text{C}$ -lactato em concentrações fisiológicas.

Também se testou o efeito de duas doses de DHEA,  $10^{-8}$  e  $10^{-12}\text{M}$ , sobre a captação de glicose *in vitro* e a ação da DHEA  $10^{-8}\text{M}$  sobre a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose no músculo esquelético.

Este esteróide parece agir sobre o músculo aumentando a sensibilidade à insulina. Tratamento agudo de DHEA em ratos velhos produz aumento da taxa de fosforilação de proteínas da cascata de sinalização da insulina (IRS, PI3K, PKB) e atua na melhora da sensibilidade à insulina corporal (CAMPBELL *et al.*, 2004).

DHEA também é capaz de elevar a captação de glicose radioativa em cultura de mioblastos, porém em altas concentrações ( $10^{-5}$  e  $10^{-4}$ M). Este esteróide é capaz de aumentar a capacidade de transporte de glicose através dos GLUTs (NAKASHIMA *et al.*, 1995). Em concentrações menores, este hormônio não teve efeito, mesmo sob estimulação insulínica. Outros hormônios esteróides (testosterona e androstenediona) tiveram efeito, porém, em menor magnitude. Estradiol e progesterona não exerceram efeito, bem como DHEAS (NAKASHIMA *et al.*, 1995).

Como ocorre no SN, a DHEA pode ser convertida em outros esteróides. A testosterona pode estimular a síntese de glicogênio e inibir sua degradação por células musculares esqueléticas. A administração a longo prazo (8 a 12 semanas) deste esteróide, reduz a captação de glicose em aproximadamente 50%. Também é capaz de aumentar a expressão de transportadores de lactato (ENOKI *et al.*, 2006). O estradiol ao se ligar aos receptores  $\beta$ , diminuem a expressão de GLUT4 e ao se ligar aos  $\alpha$ , promove o efeito contrário (BARROS *et al.*, 2006).

O presente trabalho demonstra que, *in vitro*, este esteróide é capaz de inibir a captação de  $2\text{-}^{14}\text{C-DG}$  (Figura 11), porém não modifica a oxidação de glicose (Figura 16).

Isto está de acordo com a possibilidade de conversão deste esteróide a outros que podem causar diminuição da sensibilidade do miócito à presença de glicose, como a testosterona (ENOKI *et al.*, 2006). Além disso, a DHEA pode diminuir a síntese de glicogênio, pois as vias de sinalização que a DHEA altera (CAMPBELL *et al.*, 2004) são relacionadas às vias tirosina-cinase, reguladas pela insulina e por hormônios *insulin-like*. Portanto, modificando a taxa de fosforilação destas proteínas intracelulares, modifica-se o perfil metabólico da célula. Já foi observada a diminuição das reserva de glicogênio causada pela suplementação deste esteróide (BERNADIER *et al.*, 1993). Logo, diminuindo a



necessidade metabólica de glicose para síntese de glicogênio, pode-se interferir na captação. No entanto, o mecanismo dessa inibição não é conhecido e necessita de mais estudos.

A DHEA pode estimular ciclos fúteis, aumentando a oxidação em tecidos, como o fígado (BERNADIER *et al.*, 1993). Porém, a DHEA não atuou sobre este parâmetro *in vitro* no músculo esquelético (Figura 16).

A captação de glicose pelo músculo esquelético é menor do que todas as estruturas do SNC testadas. Sabe-se que as demandas energéticas encefálicas são altas, com grande consumo de O<sub>2</sub> e glicose (MAGISTRETTI, 1999). Além disso, o tecido muscular esquelético em repouso consome basicamente ácidos graxos e corpos cetônicos (NELSON & COX, 2005). Logo, os valores de captação musculares são baixos quando comparados ao SNC, pois este último é considerado um tecido quase que exclusivamente dependente de glicose para sua sobrevivência.

Com isso, observam-se efeitos tecido-específicos da DHEA *in vitro*: atuou sobre algumas estruturas encefálicas (córtex e bulbo olfatório), mas não sobre outras (cerebelo, hipocampo e hipotálamo). Além disso, os efeitos periféricos foram exatamente opostos aos centrais; no músculo diminuiu a captação e no SN aumentou. A DHEA também não exerceu efeito sobre a capacidade de oxidação dos substratos nos diferentes tecidos testados.

Assim, mais estudos são necessários para verificar qual a importância desses achados *in vitro*, os mecanismos de ação da DHEA e sua importância fisiológica. Além disso, esclarecimentos sobre os efeitos anti-apoptótico ou apoptótico, pró-oxidante ou antioxidante; as doses que demonstram esses efeitos e os reais benefícios ou malefícios da administração *in vivo* da DHEA.

## 6. PERSPECTIVAS

Para elucidar algumas das questões levantadas pelo presente estudo, pretende-se avaliar o efeito da DHEA sobre a expressão e fosforilação de algumas proteínas da cascata de sinalização da insulina, tanto no SNC como no músculo esquelético (IRS, PI3K, PKB, GSK3), pois a modificação destas proteínas pode influenciar a captação de glicose.

Também pode-se avaliar a captação de  $2\text{-}^{14}\text{C}\text{-DG}$  na presença de glicose, além de utilizar concentrações fisiológicas de lactato em vez de supra-fisiológicas, além de observar a taxa de mortalidade celular para comprovar os efeitos anti- ou proliferativos da DHEA.

Avaliar o perfil oxidativo do SN e músculo esquelético realizando medidas de TBA-RS, catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e carbonilas e o efeito da DHEA sobre esses parâmetros.

## REFERÊNCIAS

- AFFANNI, J.M. & CERVINO, C.O. Fisiologia do olfato e de outros sentidos nasais. In: HOUSSAY, B. **Fisiologia humana**. São Paulo: Artmed, 2004.
- APOSTOLOVA, G.; SCHWEIZER, R.A.S.; BALAZS, Z.; KOSTADINOVA, R.M.; ODERMATT, A. Dehydroepiandrosterone inhibits the amplification of glucocorticoid action in adipose tissue. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 288, p. E957 – E964. 2005.
- ARAGNO, M.; TAMAGNO, E.; GATTO, V.; BRIGNARDELLO, E.; PAROLA, S.; DANNI, O.; BOCCUZZI, G. DHEA protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1467-1474. 1999.
- ARLT, W. Dehydroepiandrosterone and ageing **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 18, p. 363 – 380. 2004.
- BARROS, R.P.A.; MACHADO, U.F.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J-A. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER $\beta$  and ER $\alpha$ . **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 1605 - 1608. 2006.
- BAULIEU, E.E. e ROBEL, P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 4089 – 4091. 1998.
- BAULIEU, E.E. Neurosteroids: a novel function of the brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, p. 963 – 987. 1998.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W. & PARADISO, M.A. Sex and the brain. In: **Neuroscience. Exploring the brain**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
- BERNADIER, C.D.; PARENTE, J.A. Jr. & McINTOSH, A.K. Is dehydroepiandrosterone as antiobesity agent? **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 7, p. 414 - 419. 1993.
- BERR C, LAFONT S, DEBUIRE B, DARTIGUES JF & BAULIEU EE. Relationships of dehydroepiandrosterone sulfate in the elderly with functional, psychological, and mental status, and short-term mortality: a French community-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13410–13415. 1996.
- BIAGIOTTI, E.; GUIDI, L.; CAPELLACCI, S.; AMBROGINI, P.; PAPA, S.; DEL GRANDE, P.; NINFALI, P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase supports the functioning of the synapses in rat cerebellar cortex. **Brain Research**, v. 911, p. 152 - 157. 2001.

BONDY, C.; CHENG, C.; ZHONG, J.; LEE, W-H. IGF-1 in Brain Growth and Repair Processes. In: LAJTHA, A. & LIM, R. **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Neuroactive Proteins and Peptides**. Alemanha: Springer Science+Business Media, LLC. 2006.

BORG, M.A.; SHERWIN, R.S.; BORG, W.P.; TAMBORLANE, W.V.; SHULMAN, G.I. Local Ventromedial Hypothalamus Glucose Perfusion Blocks Counterregulation during Systemic Hypoglycemia in Awake Rats. **Journal Clinical Investigation**, v. 90, p. 361 - 365. 1997.

BORG, M.A.; TAMBORLANE, W.V.; SHULMAN, G.I.; SHERWIN, R.S. Local Lactate Perfusion of the Ventromedial Hypothalamus Suppresses Hypoglycemic Counterregulation. **Diabetes**, v. 52, p. 663 - 666. 2003.

BOROWSKY, I.W. & COLLINS, R.C. Metabolic anatomy of brain: a comparison of regional capillary density, glucose metabolism, and enzyme activities. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 288, p. 401 - 413. 1989.

BRIÑÓN, J.G.; CRESPO, C.; WERUAGA, E.; MARTIÁNEZ-GUIJARRO, F. J.; J. AIJÓN, J.; ALONSO, J. R. Bilateral olfactory deprivation reveals a selective noradrenergic regulatory input to the olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 102, p. 1 - 10. 2001.

BROWN, A.M.; TEKKÖK, S.B. e RANSOM, B.R. Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. **Neurochemistry Internacional**, v. 45, p. 529 - 536. 2004.

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

BUXTON, R.B. & FRANK, L.R. A Model for the Coupling Between Cerebral Blood Flow and Oxygen Metabolism During Neural Stimulation. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism** v. 17, p. 64 - 72. 1997.

CAMPBELL, C.S.G.; CAPERUTO, L.C.; HIRATA, A.E.; ARAUJO, E.P.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R.O. The phosphatidylinositol / AKT / atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. **Life Sciences**, v. 76, p. 57 - 70. 2004.

CHATTON, J-Y.; PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J. GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: Implications for brain imaging of inhibitory transmission. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 12456 - 12461. 2003.

CIMAROSTI, H.; ZAMIN, L.L.; FROZZA, R.; NASSIF, M.; HORN, A.P.; TAVARES, A.; NETTO, C.A.; SALBEGO, C. Estradiol Protects Against Oxygen and Glucose Deprivation in Rat Hippocampal Organotypic Cultures and Activates Akt and Inactivates GSK-3 $\beta$ . **Neurochemical Research**, v. 30, p. 191 - 199. 2005.

CINGOLANI, G.C. de. Metabolismo de Carboidratos. In: HOUSSAY, B. **Fisiologia humana**. São Paulo: Artmed, 2004.

CLARKE, D.D. & SOKOLOFF, L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; FISHER, .K.; ALBERS, R.W.; UHLER, M.D. **Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects**. USA: [Lippincott Williams and Wilkins](#), 1999.

CLERAY, M.P. The antiobesity effects of dehydroepiandrosterone in rats. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 196, p. 8 - 16. 1991.

COOPERSMITH, R. & LEON, M. Olfactory bulb glycogen metabolism: noradrenergic modulation in the young rat. **Brain Research**, v. 674, p. 230-237. 1995.

DEIGHTON CM, WATSON MJ & WALKER DJ. Sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs. **Journal of Rheumatology**, v. 19, p. 1663–1667. 1992.

DONG, L-Y.; CHENG, Z-X.; FU, Y-M.; WANG, Z-M.; ZHU, Y-H.; SUN, J-L.; DONG, Y.; ZHENG, P. Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate enhances spontaneous glutamate release in rat prelimbic cortex through activation of dopamine D1 and sigma-1 receptor. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 966 - 974. 2007.

DRINGEN, R. & HAMPRECHT, B. Glucose, Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1 regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, p. 511 - 517. 1992.

DRINGEN, R.; HOEPKEN, H.H.; MINICH, T.; RUEDIG, C. Pentose phosphate pathway and NADPH metabolism. In: LAJTHA, A. & LIM, R. **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Neuroactive Proteins and Peptides**. Germany: Springer Science & Business Media, LLC. 2006.

ENOKI, T.; YOSHIDA, Y.; LALLY, J.; HATTA, H.; BONEN, A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in rat skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 577, p. 433 – 443. 2006.

FERNÁNDEZ, E. & MEDINA, J.M. Lactate utilization by the neonatal rat brain in vitro. **Biochemical Journal**, v. 234, p. 489 - 492. 1986.

FILLENZ, M. The role of lactate in brain metabolism. **Neurochemistry International**, v. 47, p. 413 – 417. 2005.

GIL, I.; SHTAIF, B.; ESHET, R.; MAAAYAN, R.; REHAVI, M.; WEIZMAN, A. Effect of Dehydroepiandrosterone and its Sulfate Metabolite on Neuronal Cell Viability in Culture. **The Israel Medical Association Journal**, v. 3, p. 639 - 643. 2001.

GILBERT, E.; TANG, J. M.; LUDVIG, N., BERGOLD, P. J. Elevated lactate suppresses neuronal firing in vivo and inhibits glucose metabolism in hippocampal slice cultures. **Brain Research**, v. 1117, p. 213 - 223. 2006.

GORDON, G.B.; NEWITT, J.A.; SHANTZ, L.M.; WENG, D.E.; TALALAY, P. Inhibition of the conversion of 3T3 fibroblasts clones to Adipocytes by DHEA and related anticarcinogenesis steroids. **Cancer Research**, v. 40, p. 3389 – 3395. 1986.

HEREDIA, F.P.; CEREZO, D.; ZAMORA, S.; GARAULET, M. Effect of dehydroepiandrosterone on protein and fat digestibility, body protein and muscular composition in high-fat-diet-fed old rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 464 – 470. 2007.

HUSSAIN, M.A. Sensing hypoglycemia: the ventromedial hypothalamus. **European Journal of Endocrinology**, v. 137, p. 18 – 19. 1997.

IAWATA, M.; MUNEOKA, K.T.; SHIRAYAMA, Y.; YAMAMOTO, A.; KAWAHARA, R. A study of a dendritic marker, microtubule-associated protein 2 (MAP-2), in rats neonatally treated neurosteroids, pregnenolone and dehydroepiandrosterone (DHEA). **Neuroscience Letters**, v. 386, p. 145 – 149. 2005.

ISHIZUKA T.; KAJITA K.; MIURA A.; ISHIZAWA M.; KANO H.; ITAYA S.; KIMURA M.; MUTO N.; MUNE T.; MORITA H. e YASUDA K. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates glucose uptake in rat adipocytes: activation of phospholipase D. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 276, p. 196 - 204. 1999.

JELLINK, P.H.; CROFT, G.; McEWEN, B.S.; GOTTFRIED-BLACKMORE, A.; JONES, G.; BYFORD, V.; BULLCOH, K. Metabolism of DHEA by rodent brain cell lines: relationship between 7-hydroxylation and aromatization. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 93, p. 81 - 86. 2005.

JOURDAN, F.; DUVEAU, A.; ASTIC, L.; HOLLEY, A. Spatial distribution of [<sup>14</sup>C]2-Deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odors. **Brain Research**, v. 188, p. 139 - 154. 1980.

KAJITA, K.; ISHIZUKA, T.; MUNE, T.; MIURA, A.; ISHIZAWA, M.; KANO H.; KAWAI, Y.; NATSUME, Y.; YASUDA, K. Dehydroepiandrosterone Down-Regulates the Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  in Adipocytes. **Endocrinology**, v. 144, p. 253 – 259. 2003.

KULLAK-UBLICK, G-A.; FISCH, T.; OSWALD, M.; HAGENBUCH, B.; MEIER, P.J.; BEUERS, U.; PAUMGARTNER, G. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS): identification of a carrier protein in human liver and brain. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 424, p. 173 -176. 1998.

LABRIE, F.; LUU-THE, V.; BÉLANGER, A.; LIN, S-X.; SIMARD, J.; PELLETIER, G. 2005. Is Dehydroepiandrosterone a hormone? **Journal of Endocrinology**, v. 187, p. 169 - 196. 2005.

LAM, T.K.T.; GUTIERREZ-JUAREZ, R.; POCAI, A.; ROSSETTI, L. Regulation of Blood Glucose by Hypothalamic Pyruvate Metabolism. **Science**, v. 309, p. 943 - 947. 2005.

LAUGHTON, J. D.; CHARNAY, Y.; BELLOIR, B.; PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J.; BOURAS, C. Differential messenger rna distribution of lactate dehydrogenase LDH-1 and LDH-5 isoforms in the rat brain. **Neuroscience**, v. 96, p. 619 – 625. 2000.

LHULLIER, F.L.R.; NICOLAIDIS, R.; RIERA, N.G.; CIPRIANI, F.; JUNQUEIRA, D.; DAHM, K.C.S.; BRUSQUE, A.M.; SOUZA, D.O. DHEA increases synaptosomal glutamate release and improves the performance in inhibitory avoidance task. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 601 - 606. 2004.

LIN, S-Y.J.; CUI, H.; YUSTA, B.; B.D.D. IGF-I signaling prevents Dehydroepiandrosterone (DHEA)-induced apoptosis in hypothalamic neurons. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 214, p. 127 – 135. 2004.

LIU, M.L.; XIE, P.; LI, F.; SONG, H.P. Effects of DHEA on insulin action and development, of insulin-induced resistance in C2C12 muscle effects. **Progress in Natural Science**, v. 13, p. 55 - 58. 2003.

MACHADO, V.L.A.; WASSERMANN, G.F. & MARQUES, M. *In Vitro* Effect Of Insulin On The Uptake Of Glucose And Amino Acid In The Thyroid Gland Of The Turtle (C. D.). **General Comparative Endocrinology**, v. 82, p. 8 - 13. 1991.

MacLUSKY, N.J.; HAJSZAN, T. & LERANTH, C. Effects of Dehydroepiandrosterone and Flutamide on Hippocampal CA1 Spine Synapse Density in Male and Female Rats: Implications for the Role of Androgens in Maintenance of Hippocampal Structure. **Endocrinology**, v. 145, p. 4154 – 4161. 2004.

MAGISTRETTI, P.J. & PELLERIN, L. Astrocyte Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. **News in Physiological Science**, v. 14, p. 177 - 182. 1999.

MAGISTRETTI, P.J. Brain Energy Metabolism. In: ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; LARRY, R. **Fundamental Neuroscience**. Londres: Academic Press, 1999.

MAGISTRETTI, P.J.; PELLERIN, L.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, R.G. Energy on Demand. **Science**, v. 283, p. 496 - 497. 1999.

MARKS, D.B; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. **Basical Medical Biochemistry**. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.

MARTY, N.; DALLAPORTA, M. & THORENS, B. Brain Glucose Sensing, Counterregulation and Energy Homeostasis. **Physiology**, v. 22, p. 241 –251. 2007.

MATTIAZZI, A.R. Músculo esquelético, cardíaco e liso. In: HOUSSAY, B. **Fisiologia humana**. São Paulo: Artmed, 2004.

McEWEN, B.S. Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; FISHER, .K.; ALBERS, R.W.; UHLER, M.D. **Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects**. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 1999.

MEDINA, M.C.; SOUZA, L.C.; CAPERUTO, L.C.; ANHE G. F.; AMANSO, A.M.; TEIXEIRA, V. P.A.; BORDIN, S.; CARPINELLIA.R.; BRITTO, L.R.G.; BARBIERI, R.L.; BORELLA, M.I.; CARVALHO, C.R.O. Dehydroepiandrosterone increases b-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 580, p. 285 – 290. 2006.

MELLON, S.H. & DESCHEPPER, C.F. Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. **Brain Research**, v. 629, p. 283 - 292. 1993.

MELLON, S.H.; GRIFFIN, L.D.; CAMPAGNONE, N.A. Biosynthesis and action of Neurosteroids. **Brains Research Reviews**, v. 37, p. 3 - 12. 2001.

MO, Q.; LU, S.; HU, S. SIMON, N.G. DHEA and DHEA sulfate differentially regulate neural androgen receptor and its transcriptional activity. **Molecular Brain Research**, v. 126, p. 165 - 172. 2004.

MORIN, C.; ZINI, R.; SIMON, N. & TILLEMENT, J.P. Dehydroepiandrosterone and  $\alpha$ -estradiol limit the functional alterations of rat brain mitochondria submitted to different experimental stresses. **Neuroscience**, v. 115, p. 415 - 424. 2002.

MURATA, T.; WAKI, A.; OMATA, N.; FUJIBAYASHI, Y.; SADATO, N.; YANO, R.; YOSHIMOTO, M.; ISAKI, K.; YONEKURA, Y. Dynamic changes in glucose metabolism by lactate loading as revealed by a positron autoradiography technique using rat living brain slices. **Neuroscience Letters**, v. 249, p. 155 – 158. 1998.

NAKASHIMA, N.; HAJI, M.; UMEDA, F.; NAWATA, H. Effect of DHEA on glucose uptake in cultured rat myoblasts. **Hormone Metabolism Research**, v. 27, p. 491 - 494. 1995.

NAWROTH, J.; GREER, A.; CHEN, W.R.; LAUGHLIN, S.B.; SHEPHERD, G.M. An energy Budget for the olfactory glomerulus. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 9790 - 9800. 2007.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. Nova York, USA: Freeman, 2005.

NICOLA, A.F. De. Fisiologia do córtex supra-renal. In: HOUSSAY, B. **Fisiologia humana**. São Paulo: Artmed, 2004.



NINFALI, P.; ALUIGI, G.; BALDUINI, W.; POMPELLA, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity is higher in olfactory bulb than other brain areas. **Brain Research**, v. 744, p. 138 - 142. 1997.

NINFALI, P.; GUIDI, L.; ALUIGI, G.; BIAGIOTTI, E.; DEL GRANDE, P. High glucose-6-phosphate dehydrogenase activity contributes to the structural plasticity of periglomerular cells in the olfactory bulb of adult rats. **Brain Research**, v. 819, p. 150 - 154. 1999.

PATEL, M.A. & KATYARE, S.S. Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment stimulates oxidative energy metabolism in the cerebral mitochondria from developing rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 24, p. 327 – 334. 2006.

PATEL, M.A. & KATYARE, S.S. Effect of DHEA treatment on oxidative energy metabolism in rat liver and brain mitochondria. A dose response-study. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 57 - 65. 2007.

PELLERIN, L & MAGISTRETTI, P.J. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. **Neuroscientist**, v. 10, p. 53 - 62. 2004.

PELLERIN, L. & MAGISTRETTI, P.J. How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. **Journal of Physiology**, v. 14, p. 177 - 182. 2003.

PERRINI, S., NATALICCHIO A., LAVIOLA L., BELSANTI G., MONTRONE C., CIGNARELLI A., MINIELLI V., GRANO M., DE PERGOLA G., GIORGINO R. e GIORGINO F. Dehydroepiandrosterone Stimulates Glucose Uptake in Human and Murine Adipocytes by Inducing GLUT1 and GLUT4 Translocation to the Plasma Membrane. **Diabetes**, v. 53, p. 41 - 52. 2004.

PIERRE, K. & PELLERIN, L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, p. 1 – 14. 2005.

PRICHARD, J.; ROTHMAN, D.; NOVOTNY, E.; PETROFF, O.; KUWABARA, T.; AVISON, M.; HOWSEMAN, A.; HANSTOCK, C.; SHULMAN, R. Lactate rise detected by <sup>1</sup>H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 5829 - 5831. 1991.

RHODES, M.E.; LI, P-K.; FLOOD, J.F.; JOHNSON, D.A. Enhancement of hippocampal acetylcholine release by the neurosteroid DHEA sulfate: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v. 733, p. 284 - 286. 1996.

RIBEIRO, M.F. & GARCIA-SEGURA, M. Dehydroepiandrosterone regulates Insulin-like Growth Factor-1 system in adult rat hypothalamus. **Endocrine**, v. 17, p. 129 - 134. 2002.

ROBEL, P.; SCHUMACHER, M. & BAULIEU, E-E. Neurosteroids: from definition and biochemistry to physiopathologic function. In: ROBEL, P.; SCHUMACHER, M.

& BAULIEU, E-E. **Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system**. New Jersey: Human Press. 1999.

RUPPRECHT, R. e HOLSBOER, F. Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychopharmacological perspectives. **Trends in Neuroscience**, v. 22, p. 410 - 416. 1999.

RYU, J-W; KIM, M-S; KIM, C-H; SONG, K-H; PARK, J-Y.; LEE, J-D.; KIM, J-B.; LEE, K-U. DHEA administration increases brown fat uncoupling protein 1 levels in obese OLETF rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, p. 726 – 731. 2003.

SAFIULINA, D.; PEET, N.; SEPPET, E.; ZHARKOVSKY, A.; KAASIK, A. Dehydroepiandrosterone Inhibits Complex I of the Mitochondrial Respiratory Chain and is Neurotoxic In Vitro and In Vivo at High Concentrations. **Toxicological Sciences**, v. 93, p. 348 – 356. 2006.

SALTIEL, A.R. & KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799 - 806. 2001

SCHMITT, M.; KLINGA, K.; SCHNARR, B.; MORFIN, R.; MAYER, D. Dehydroepiandrosterone stimulates proliferation and gene expression in MCF-7 cells after conversion to estradiol. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 173, p. 1 – 13. 2001.

SCHMOLL, D.; FÜHRMANN, E.; GEBHARDT, R.; HAMPRECHT, B. Significant amounts of glycogen are synthesized from 3-carbon compounds in astroglial primary cultures from mice with participation of the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase isoenzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 227, p. 308 - 315. 1995.

SCHURR, A.; MILLER, J.J.; PAYNE, R.S. E RIGOR, B.M. An increase in lactate output by brain tissues serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 34 -39. 1999.

SECHER, N.H. & QUISTORFF, B. Brain glucose and lactate uptake during exhaustive exercise. **Journal of Physiology**, v. 568, p. 3. 2005.

SHI, J.; ZHANG, YQ. & SIMPKINS, J.W. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on glucose transporter 1 expression and endothelial cell survival following focal ischemia in the rats. **Experimental Brain Research**, v. 117, p. 200-206. 1997.

SONG, Z. & ROUTH, V.H. Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. **Diabetes**, v. 54, p. 15 - 22. 2005.

TAGAWA, N.; SUGIMOTO, Y.; YAMADA, J.; KOBAYASHI, Y. Strain differences of neurosteroid levels in mouse brain. **Steroids**, v. 71, p. 776-784. 2006.

TORRES, I.L.S.; CAMARO, C.D.; SILVEIRA-CUCCO, S.N.; MICHALOWSKI, M.B.; CORRÉA, J.B.; PERRY, M.L.S.; DALMAZ, C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. **Journal of Medical Biology Research**, v. 34, p. 11-116. 2001.

TSACOPOULOS, M. & MAGISTRETTI, P.J. Metabolic Coupling between glia and neurons. **The Journal of Neurosciences**, v. 16, p. 877-885. 1996.

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

WEILL-ENGERER, S.; DAVID, J.P.; SAZDOVITCH, V.; LIERE, P.; SCHUMACHER, M.; DELACOURTE, A.; BAULIEU, E-E.; AKWA, Y. In vitro metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) to 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA and  $\Delta$ 5-androstene-3 $\beta$ ,17  $\beta$  -diol in specific regions of the aging brain from Alzheimer's and non-demented patients. **Brain Research**, v. 969, p. 117-125. 2003.

YAMANE, K.; YOKONO, K.; OKADA, Y. Anaerobic glycolysis is crucial for the maintenance of neural activity in guinea pig hippocampal slices. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 103, p. 163-171. 2000.

YAMASHITA, R.; SAITO, T.; SATOH, S.; AOKI, Z.; KABURAGI, Y.; SEKIHARA, H. Effects of DHEA on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2. **Endocrine Journal**, v. 52, p. 727 - 733. 2005.

YANG, G. & IADECOLA, C. Activation of cerebellar climbing fibers increases cerebellar blood flow. **Stroke**, v. 29, p. 499 - 508. 1998.

YANG, N-C.; JENG, K-C.G.; HO, W-M.; CHOU, S-J.; HU, M-L. DHEA inhibits cell growth and induces apoptosis in BV-2 cells and the effects are inversely associated with glucose concentration in the medium. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 75, p. 159 - 166. 2000.

YANG, N-C.; JENG, K-C.G.; HO, W-M.; HU, M-L. ATP depletion is an important factor in DHEA-induced growth inhibition and apoptosis in BV-2 cells. **Life Sciences**, v. 70, p. 1979 - 1988. 2002.

ZWAIN, I.H. & YEN, S.S.C. Dehydroepiandrosterone: Biosynthesis and Metabolism in the Brain. **Endocrinology**, v. 140, p. 880 - 887. 1999.