

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

LETÍCIA CARINA RIBEIRO

**RATOS TRATADOS COM DIETA CETOGÊNICA APRESENTAM AUMENTO DE
TECIDO ADIPOSEO MEDIADO PELA ELEVAÇÃO DA ATIVIDADE DA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASE**

PORTO ALEGRE

2005

LETÍCIA CARINA RIBEIRO

**RATOS TRATADOS COM DIETA CETOGÊNICA APRESENTAM AUMENTO DE
TECIDO ADIPOSEO MEDIADO PELA ELEVAÇÃO DA ATIVIDADE DA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Carmem Gottfried.
Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

PORTO ALEGRE

2005

*Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos **meus pais**, pelo carinho e apoio irrestrito na minha trajetória, propiciando as condições necessárias para a realização de mais este sonho.*

*Dedico este trabalho também ao **Cleber**, pelo amor, carinho, cuidado, paciência e atenção de sempre, e por ser tão essencial na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha Orientadora e meu Co-Orientador, Carmem e CA, por todo carinho, amizade, auxílio, paciência, confiança e pela grande oportunidade de aprendizado que sempre me proporcionaram.

Agradeço à Denize, pelas oportunidades, por todo carinho, amizade e ensinamentos.

Agradeço à Carol e a Ju Rocha, pela dedicação e por colaborarem diretamente na execução do meu projeto.

Agradeço aos colegas do laboratório 33 (Pati, Lúcia, Marina, Fran, Mari, Cris Netto, Ana Feoli, Jo, Ana Carolina, Christopher, Tina, Dani, André, Ale e Rodrigo) pelo convívio, pelas amizades e pelo auxílio.

Agradeço à Prof^ª Dr^ª. Roselis e à Ana Lúcia, do Departamento de Fisiologia da UFRGS, pelo grande auxílio nos ensaios da PEPCK.

Agradeço aos professores do PPG, aos funcionários do Departamento, e à UFRGS por dar condições para que os alunos possam aprender, pesquisar e executar seus projetos.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."

Martin Luther King.

RESUMO

A Dieta Cetogênica é caracterizada pelo alto teor de gordura e baixo teor de carboidratos e proteínas, e tem sido proposta como benéfica em crianças com desordens epiléticas que não respondem ao tratamento convencional de drogas anti-epiléticas. O retardo de crescimento é um importante inconveniente desta dieta e as causas metabólicas ainda não estão bem caracterizadas. O objetivo desse estudo é examinar a variação de peso corporal e de tecido adiposo de ratos Wistar tratados com a dieta cetogênica durante 6 semanas, e a atividade da fração citosólica da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) no tecido adiposo. Os ratos alimentados com a dieta cetogênica apresentaram uma diminuição do peso corporal, mas um significativo aumento de tecido adiposo. A razão tecido adiposo/peso corporal apresentou diferenças entre os ratos cetogênicos e os controles já na primeira semana de tratamento, cerca de 2 vezes maior nos ratos cetogênicos. A lipogênese visceral foi mantida por um aumento na atividade da PEPCK, objetivando o fornecimento de glicerol-3-fosfato para a síntese de triacilglicerol e este acúmulo de gordura foi acompanhado por intolerância à glicose. Não foram observadas mudanças na glicemia e lipidemia basais. Estes dados contribuem para o entendimento dos efeitos metabólicos da dieta cetogênica e sugere alguns riscos potenciais desta dieta.

PALAVRAS-CHAVE: tolerância à glicose, gliceroneogênese, dieta cetogênica, PEPCK, obesidade.

ABSTRACT

Ketogenic diet, characterized by high fat and low carbohydrate and protein contents, has been proposed as beneficial in children with epilepsy disorders not helped by conventional anti-epileptic drug treatment. The delayed growth is an important drawback for this diet and metabolic causes are not well characterized. The aim of this study was to examine body weight variation during ketogenic diet feeding for 6 weeks of Wistar rats, fat mass and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity in white adipose tissue. Ketogenic diet fed rats exhibited a decreased of body weight, but a significant increment of fat mass. Mass fat/body weight ratio was already different between ketogenic and control rats at first week of treatment, about 2-fold higher in ketogenic rats. The visceral lipogenesis was supported by an increment in PEPCK activity aiming to provide glycerol-3-phosphate to triacylglycerol synthesis and this fat accumulation was accompanied by glucose intolerance. No changes were observed in basal glycaemia and lipidaemia. These data contribute to understanding the metabolic effect of the ketogenic diet and suggest some potential risks of this diet.

KEY WORDS: glucose tolerance, glyceroneogenesis, ketogenic diet, PEPCK, obesity

LISTA DE ABREVIATURAS

AGs	Ácidos Graxos
G3P	Glicerol-3-Fosfato
GH	Hormônio do Crescimento
GLUTs	Transportadores de Glicose
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
LLP	Lipase Lipoprotéica
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxicinase
PEPCK-C	Fração citosólica da PEPCK
PEPCK-M	Fração mitocondrial da PEPCK
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa
UCP1	Proteína Desacopladora 1
VLDLs	Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	DIETA CETOGÊNICA.....	10
2.1	Metabolismo da dieta.....	11
2.2	Efeitos colaterais	12
2.3	Outras indicações clínicas	13
2.4	Mudanças na composição corporal.....	14
3.	O TECIDO ADIPOSEO	15
3.1	Funções Clássicas do Tecido Adiposo	16
3.2	O Tecido Adiposo e suas novas funções	16
3.3	Tecido adiposo branco.....	17
3.4	Tecido adiposo marrom.....	18
3.5	Formação dos estoques de gordura.....	19
3.6	Regulação dos estoques de triacilglicerol como fonte energética	20
3.7	Regulação nutricional da lipogênese	21
4.	GLICERONEOGÊNESE	22
4.1	Ciclo Fútil.....	23
4.2	Fosfoenolpiruvato Carboxicinase (PEPCK).....	25
5.	OBJETIVOS	27
6.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
7.	DISCUSSÃO.....	45
8.	CONCLUSÕES	49
9.	PERSPECTIVAS	51
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

2 DIETA CETOGÊNICA

As alterações dietéticas são as formas mais antigas e comuns de tratamento, e têm sido prescritas através da história para as mais diversas patologias dentro da medicina, como por exemplo, a epilepsia.

Por volta de 400 a.C., Hipócrates, o pai da medicina, afirmou que a causa da epilepsia não estava em espíritos malignos, e sim no cérebro, tentando desfazer mitos sobrenaturais. Hipócrates detalhou um caso no qual o tratamento de um paciente epilético foi um regime de jejum completo para o controle das crises.

A história da dieta cetogênica possui raízes antigas e seculares que se confundem com a história da epilepsia. Além das observações de Hipócrates, Galeno no século XI a.C. cita o jejum relacionando as crises epiléticas a erros alimentares. Avicena propõe períodos de abstinência alimentar em convulsões repetidas e isto também foi observado em descrições bíblicas no Novo Testamento (Mateus 17:18-21; Marcos 9:14-29), *“... E trouxeram-no; e quando ele o viu, logo o espírito o agitou com violência, e, caindo o endemoniado por terra revolia-se, escumando. E perguntou ao pai: quanto tempo há que lhe acontece isto? E ele disse-lhe: desde a infância, e muitas vezes o tem lançado no fogo e na água para destruí-lo... E Jesus após ter expulsado os demônios explicou aos seus discípulos “mas esta casta de demônios não se expulsa senão pela oração e pelo jejum”*”.

Portanto, o conhecimento das manipulações dietéticas e o jejum como forma de tratamento têm sido utilizados há centenas de anos. Foi durante o início de 1920, quando somente os brometos e o fenobarbital eram conhecidos, que foram utilizados a oração e o jejum como tentativa de controle das crises. Somente a oração foi ineficaz, o jejum melhorou

as crises dramaticamente, porém seu uso prolongado era impraticável. Daí buscaram-se soluções alternativas baseando-se em estudos mais aprofundados sobre os efeitos metabólicos do jejum. Descobriu-se que além da cetose e da acidose, uma grande quantidade de ácido úrico era excretada na urina. Se o jejum fosse quebrado com a ingestão de carboidratos, açúcares ou proteínas, a excreção de ácido úrico cessava e, se o jejum fosse quebrado com a ingestão de gordura, a excreção urinária continuava. Com isso, acreditou-se primeiramente que o ácido úrico sanguíneo era importante para o controle das crises. Seguindo-se essa descoberta, uma dieta foi estudada no sentido de proporcionar ao organismo acidose, cetose e aumento do ácido úrico urinário, compondo-se de grande quantidade de gorduras e pouca quantidade de carboidratos, a qual foi denominada dieta cetogênica (Ramos e Rizzutti, 2004).

A dieta cetogênica é uma forma de tratamento alternativo para o controle das crises de epilepsia, principalmente para as epilepsias refratárias (que não respondem às drogas antiepiléticas), e é caracterizada por mimetizar as bases metabólicas do jejum. Sua eficácia já foi comprovada, principalmente em crianças, no entanto, ainda são necessários muitos estudos para a compreensão dos seus mecanismos de ação (Nordli e De Vivo, 1997; Nordli, 2002).

2.1 Metabolismo da dieta

Metabolicamente, a dieta cetogênica vai induzir uma alteração de substrato energético. Com a diminuição dos carboidratos da dieta, também ocorre uma diminuição da glicemia, inibindo assim a liberação de insulina e estimulando a liberação do glucagon na corrente sanguínea. Na escassez de insulina, os nutrientes provenientes da dieta não seguem seu caminho natural que é a produção e o estoque de energia, e para que a energia seja gerada a fim de que o organismo se mantenha, outras rotas são ativadas para que esse aporte energético venha de outras fontes. Na dieta cetogênica o nutriente mais abundante é a gordura e é dela

que provém a energia para os processos vitais. A gordura entra na circulação sob forma de ácidos graxos (AGs) que seguem até o fígado, onde serão clivados pela β -oxidação formando acetil-CoA, que pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs ou pode formar os corpos cetônicos. A principal função dos corpos cetônicos produzidos no fígado é servir como principal substrato energético para os outros tecidos como, por exemplo, o coração, rins, cérebro e músculo esquelético em situações nas quais a oferta de glicose é baixa. Além de AGs provenientes da dieta, ocorre também a mobilização de AGs estocados no tecido adiposo sob forma de triacilgliceróis – a lipólise. Os AGs mobilizados também sofrem a β -oxidação no fígado. Essa condição metabólica permite a produção de glicose, ainda que em quantidades muito pequenas, pela gliconeogênese, que inclui todos os mecanismos e vias responsáveis pela conversão de não-carboidratos em glicose. Nos mamíferos este processo ocorre no fígado e no rim e o seu papel é fornecer glicose para o cérebro, músculos e eritrócitos, quando as outras fontes da glicose estão esgotadas. O estado cetogênico é imediatamente interrompido com a ingestão de carboidratos. (Sankar et al., 1999; Freedman et al., 2001; Ziegler et al., 2002).

2.2 Efeitos colaterais

Os efeitos indesejados da dieta cetogênica geralmente estão relacionados com a intolerância à dieta, como náuseas, vômitos, diarreia. Podemos relacionar ainda outras complicações médicas e psicossociais relacionadas à dieta: constipação, dores abdominais, náuseas, vômitos, hipoglicemia, acidose, distúrbios do cálcio e outros eletrólitos, cálculo renal, hiperlipemia, alopecia, infecções recorrentes, mudança de estado mental, coma, gastrite e colite ulcerativa, sonolência, recusa alimentar, perda do apetite, fome, sede, letargia, palidez, suor e tonturas, hiperuricemia, desidratação e déficit de crescimento (Ramos e Rizzutti, 2004).

2.3 Outras indicações clínicas

Além de ser um tratamento para epilepsia, a dieta cetogênica pode ser aplicada em outras desordens metabólicas como erros inatos do metabolismo que envolvam a via glicolítica (como por exemplo, a deficiência de fosfofrutocinase, dos transportadores de glicose na barreira hematoencefálica – principalmente de Glut-1 – e de piruvato desidrogenase).

Atualmente, a dieta cetogênica vem sendo utilizada nos tratamentos de obesidade, e, apesar das controvérsias do seu uso para a perda de peso, hoje ela é uma das mais populares. A mais famosa é a o Dr. Atkins (1972), que foi atualizada 20 anos depois. A dieta cetogênica é caracterizada por conter grandes quantidades de gordura (55 a 65%) e proteína (25 a 30%) e pouco carboidrato (< 20%, <100g por dia). As dietas cetogênicas são nutricionalmente inadequadas, pois são pobres em vitaminas E, A, tiamina, B6, folato, cálcio, magnésio, ferro e fibras dietéticas, sendo necessária a suplementação alimentar. Além disso, estas dietas têm grandes quantidades de gorduras saturadas e colesterol. (Evans et al., 1974; Freedman et al., 2001).

Os componentes das dietas cetogênicas acabaram com a idéia de que o consumo calórico seja importante para o aumento do ganho ou da perda de peso. No que diz respeito à perda de peso Atkins (1972) afirma que os indivíduos que utilizam a dieta cetogênica têm vantagens metabólicas que lhes permitem ingerir tantas ou mais calorias consumidas antes de iniciar a dieta, mas com perda de peso. Porém, não existem evidências científicas que confirmem que a dieta cetogênica tenha vantagens metabólicas sobre as dietas convencionais para a redução de peso.

2.4 Mudanças na composição corporal

Durante os primeiros dias de dieta cetogênica, a perda de peso ocorre principalmente pela perda de água. Já em uma dieta tradicional a perda de peso é ocasionada primariamente pela perda de gordura corporal. Após algumas semanas, indivíduos que continuam com uma dieta cetogênica recuperam o equilíbrio da água.

Estudos realizados descrevem que indivíduos que consumiram uma dieta cetogênica por 10 semanas tiveram uma redução de somente 4,5% na gordura corporal, enquanto que outros indivíduos que eram obesos e consumiam dietas isocalóricas, mas com composição diferente de carboidratos (15, 25 ou 45%) por 6 a 12 semanas obtiveram uma importante redução da gordura corporal de 16,8 a 21,6%. As perdas de gordura e proteína foram similares em dietas isocalóricas, tanto cetogênicas quanto não cetogênicas (Bell et al., 1969; Yang e Van Itallie, 1976; Alford et al., 1990; Golay et al., 1996).

3 O TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo está presente em todas as espécies de mamíferos e também em uma variedade de espécies de não-mamíferos. O tecido adiposo é um tipo especial de tecido conjuntivo que se caracteriza pela presença de células especializadas em armazenar lipídios, denominadas adipócitos. No entanto, as organizações básicas desse tecido, que tem os adipócitos maduros como principal tipo celular, apresenta também pré-adipócitos, células vasculares estromais, vasos sanguíneos, linfonódulos e fibras nervosas (Hausman et al., 2001).

Os depósitos de gordura estão localizados principalmente em três áreas anatômicas: subcutânea (inguinal, dorsal, axilar e interescapular), dérmica (como uma membrana de revestimento contínua) e intraperitônio (mesentério, omental, perirenal, retroperitônio, epididimal e parametrial). A combinação desses vários depósitos de gordura do organismo constitui o que chamamos de “órgão adiposo”.

A população de adipócitos maduros pode apresentar células de tamanhos variados, que pode aumentar (de tamanho – hipertrofia, ou de número – hiperplasia) com o crescimento ou com o desenvolvimento da obesidade. Em humanos, os adipócitos de indivíduos eutróficos têm um diâmetro médio de 70 μm , enquanto que as células de indivíduos obesos podem chegar a um diâmetro de 120 μm . Quando isso acontece, a heterogeneidade celular diminui, indicando que essas populações celulares apresentam um limite máximo de tamanho, que pode variar entre as espécies e entre os depósitos (Ahima e Flier, 2000; Hausman et al., 2001; Hauner, 2004).

Em indivíduos eutróficos, o tecido adiposo corresponde a 14-28% do peso corporal na mulher, e 9-18% no homem. O tecido adiposo difere dos outros tecidos, pois sua massa tem uma capacidade considerável de se estender, mesmo depois de alcançada a idade adulta. Esta

capacidade pode ser tanto favorável, diminuindo o risco de inanição, quanto deletéria, pois aumenta o risco de desenvolver obesidade e suas patologias associadas. Desta forma, o tecido adiposo pode variar de 2 a 3% do peso corporal em atletas extremamente bem condicionados, e até 60 a 70% do peso corporal em indivíduos extremamente obesos. Na obesidade, o tecido adiposo pode exceder os 22% do peso corporal em homens e os 32% em mulheres (Ross et al., 1993; DiGirolamo e Fine, 2000; Rosen e Spiegelman, 2000; Chaldakov et al., 2003). Nos mamíferos, o tecido adiposo apresenta-se em dois tipos: um especializado em armazenar triacilglicerol como fonte de energia – o tecido adiposo branco, e um outro que funciona como dissipador de energia em forma de calor – o tecido adiposo marrom.

3.1 Funções Clássicas do Tecido Adiposo

Até os anos 80, o tecido adiposo, bem como os adipócitos, eram considerados basicamente como um órgão inerte, com a função principal de armazenar triacilgliceróis como fonte de energia, onde os lipídios eram adicionados ou utilizados sobre a influência de determinados hormônios em determinadas situações metabólicas. Além disso, o tecido adiposo também era visto como um órgão de proteção aos traumas, como por exemplo, para os rins.

3.2 O Tecido Adiposo e suas novas funções

Modernos estudos de biologia molecular modificaram radicalmente esta visão. Novos produtos secretados ou moduladores de sinalização não associados anteriormente com tecido adiposo foram descritos. Estes moduladores são controlados pela alimentação (nutrientes e elementos bioativos), jejum e obesidade. O papel na regulação da homeostase energética e/ou

sensibilidade sistêmica à insulina foram mostradas convincentemente, principalmente pela leptina e pelo Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). Assim, a nossa visão biológica da célula adiposa passou de uma fonte energética inerte para a de um integradora central do programa metabólico. Além da leptina e do TNF- α , podemos citar também outros importantes produtos secretados pelo tecido adiposo: hormônios sexuais esteroidais e glicocorticóides, peptídeos precursores de hormônios (angiotensinogênio), fatores de complemento (adipsina), citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , Interleucina-6, TGF- β , PAI-1, adiponectina, adipoQ), e outras adipocinas tais como: resistina, MCSF, NGF, angiotensina II, S100B, FIAF e etc (Ahima e Flier, 2000; Frayn et al., 2003; Hauner, 2004).

3.3 Tecido adiposo branco

Praticamente todo o tecido adiposo presente no homem adulto é do tipo branco. Este forma o panículo adiposo, uma camada disposta sob a pele, entre a derme e o músculo, e que é de espessura uniforme por todo o corpo do recém-nascido. Com a idade, este panículo tende a desaparecer de certas áreas desenvolvendo-se em outras. Os adipócitos deste tecido apresentam uma morfologia particular, quando completamente desenvolvidos, contêm apenas uma grande gotícula de gordura, que ocupa quase todo o citoplasma e o núcleo fica achatado na periferia da célula (Ross et al., 1993; Rosen e Spiegelman, 2000).

Os depósitos de tecido adiposo branco representam a maior fonte de energia do organismo e constituem um importante componente do sistema de balanço energético do corpo. A gordura está armazenada no adipócito sob forma de triacilglicerol, os quais são formados principalmente pelos carboidratos e lipídios provenientes da dieta. Os triacilgliceróis são empacotados como lipoproteínas – quilomicras e VLDLs (Lipoproteínas

de muito baixa densidade) – e lançados na corrente sangüínea para serem ofertados aos tecidos (Marks et al., 1996; Rosen e Spiegelman, 2000).

3.4 Tecido adiposo marrom

O tecido adiposo marrom é assim chamado por sua cor característica, devido a sua vascularização abundante e às numerosas mitocôndrias presentes em suas células. Por serem ricas em citocromos, as mitocôndrias têm coloração avermelhada. Seus adipócitos são menores e armazenam lipídio em múltiplas gotículas no citoplasma e o núcleo também está na periferia celular, mas não se encontra “achatado” como no adipócito branco. Embora os adipócitos marrons tenham virtualmente a mesma maquinaria enzimática dos adipócitos brancos, o acúmulo de lipídio neste tecido serve principalmente como um depósito de AGs para serem oxidados na mitocôndria (Ross et al., 1993; Garlid et al., 1998; Lowell e Bachman, 2003).

Este tecido é abundante em animais que hibernam, seres humanos têm uma quantidade significativa de tecido adiposo marrom no período neonatal, quando este pode ser encontrado, principalmente, na cavidade torácica circundando as grandes veias, estando presente, na idade adulta, ao redor dos rins, adrenais, aorta, dentro do mediastino e do pescoço (Chaldakov et al., 2003).

O tecido adiposo marrom funciona como um dissipador de energia na forma de calor. Este desperdício energético ocorre através do aumento da biogênese mitocondrial e a expansão de uma determinada proteína, a UCP1 – proteína desacopladora 1 –, que dissipa o gradiente de prótons que é estabelecida através da membrana interna da mitocôndria durante a passagem dos elétrons ao longo da cadeia respiratória. A UCP1 permite que os prótons voltem à matriz mitocondrial sem que eles passem pelo sistema ATP sintetase existentes nos

corpúsculos elementares das mitocôndrias. Conseqüentemente a energia liberada pelo fluxo de prótons não é usada para sintetizar ATP, sendo dissipada como calor (Garruti e Ricquier, 1992; Champigny e Ricquier, 1996; Garlid et al., 1998).

3.5 Formação dos estoques de gordura

A habilidade de assegurar a disponibilidade de energia independentemente das altas variações de substratos energéticos no meio ambiente, é um dos maiores determinantes da sobrevivência de todas as espécies. Para os grandes organismos, incluindo os mamíferos, a solução para esse problema envolve o desenvolvimento da capacidade de estocar eficientemente na forma de triacilglicerol no tecido adiposo, o excesso de energia ingerido através do consumo alimentar excessivo. A partir daí essas fontes de energia podem ser rapidamente mobilizadas para a utilização em outros tecidos (Spiegelman e Flier, 1996).

O acúmulo de gordura é determinado pelo balanço entre a síntese de lipídios (lipogênese) e a utilização dos mesmos (lipólise/oxidação de AGs). A lipogênese envolve o processo de síntese de AGs e subseqüente síntese de triacilglicerol, podendo ocorrer no fígado e no tecido adiposo. A lipogênese não deve ser confundida com a adipogênese, que se refere à diferenciação de pré-adipócitos em células de gordura maduras (Rosen e Spiegelman, 2000; Kersten, 2001).

Os triacilgliceróis estocados em quilomicras e VLDL são primeiramente convertidos em AGs livres e glicerol pela ação da lipase lipoprotéica (LLP), a qual é secretada pelos adipócitos. Os AGs livres podem então entrar no adipócito através de um transportador de AGs para serem re-esterificados e uma das enzimas envolvidas neste processo é a acil-CoA sintetase. Além disso, os triacilgliceróis também podem ser formados a partir da captação de glicose, via transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT4), dentro do adipócito. A glicose

pode ser convertida em triacilgliceróis através de uma série de enzimas, nas quais se incluem a acetil-CoA carboxilase e a ácido graxo sintase.

3.6 Regulação dos estoques de triacilglicerol como fonte energética

A regulação dos estoques de triacilglicerol ilustra a natureza complexa da fisiologia integrativa do tecido adiposo, apresentando múltiplos fatores neurais e hormonais que podem estar envolvidos nessa regulação.

Alguns mecanismos fisiológicos são capazes de melhorar a estabilidade dos estoques de triacilglicerol durante prolongados períodos de deficiência ou de excesso de disponibilidade nutricional. Os delineamentos básicos desses mecanismos fisiológicos são simples: numa situação de privação nutricional prolongada, o organismo detecta quedas nos estoques de triacilglicerol, fazendo com que a ingestão de alimentos aumente, e o gasto de energia diminua; o contrário acontece em uma situação de abundância nutricional na qual a ingestão de alimentos diminui e o gasto energético aumenta, numa tentativa de compensação para evitar excesso de adiposidade (obesidade). Os mecanismos envolvidos nessas adaptações são referidos como sistemas de regulação do balanço energético (Spiegelman e Flier, 1996).

O jejum está associado com mudanças significativas nas concentrações de hormônios no plasma, tais como diminuição da insulina e leptina, e aumento do hormônio do crescimento (GH) e glucagon. A insulina é provavelmente o fator hormonal mais importante que influencia a lipogênese. Ela proporciona o aumento da captação de glicose através do recrutamento das proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática das células, bem como pela ativação de enzimas lipolíticas e glicogênicas através de modificações covalentes (Kersten, 2001).

3.7 Regulação nutricional da lipogênese

A lipogênese é muito responsiva às alterações na dieta. Uma dieta rica em carboidratos estimula a lipogênese tanto no fígado quanto no tecido adiposo, ocasionando um aumento nos níveis de triacilgliceróis plasmáticos pós-prandiais. O jejum diminui a lipogênese no tecido adiposo, e associado à lipólise, ocasiona a perda de triacilgliceróis dos adipócitos, enquanto que no fígado, a síntese de triacilgliceróis aumenta em função da grande quantidade de AGs provenientes do tecido adiposo (Kersten, 2001).

Provavelmente, os sinais para a redução ou elevação da ingestão de alimentos possam estar sendo traduzidos sob forma de alterações nos níveis de expressão de genes lipogênicos. Sabe-se que a glicose plasmática estimula a lipogênese através de vários mecanismos. A glicose por si só é um substrato para a lipogênese e por ser glicoliticamente convertida a acetil-CoA, a glicose promove a síntese de ácidos graxos. A glicose também aumenta a lipogênese por estimular a liberação de insulina e por inibir a liberação de glucagon pelo pâncreas. Este conceito pode ser ilustrado pelo estudo dos efeitos produzidos pelo jejum, o qual está associado com a diminuição da glicose plasmática e o aumento de AGs livres (Kersten, 2001). Além da lipólise aumentada e da glicólise diminuída, o jejum também se caracteriza por proporcionar a ativação de outras rotas metabólicas tais como a gliconeogênese e a gliceroneogênese.

Na tentativa de manter os níveis fisiológicos da glicemia, o organismo, num primeiro momento, lança mão dos estoques imediatos de glicose que estão sob forma de glicogênio. Como esses estoques são baixos proporcionalmente à demanda de energia, numa nova tentativa de manter a glicemia, o organismo ativa a gliconeogênese, que é a produção de glicose a partir de substratos que não glicose.

4 Gliceroneogênese

A re-esterificação de AGs no tecido adiposo requer glicerol, que normalmente é proveniente da glicólise; entretanto, em situações de jejum esta via está diminuída.

Há cerca de trinta e cinco anos foi descrita uma rota de re-esterificação de AGs durante o jejum que envolvia a síntese de glicerol-3-fosfato (G3P) a partir de outros precursores que não a glicose, sendo, portanto uma via abreviada da gliconeogênese. Essa rota metabólica foi denominada gliceroneogênese e está ilustrada na Figura 1.

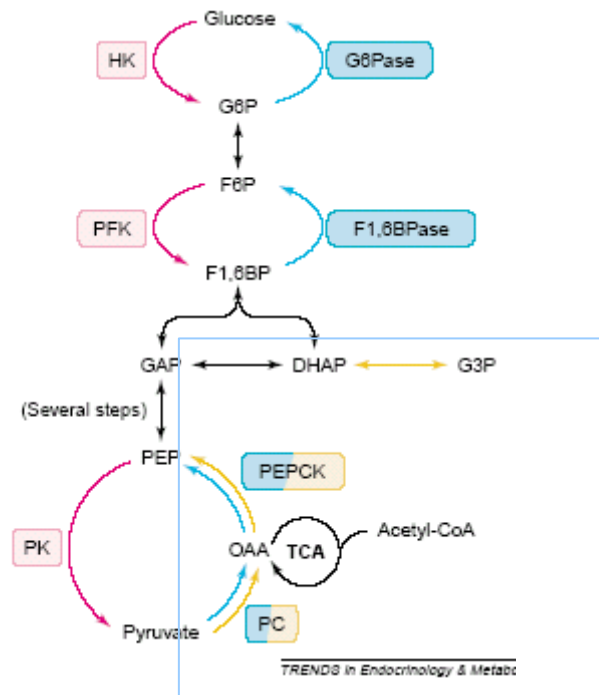


Figura 1. Esquema ilustrativo da glicólise, gliconeogênese e gliceroneogênese. HK=Hexocinase, Glucose=Glicose, G6Pase=Glicose-6-Fosfatase, G6P=Glicose-6-fosfato, PFK=Fosfofrutocinase, F6P=Frutose-6-fosfato, F1,6BPase=Frutose-1,6-Bisfosfatase, F1,6P=Frutose-1,6-Bisfosfato, GAP=Gliceraldeído-3-fosfato, DHAP=Diidroxiaçetona fosfato, G3P=Glicerol-3-fosfato, PEP=Fosfoenolpiruvato, PK= Piruvato Cinase, Pyruvate= Piruvato, PC= Piruvato carboxilase, OAA= Oxalacetato, TCA= Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, PEPCK= Fosfoenolpiruvato carboxicinase, Acetyl-CoA= Acetil-CoA. A formação de G3P, envolvendo a enzima PEPCK citosólica está destacada no quadro azul. Figura retirada do artigo de Beale e colaboradores (2004).

A função da gliceroneogênese no tecido adiposo é regular a liberação de AGs através do ciclo fútil. Este controle é cuidadosamente regulado. A re-esterificação aumenta durante situações lipolíticas, entretanto, os carbonos do glicerol não são provenientes da glicose durante o jejum porque a captação e a glicólise estão efetivamente diminuídas nessas condições.

Quando essa via está desregulada, as conseqüências são previsíveis. A hiperatividade dessa rota pode diminuir a liberação de AGs, aumentando assim os estoques de triacilglicerol no tecido adiposo, promovendo a obesidade. Por outro lado, quando essa via está hipoativa, os níveis de AGs livres aumentam no plasma enquanto que os estoques de triacilglicerol diminuem no tecido adiposo, promovendo lipodistrofia e resistência à insulina (Beale et al., 2004).

A resistência à insulina, e a síndrome metabólica como um todo, ocorrem como conseqüência de numerosos fatores secretados pelo adipócito. O aumento dos AGs livres exercem um papel fundamental na etiologia da síndrome metabólica por ocasionar resistência à insulina nos tecidos alvos, levando à diabetes mellitus tipo 2 (Beale et al., 2004).

4.1 Ciclo Fútil

Durante o jejum em todos os mamíferos, os triacilgliceróis são hidrolisados por um hormônio lipase sensível, produzindo AGs livres e glicerol. O processo de re-esterificação de AGs livres é conhecido como ciclo fútil, conforme ilustrado na Figura 2, e resulta na preservação de AGs que não foram utilizados como substrato energético por tecidos específicos, como por exemplo, o fígado (Reshef et al., 2003; Beale et al., 2004).

É evidente que o ciclo fútil além de AGs livres necessita de um fornecimento constante de G3P para a síntese de triacilglicerol, particularmente quando essa re-esterificação está aumentada.

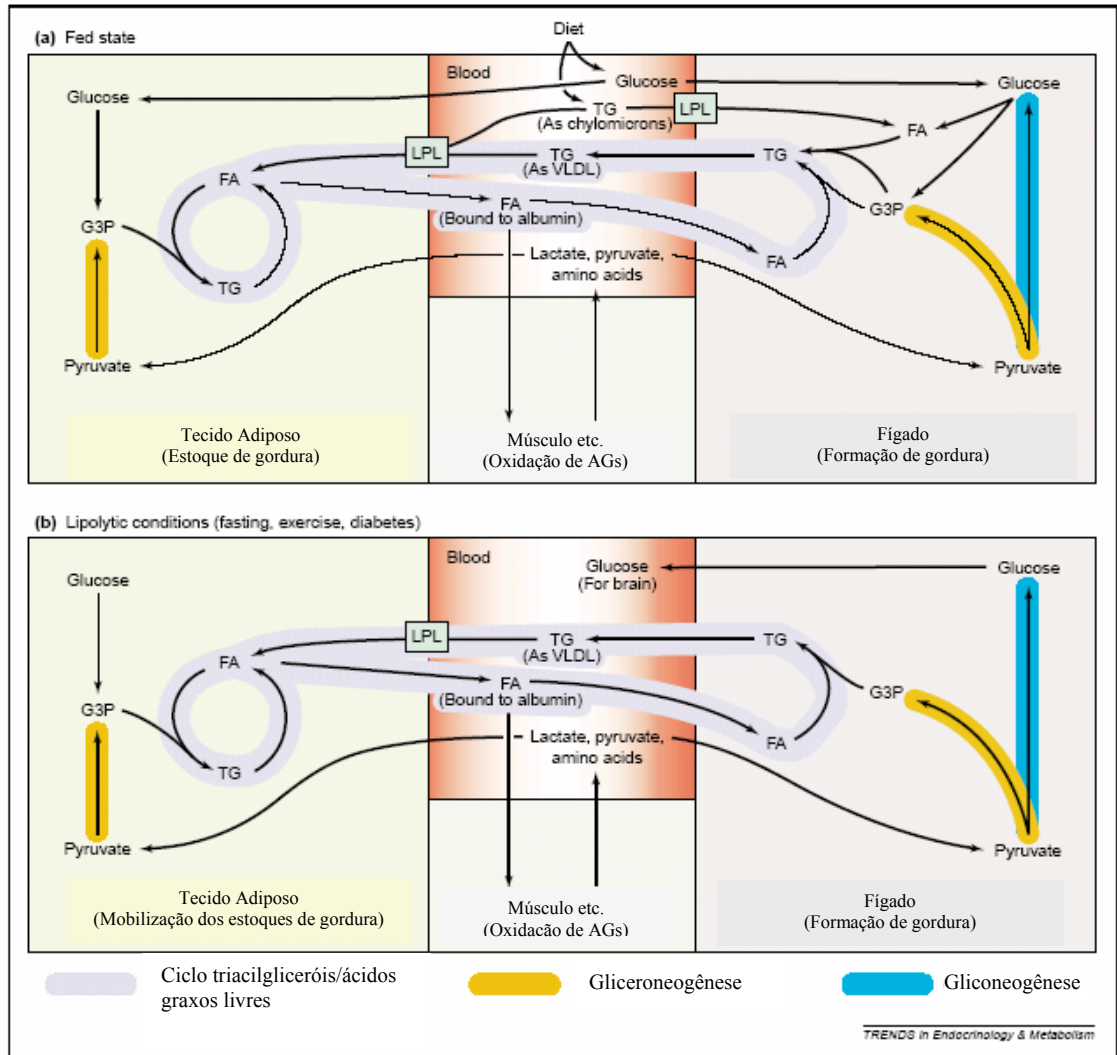


Figura 2. Esquema ilustrando o ciclo fútil no tecido adiposo e a esterificação de ácidos graxos no fígado, no estado alimentado (a) e em condições lipolíticas (b), como no jejum, durante exercícios físicos e diabetes. Setas largas indicam predomínio da rota. TG, triacilgliceróis; FA, ácidos graxos. Figura retirada do artigo de Beale e colaboradores (2004).

No estado alimentado, a principal fonte de G3P é a glicose via glicólise. Entretanto durante o jejum, a fonte de G3P pode ser proveniente da glicose plasmática via glicólise ou do glicerol liberado a partir da lipólise. No tecido adiposo, particularmente, o glicerol liberado a

partir da hidrólise dos triacilgliceróis não pode ser reutilizado para esterificação de AGs porque não apresenta a enzima glicerol cinase. Tem sido proposto que, durante o jejum, a principal fonte de G3P no tecido adiposo ocorre via gliceroneogênese, conforme ilustra a Figura 3.

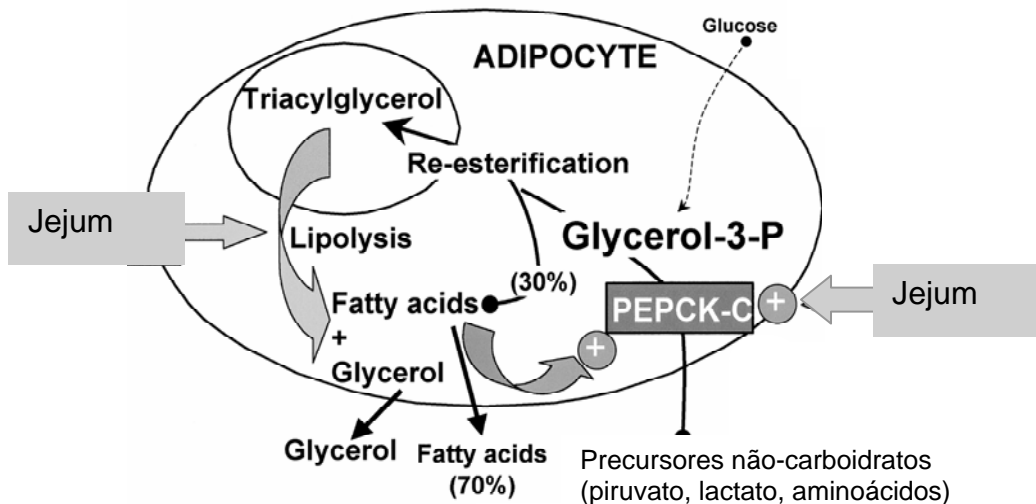


Figura 3. Esquema ilustrativo do fornecimento de G3P através de precusores não-carboidratos, durante o jejum. Adaptado de Forest e colaboradores (2003).

Através do ciclo fútil, o fornecimento de glicerol por gliceroneogênese impede que grandes quantidades de AGs sejam liberados na corrente sanguínea em situações de jejum, o que acarretaria patologias como, por exemplo, a diabetes tipo 2. Nessa rota a enzima chave é a fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK).

4.2 Fosfoenolpiruvato Carboxicinase (PEPCK)

A elucidação da gliceroneogênese se deu nos anos 60, quando houve a descoberta que a fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), que até então era conhecida como uma importante enzima, responsável por catalisar a primeira etapa da gliconeogênese hepática e renal, também estava presente no tecido adiposo. Este fato surpreendeu os pesquisadores, uma

vez que os adipócitos não são gliconeogênicos, pois não apresentam glicose 1,6 bisfosfatase nem glicose 6-fosfatase, as duas enzimas regulatórias da gliconeogênese (Beale et al., 2002; Duplus et al., 2003). Estudos subsequentes revelaram que a concentração da PEPCK no tecido adiposo é similar àquela encontrada no fígado. Essa descoberta levou dois grupos de pesquisadores a desenvolver uma série de estudos a fim de elucidarem o papel da PEPCK no tecido adiposo (Ballard et al., 1967; Gorin et al., 1969).

Na gliconeogênese a PEPCK também é a enzima chave do processo. Ela é responsável pela conversão do oxalacetato a fosfoenolpiruvato, como demonstrado na Figura 1. Essa proteína apresenta duas isoformas nos vertebrados: a fração citosólica (PEPCK-C) na qual seus níveis são modulados pelos efeitos de hormônios como o glucagon, insulina e glicocorticóides, modificando a transcrição de seu gene; e a fração presente na matriz mitocondrial (PEPCK-M) onde sua atividade parece ser mais constitutiva (Weldon et al., 1990).

A localização da PEPCK parece ser espécie-dependente, da mesma forma, o mecanismo de regulação também é espécie-dependente. Em roedores, a PEPCK parece estar localizada quase totalmente no citosol, enquanto que em aves a localização é quase totalmente mitocondrial. Em outras espécies de animais, incluindo o homem, as frações mitocondrial e citosólica são equivalentes (Duffy et al., 1981). No que diz respeito à atividade da enzima, estudos demonstram que a maioria das espécies em mamíferos (humanos, cães, gatos, bovinos e ovinos) possuem atividades iguais entre as frações mitocondrial e citosólica da enzima. No entanto, ratos e camundongos possuem cerca de 90% da atividade da PEPCK na fração citosólica enquanto que as aves apresentam 100% da atividade da enzima na fração mitocondrial (Croniger et al., 2002).

5 OBJETIVOS

Em nossos estudos anteriores, observamos que os ratos tratados com a dieta cetogênica apresentavam uma quantidade de tecido adiposo muito maior que os ratos tratados com a dieta controle, além de apresentarem uma visível depleção da musculatura (dados não publicados). Em função destas observações, decidiu-se dar continuidade aos estudos com estes dois grupos e para isto estabeleceram-se os seguintes objetivos:

Objetivo Geral

Fazer uma avaliação da evolução ponderal e da variação de tecido adiposo branco (epididimal e perirenal) nos grupos controle e cetogênico.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade da enzima PEPCK no tecido adiposo branco;
2. Determinar alguns parâmetros bioquímicos do soro, tais como: glicemia, proteínas totais, colesterol total, colesterol HDL e triacilgliceróis;
3. Realizar curva de tolerância à glicose.

6 ARTIGO CIENTÍFICO

KETOGENIC DIET-FED RATS HAVE INCREASED FAT MASS MEDIATED BY AN INCREMENT IN THE ACTIVITY OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE

Letícia C. Ribeiro¹, Ana L. Chittó², Alexandre Müller¹, Caroline F. S. Pires¹, Juliana K. Rocha¹, Liane N. Rotta¹, Denize R. Ziegler^{1,3}, Carlos-Alberto Gonçalves¹, Roselis S. M Da Silva², Marcos L. Perry¹ and Carmem Gottfried^{1, CA}

¹Departamento de Bioquímica and ²Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; and ³Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS, Brazil

^{CA} Corresponding author: Carmem Gottfried

Departamento de Bioquímica, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Fax 55-51-33165540

Phone 55-51-3316 5565

cgottfried@ufrgs.br

Financial support: Brazilian funding from CNPq, CAPES and FAPERGS.

Running title: Ketogenic diet and PEPCK

ABSTRACT

A ketogenic 90% diet, characterized by high fat and low carbohydrate and protein contents, has been proposed to be beneficial in children with epilepsy disorders that are not helped by conventional anti-epileptic drug treatment. Delayed growth is an important drawback of this diet and metabolic causes are not well characterized. The aim of this study was to examine body weight variation during ketogenic diet feeding for 6 weeks of Wistar rats; fat mass and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity in epididymal plus perirenal white adipose tissue were also observed. Ketogenic diet-fed rats exhibited a decreased body weight, but a significant increment in fat mass. The fat mass /body weight ratio already differed between ketogenic and control rats after the first week of treatment, and was approximately 2.4 x higher in ketogenic rats. The visceral lipogenesis was supported by an increment in PEPCK, aiming to provide 3-glycerol phosphate to triacylglycerol synthesis and this fat accumulation was accompanied by glucose intolerance. No changes were observed in basal glycaemia and lipidaemia. These data contribute to our understanding of the metabolic effects of the ketogenic diet and suggest some potential risks of this diet.

KEY WORDS: glyceroneogenesis, ketogenic diet, PEPCK, obesity

INTRODUCTION

The ketogenic diet (KD), characterized by high fat and low carbohydrate and protein contents, has been proposed as beneficial in patients with epilepsy disorders (1), astrocytomas (3) and bipolar illness (3). Clinical studies have shown that KD is effective against seizure disorders of children not helped by conventional anti-epileptic drug treatment (4). KD efficacy can be evaluated in experimental animal models of induced seizure with kainic acid (5) and pentylenetetrazole (6-7) However, the underlying biochemical basis of this treatment against seizures and other neurological disorders are unknown (8-9).

Many recent reports discuss the efficacy and benefits of this diet. However, side effects of KD deserve more investigation, to understand the changes possibly related to its efficacy. Side effects of high-fat diets include reduced proteinemia (10), elevated lipidaemia (11), nephrolithiasis (12) and delayed growth in children (1). The delayed growth is an important drawback for this diet and metabolic causes are not well characterized. This occurrence could be due just to inadequate energy intake; however, in rodents a decrease in weight during the first weeks of this diet is also observed, even when this diet is administered *ad libitum* (13). This diet involves dramatic changes in metabolism of lipids and proteins and other possible causes could be underlying the weight loss. Glycaemia is maintained at the expense of intense gluconeogenesis from diet and muscular protein. However, we do not know how much of the weight changes may be associated with specific changes in muscle and adipose tissues. Preliminary observations in our laboratory suggest an increment in white adipose tissue (WAT) in KD fed rats.

More than 30 years ago, a pathway for the re-esterification of free fatty acids in WAT, involving the generation of 3-glycerol phosphate, was described (14-15). This pathway, termed glyceroneogenesis, is an abbreviated version of gluconeogenesis, in which 3-glycerol phosphate is produced from substrates other than hexoses or glycerol. Glyceroneogenesis may

be assessed by measuring the cytosolic activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK, EC 4.1.1.32), the rate-limiting enzyme in this pathway.

Our work hypothesis is that adipose glyceroneogenesis is altered in rats fed with KD and this alteration could be involved in the weight loss observed during the first weeks of this diet.

Thus, the aim of this study was to examine body weight variation during ketogenic-diet feeding of Wistar rats, as well as to observe fat mass and the PEPCK activity in epididymal plus perirenal WAT.

MATERIAL AND METHODS

Animal research and diets

The experiments were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Male 30-day-old Wistar rats came from the local breeding colony (ICBS-UFRGS). Animals were weight matched and divided into two groups: control rats that received regular laboratory chow (Nuvilab-CR1, from Nuvital, Brazil) and treated rats that received KD (**Table 1**) for 6 weeks (13).

Table 1

Animals were maintained in a ventilated room at 21°C, with free access to food and water on a 12 h light/dark cycle. It is important to mention that preliminary experiments using a KD with 20% protein (as used in children) caused undernutrition of the rats as shown by a significant loss of weight and hair (data not shown). For this reason we used 25% protein. This result may be related to the Wistar strain of rats used in this study, because Sprague-Dawley rats did not show signs of undernutrition when fed a KD containing 10% protein, even when the diet was started on the 22nd postnatal day (6).

PEPCK activity assay

WAT were homogenized in ice-cold 0.25 mM sucrose (1:9, w/v) with a Teflon pestle homogenizer. The homogenate was centrifuged for 10 min at 600 x g and recentrifuged at

10.000 x g for 60 min. All steps were carried out at 0-3°C. Since, in rats, the activity of PEPCK is predominantly (90%) cytosolic (16) we decided to obtain a whole extract containing both fractions. PEPCK activity was determined by the method based on the $[H^{14}CO_3^-]$ -oxaloacetate (Sigma) exchange reaction (17). The reaction was stopped by the addition of 5% trichloroacetic acid. After centrifugation, the solution was gassed for 10 min with CO₂ and aliquots were immediately counted in a liquid scintillation counter in toluene-triton X-100 (2:1, v/v) – PPO – POPOP. Blanks in which inosine triphosphate was omitted were used and the values obtained were subtracted from all assay measurements. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Protein content was measured following the Lowry's method (18).

Intraperitoneal glucose tolerance test

Awake overnight-starved control and KD fed rats (6 weeks) were given an intraperitoneal injection of glucose (2 mg/g of body wt). Blood samples were taken from the tail vein of the same animal at 0, 30, 60 and 120 min after injection. Results are means ± SE of six animals for each group.

Blood sampling and analysis

Blood samples were incubated at 37°C for 10 min and centrifuged at 800 x g for 10 min (Eppendorf 5402; Hamburg, Germany). Serum was stored at 8°C for 24 h. Biochemical analysis was carried out in a Multi-test Analyzer (Mega; Merck, Darmstadt, Germany), using specific kits supplied by Merck as follows: total protein (protein-SMT, 1.19703.0001, biuret method); glucose (GLUC-DH 1.07116.0001); triacylglycerol (SMT-triglyceride, 1.19706.0001, GPO-PAP method); cholesterol (cholesterol-SMT, 1.19738.0001, CHOD-PAP method). HDL cholesterol was determined using a kit (HDL cholesterol direct FS) from DiaSys (Diagnostic Systems International, Holzheim, Germany).

Statistical analysis

All analyses were performed using the SPSS program, Version 12.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Body weight and fat mass changes

Control and ketogenic rats and tissue were weighed during 6 weeks (Figure 1A). Both groups gained weight during this period (during 4th and 10th postnatal week). However, ketogenic diet fed rats exhibited a significantly decreased body weight, compared to controls, from the 2th week of KD on. Epididymal and perirenal fat mass increased in both groups in this period (Figure 1B). However, a significant increment of fat mass was observed at the 6th week in the ketogenic group when compared to control. The fat mass /body weight ratio already differed between the ketogenic and control rats after the first week of treatment (Figure 1C), being about 2.4 x higher in ketogenic rats. In both groups a positive correlation was observed between this ratio and age in ketogenic and control rats ($r^2=0.90$ and $r^2=0.83$, respectively).

Figure 1

WAT PEPCK activity

A strong increment of PEPCK activity was observed in adipose tissue in ketogenic rats when compared to the adipose tissue of control rats ($p=0.001$) at the 6th week of treatment (Figure 2).

Figure 2

Serum content of glucose and triacylglycerol

In order to evaluate the circulating energetic substrates, serum glucose and triacylglycerol were measured at the 6th week of treatment (**Table 2**). A non-significant difference was observed in the glycaemia or lipidaemia between ketogenic and control rats. Proteinemia and cholesterolemia were also not different.

Table 2

Glucose tolerance

Glycaemia was measured 30 min, 60 min and 120 min after intraperitoneal infusion of glucose (2 mg/gram of body weight) to investigate a possible change in glucose tolerance (Figure 3). A very different profile of glycaemia was observed between ketogenic and control rats. The peak observed at 30 min was much higher in ketogenic rats, this being significant considering that this group received a glucose infusion that was about 20% lower. At 60 min, glycemia dropped in control rats, but remained elevated in ketogenic rats. At 120 min, glycemia was close to the basal level in control rats and it was still elevated in ketogenic rats.

Figure 3

DISCUSSION

Confirming previous results, we observed a loss of weight in rats fed with KD during the first six weeks (13). In fact, a decrease in body weight was observed from the second week on and a more than 30% reduction was observed between the 4th and 5th weeks of this diet.

Changes in body weight have also been observed in children on KD (19,20,1). This reduction, observed in humans and rodents, cannot be due to glycogen and associated bound water depletion observed at the beginning of starving or high-fat diets (21). In previous studies in humans and rodents, we observed a normal proteinemia during KD, which does not favor the hypothesis of inadequate protein intake to explain weight loss. However, other nutrients should be followed-up during KD. Moreover, it is important to mention that this difference in body weight statistically disappears from the 12th week on (data not shown), and, possibly, long-term changes involve other underlining mechanisms.

In contrast to this body weight reduction, we observed an increment in WAT weight from the first week on. WAT weight to body weight ratio in KD fed rats was 2.4 x higher and constant during all 6 weeks. Because carbohydrates are omitted in this diet, an intense gluconeogenesis

at the expense of muscle protein is necessary to maintain glycaemia. Muscle amino acids are also consumed in glyceroneogenesis, aiming to provide glycerol 3-phosphate for the re-esterification of fatty acids in WAT (14). The body weight loss issue becomes even more relevant when considering this parallel fat accumulation. Circulating lipids are monitored during KD and, commonly, lipidaemia is surprisingly normal in humans (20) and rats, even in ad libitum administered KD (13). As such, some benefits of the KD have been suggested to be healthy for the heart (22). Whether high fat intake is accompanied by normal lipidaemia it may be possible that a very efficient system for lipid storage and/or expenditure is taking place.

In order to investigate this aspect, we measured PEPCK in WAT, a key enzyme for glyceroneogenesis (15). This pathway is active during fasting and critical for re-esterification in adipose tissue and, subsequently, ketogenesis in the liver. It is important to note that the fraction of free fatty acids during lipolysis, which is recycled back to triacylglycerol (re-esterification), represents about 30%. This enzyme has its expression regulated by insulin and glucagon. In adipose tissue, in contrast to liver, it is inhibited by glucocorticoids (23).

We found elevated activity of this enzyme in KD fed rats. This high activity provides enough glycerol-3-phosphate for the synthesis of triacylglycerol in adipose tissue, smoothing the putative elevated lipidaemia during KD feeding. In addition, an increment of this enzyme was also found in adipose tissue of animals fed with a high-protein and carbohydrate-free diet (24).

Considering the WAT increment as a novel feature for investigation in KD, we investigated whether this adipose tissue accumulation could affect the resistance to insulin, that it has been suggested to be a key element in understanding many problems resulting from visceral obesity (25). We observed a clear change in the glucose tolerance in animals fed with KD, possibly resulting from insulin resistance. Insulin resistance is the hallmark of the metabolic

syndrome, which is associated with an elevated risk of diabetes and cardiovascular diseases (26).

The elevated flux of free-fatty acids appears to underline the metabolic syndrome. However, in mice overexpressing PEPCK in adipose tissue no association between adiposity and insulin resistance was observed (27). These authors suggest that increasing fat storage, which avoids the toxic effects of excessive circulating free-fatty acids, may protect against insulin resistance. In KD fed animals, an elevated flux of free-fatty acids must occur (28), which is not necessarily accompanied by the dyslipidaemia observed in metabolic syndrome, particularly characterized by elevated triacylglycerol levels (26). In fact, we found normal lipidaemia in this study, as seen in other in humans and rodents fed with KD (22,13).

However, this normal lipidaemia does not reflect a normal storage or distribution. Moreover, most of the data available regarding PEPCK regulation are in rodents, thus elevated adipose glyceroneogenesis and its consequences deserve further investigation in humans.

In summary, our data indicate, for first time to our knowledge, an elevated fat accumulation in rats fed on a ketogenic diet, despite a normal lipidaemia, reported here and in a number of other studies. The visceral lipogenesis was supported by an increment in PEPCK, aiming to provide glycerol-3-phosphate for triacylglycerol synthesis and this fat accumulation is accompanied by glucose intolerance. These data contribute to understanding the metabolic effect of the ketogenic diet and suggest some potential risks of this diet.

LITERATURE CITED

1. Peterson SJ, Tangney CC, Pimentel-Zablah EM, Hjelmgren B, Booth G, Berry-Kravis E. Changes in growth and seizure reduction in children on the ketogenic diet as a treatment for intractable epilepsy. *J Am Diet Assoc.* 2005;105:718-25.
2. Seyfried TN, Sanderson TM, El-Abbadi MM, McGowan R, Mukherjee P. Role of glucose and ketone bodies in the metabolic control of experimental brain cancer. *Br J Cancer* 2003;89:1375-82.
3. El-Mallakh RS, Paskitti ME. The ketogenic diet may have mood-stabilizing properties. *Med Hypotheses* 2001;57:724-6.
4. Hemingway C, Pyzik PL, Freeman JM. Changing Physician Attitudes Toward the Ketogenic Diet: A "Parent-Centered" Approach to Physician Education about a Medication Alternative. *Epilepsy Behav.* 2001;2:574-578.
5. Muller-Schwarze AB, Tandon P, Liu Z, Yang Y, Holmes GL, Stafstrom CE. Ketogenic diet reduces spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the kainic acid model. *Neuroreport* 1999;10:1517-22.
6. Bough KJ, Eagles DA. A ketogenic diet increases the resistance to pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Epilepsia* 1999;40:138-143.
7. Ziegler DR, Oliveira DL, Pires C, Ribeiro L, Leite M, Mendez A, Gonçalves D, Tramontina F, Portela LV, Wofchuk ST, Perry ML, Gonçalves CA. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res.* 2004;50:375-9.
8. Stafstrom CE, Bough KJ. The ketogenic diet for the treatment of epilepsy: a challenge for nutritional neuroscientists. *Nutr Neurosci.* 2003;6:67-79.
9. Cullingford TE. The ketogenic diet; fatty acids, fatty acid-activated receptors and neurological disorders. *Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids* 2004;70:253-64.

10. Ballaban-Gil K, Callahan C, O'Dell C, Pappo M, Moshe S, Shinnar S. Complications of the ketogenic diet. *Epilepsia* 1998;39:744-8.
11. Best TH, Franz DN, Gilbert DL, Nelson DP, Epstein MR. Cardiac complications in pediatric patients on the ketogenic diet. *Neurology* 2000;54:2328-30.
12. Kielb S, Koo HP, Bloom DA, Faerber GJ. Nephrolithiasis associated with the ketogenic diet *J Urol.* 2000;164:464-6.
13. Ziegler DR, Araújo E, Rotta LN, Perry ML, Gonçalves CA. A ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. *J Nutr.* 2002;132:483-7.
14. Hanson RW, Reshef L. Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 2003;85:1199-205.
15. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem.* 2003;278:30413-6.
16. Croniger CM, Olswang Y, Reshef L, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Revisited. Insights into its metabolic role. *Biochem Mol Biol Educ.* 2002;30:14-20.
17. Xavier AR, Roselino JE, Resano NM, Garofalo MA, Migliorini RH, Kettelhut IC. Glyconeogenic pathway in isolated skeletal muscles of rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80:164-9.
18. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
19. Vining EP, Pyzik P, McGrogan J, Hladky H, Anand A, Kriegler S, Freeman JM. Growth of children on the ketogenic diet. *Dev Med Child Neurol.* 2002;44:796-802.
20. Liu YM, Williams S, Basualdo-Hammond C, Stephens D, Curtis R. A prospective study: growth and nutritional status of children treated with the ketogenic diet. *J Am Diet Assoc.* 2003;103:707-12.

21. Astrup A, Meinert LT, Harper A. Atkins and other low-carbohydrate diets: hoax or an effective tool for weight loss? *Lancet* 2004;364:897-9.
22. Dashti HM, Bo-Abbas YY, Asfar SK, Mathew TC, Hussein T, Behbahani A, Khoursheed MA, Al-Sayer HM, Al-Zaid NS. Ketogenic diet modifies the risk factors of heart disease in obese patients. *Nutrition* 2003;19:901-2.
23. Nechushtan H, Benvenisty N, Brandeis R, Reshef L. Glucocorticoids control phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in a tissue specific manner. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:6405-17.
24. Botion LM, Kettelhut IC, Migliorini RH. Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. *Horm. Metab Res.* 1995;27:310-3.
25. Riccardi G, Aggett P, Brighenti F, Delzenne N, Frayn K, Nieuwenhuizen A, Pannemans D, Theis S, Tuijelaars S, Vessby B. PASSCLAIM--body weight regulation, insulin sensitivity and diabetes risk. *Eur J Nutr.* 2004;43:II7-II46.
26. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
27. Franckhauser S, Munoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P, Su B, Bosch F. Increased fatty acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:624-30.
28. Fraser DD, Whiting S, Andrew RD, Macdonald EA, Musa-Veloso K, Cunnane SC. Elevated polyunsaturated fatty acids in blood serum obtained from children on the ketogenic diet. *Neurology* 2003;60:1026-1029.

Table 1. Composition of the control and ketogenic diets

Control diet ^a	g/Kg	Ketogenic diet	g/Kg
Total fat	110	Lard	690
		Sunflower oil	5
Protein	220	Protein ^b	250
Fiber	30	Fiber	10
Ash	60	Ash ^c	40
Vitamin	20	Vitamin ^d	15
Carbohydrates	520	Carbohydrates	0

^a Commercial non-purified diet, Nuvilab-CR1 (Curitiba, Brazil).

^b Casein, purity 87% (from Herzog, Porto Alegre, Brazil) supplemented with 0.15% L-Methionine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil)

^c Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100 g of ration: NaCl, 557; KI, 3.2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄.7H₂O, 108; MnSO₄.H₂O, 16; ZnSO₄.7H₂O, 2.2; CuSO₄.5H₂O, 1.9; CoCl₂.6H₂O, 0.09.

^d Vitamin mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100 g of ration: Vitamin A, 4; Vitamin D, 0.5; Vitamin E, 10; Menadione, 0.5; Choline, 200; PABA 10; Inositol 10 mg; Niacin, 4; Pantothenic acid, 4; Riboflavin, 0.8; Thiamin, 0.5; Pyridoxine, 0.5; Folic acid, 0.2; Biotin, 0.04; Vitamin B 12, 0.003.

Table 2. Serum biochemistry of rats fed on control and ketogenic diets for 6 weeks

Parameters	Control rats		KD rats	
	<i>g/L</i>		<i>g/L</i>	
Total Protein	62.9	± 1.8	61.2	± 1.7
	<i>mmol/L</i>		<i>mmol/L</i>	
Glucose	6.90	± 0.77	6.17	± 0.66
Triacylglycerol	0.67	± 0.07	0.68	± 0.07
Total/HDL cholesterol	3.1	± 0.1	2.6	± 0.5

Values are means ± SEM, $n = 5-6$.

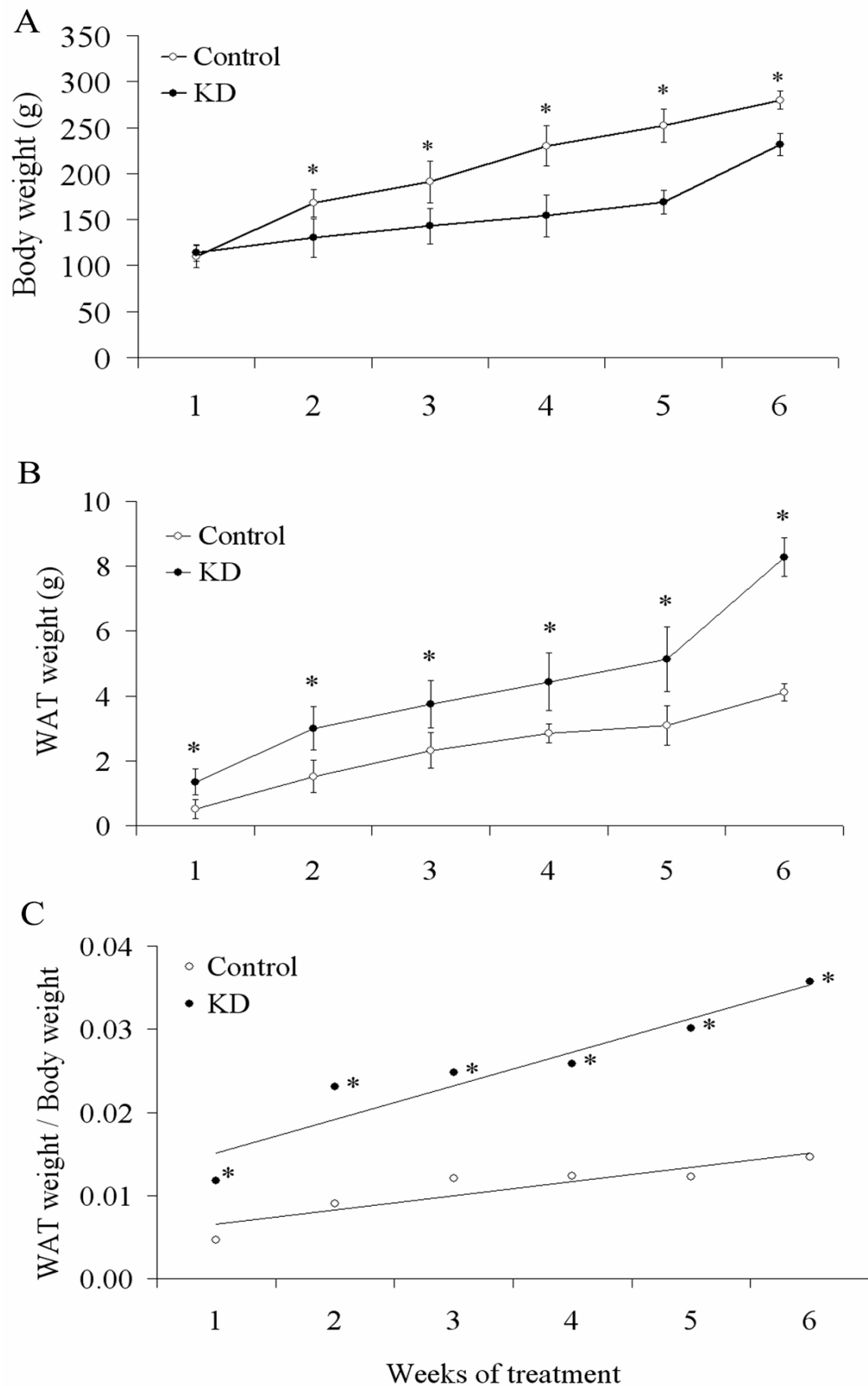


Figure 1. Changes in body and WAT weight during ketogenic diet (KD) feeding at 1, 2, 3, 4, 5 and 6 weeks. A. Body weight. B) Epididymal WAT weight. C. Ratio between WAT and body weight. Each point is the mean of 6–8 rats. Statistically significant between groups by one-way ANOVA * $P < 0.001$.

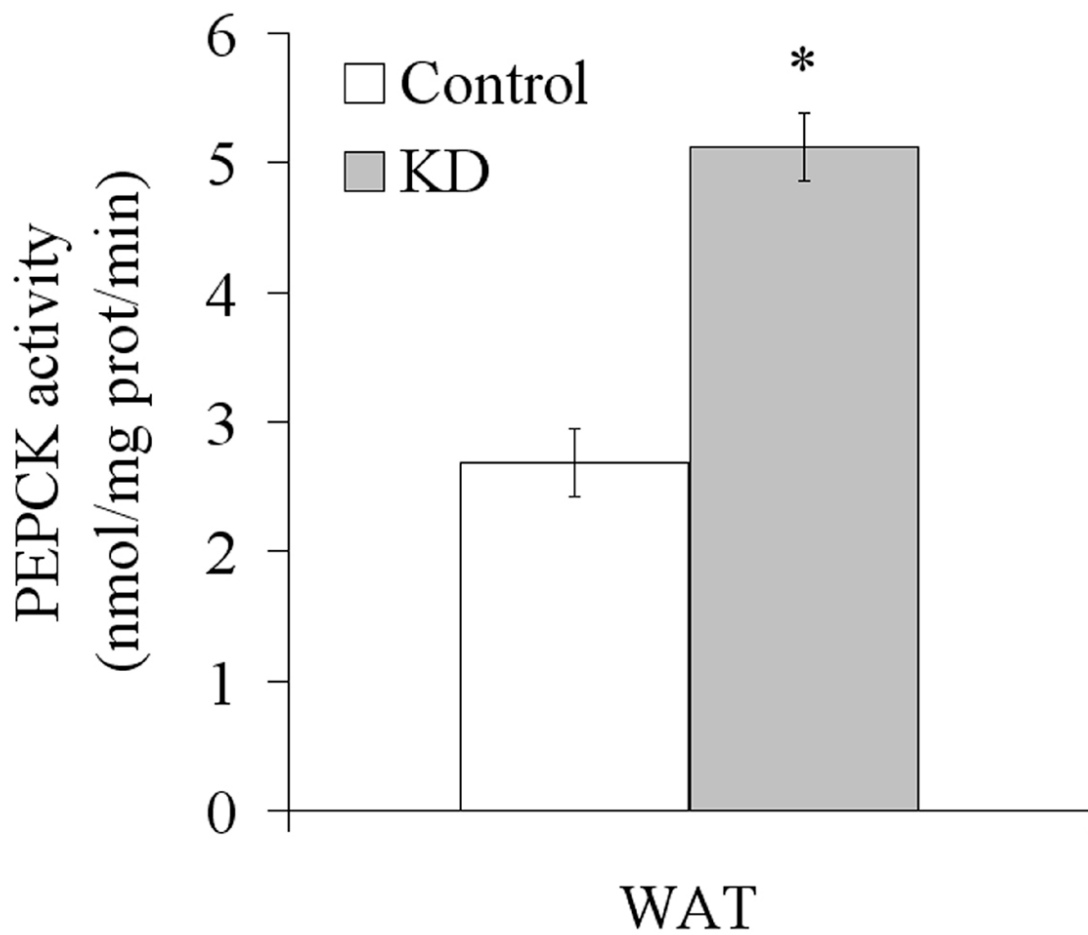


Figure 2. Effect of Control and ketogenic (KD) diets on WAT PEPCK activity.

PEPCK activity was measured after 6 weeks of treatment. The statistical significance of changes in PEPCK activity was determined by Student's *t* test, with the level of significance set at $P < 0.001$.

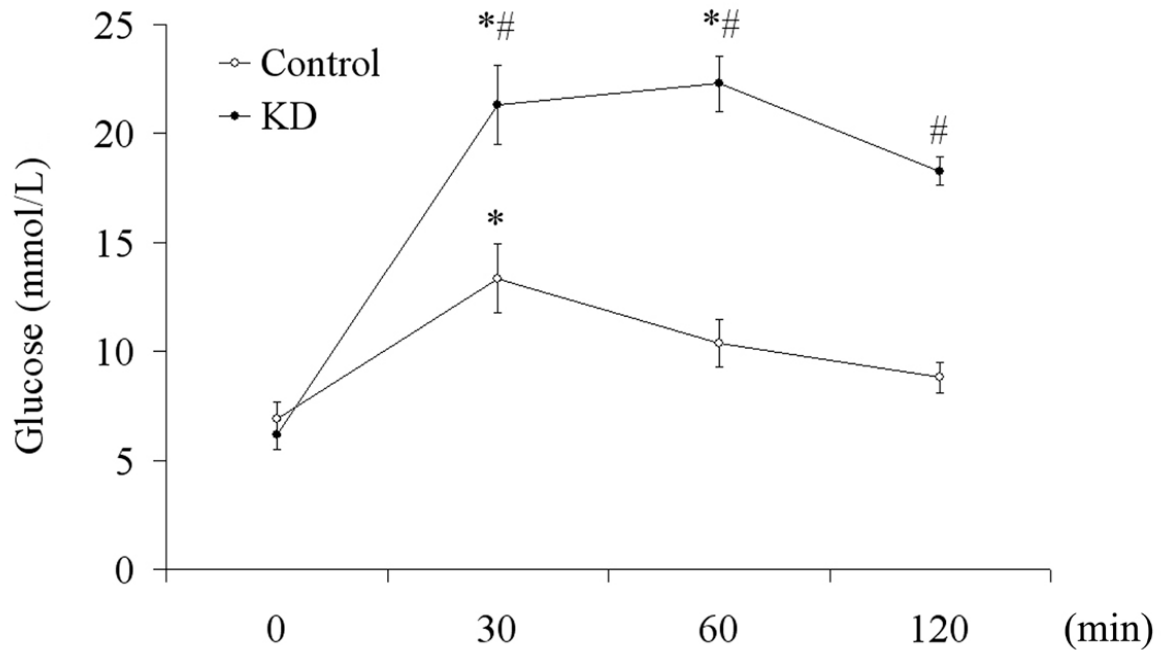


Figure 3. Intraperitoneal glucose tolerance test. Awake overnight-starved control and KD-fed rats (6 weeks) were given an intraperitoneal injection of glucose (2 mg/g of body wt). Blood samples were taken at the times indicated from the tail vein of the same animal. Glucose was measured as indicated in MATERIAL AND METHODS. Results are means \pm SE of 4 - 5 animals for each group. * Significant differences among the treatment groups were analyzed by ANOVA with post-test Tukey. # Significant difference from control, analyzed by Student's *t* test. $P < 0.05$.

DISCUSSÃO

Conforme resultados prévios, nós observamos uma perda de peso em ratos tratados com a dieta cetogênica ao longo das seis primeiras semanas de tratamento (Ziegler et al., 2002). Uma diminuição do peso corporal foi observada a partir da segunda semana, e uma redução maior que 30% foi observada entre a quarta e a quinta semana de tratamento com a dieta cetogênica. Alterações no peso corpóreo também têm sido observadas em crianças tratadas com a dieta (Vining et al., 2002; Liu et al., 2003; Peterson et al., 2005). Esta redução, observada em humanos e roedores, não pode decorrer da perda de glicogênio ou de água associada à estrutura do glicogênio característicos do início do jejum ou de dietas hiperlipídicas (Astrup et al., 2004). Em nossos estudos, de acordo com outros trabalhos realizados em humanos e também em roedores, constatamos níveis de proteinemia normal durante o tratamento com a dieta cetogênica. No entanto, é importante mencionar que esta diferença no peso corporal desaparece a partir da décima segunda semana de tratamento (dados não apresentados), e possivelmente mudanças a longo prazo envolvem outros mecanismos ainda não esclarecidos.

Contrariamente a esta redução de peso corporal, podemos observar um aumento no peso do tecido adiposo já a partir da primeira semana de tratamento. A razão peso do tecido adiposo/peso corporal nos ratos alimentados com a dieta cetogênica foi 2,4 vezes mais elevada em relação aos controles, permanecendo constante durante as seis semanas de tratamento. Em função do teor de carboidratos estarem drasticamente reduzido na dieta cetogênica, uma intensa gliconeogênese mobiliza proteínas musculares a fim de manter os níveis de glicemia fisiológicos. Os aminoácidos musculares também são mobilizados pela gliceroneogênese, com o objetivo de prover G3P para a re-esterificação de AGs no tecido adiposo (Hanson e Reshef, 2003). A perda de peso corporal se torna mais relevante quando

consideramos o paralelo do acúmulo de gordura. Os lipídeos circulantes são monitorados durante a dieta cetogênica e comumente a lipemia é surpreendentemente normal em humanos (Liu et al., 2003) e em ratos, mesmo com alimentação *ad libitum* (Ziegler et al., 2002). Neste sentido, alguns benefícios à saúde do coração têm sido atribuídos à dieta cetogênica (Dashti et al., 2003). Se a alta ingestão de gordura está acompanhada por níveis normais de lipídeos plasmáticos é possível imaginar um sistema muito eficiente de estoque e mobilização de lipídeos.

Para investigarmos este aspecto, foram feitos ensaios para dosar a atividade da PEPCCK, que é uma enzima chave para a gliceroneogênese (Reshef et al., 2003), no tecido adiposo. Esta rota está ativada durante o jejum e é crucial para a re-esterificação de AGs no tecido adiposo e subsequente cetogênese no fígado. É importante ressaltar que a fração de AGs livres durante a lipólise, os quais são reciclados de volta a triacilglicerol (re-esterificação), representa cerca de 30%. Estudos detalhados sobre o balanço da quantidade de ácidos graxos livres e glicerol, liberados do tecido adiposo durante o jejum indicaram uma alta taxa de re-esterificação de AGL no tecido adiposo em períodos de intensa lipólise. A re-esterificação de AGL também ocorre em outros tecidos como, por exemplo, o fígado e possivelmente no músculo. A re-esterificação intracelular (isto é, aquela que ocorre principalmente no tecido adiposo) é responsável por cerca de 20 a 30% do total enquanto que a re-esterificação que ocorre em outros tecidos (principalmente no fígado) soma cerca de 50% da re-esterificação de AGL em adultos saudáveis após o jejum de uma noite (Reshef et al. 2003; Beale et al., 2004).

A PEPCCK tem sua atividade regulada pela insulina e glucagon. No tecido adiposo, ao contrário do fígado, esta enzima é inibida pelos glicocorticóides (Nechushtan et al., 1987). Em nosso estudo, encontramos a atividade da PEPCCK elevada nos ratos tratados com a dieta cetogênica. Esta alta atividade fornece G3P suficiente para a síntese de triacilglicerol no

tecido adiposo, reduzindo dessa maneira a quantidade de lipídeos circulantes nos ratos alimentados com a dieta cetogênica. Outro estudo realizado com ratos tratados com dieta hiperprotéica e hipoglicídica também demonstrou aumento na atividade da PEPCK (Botion et al., 1995).

Considerando que o aumento de tecido adiposo é uma nova característica para investigação na dieta cetogênica, nós avaliamos se esse acúmulo de gordura poderia estar afetando a resistência à insulina, que tem sido apontada como elemento chave para entender muitos problemas resultantes da obesidade visceral (Riccardi et al., 2004). Observamos uma clara mudança na tolerância à glicose nos animais cetogênicos. Esses dados nos permitem especular sobre uma possível forma de resistência à insulina. A resistência à insulina é um dos fatores que contribuem para a síndrome metabólica, a qual está associada com elevado risco para diabetes e doenças cardiovasculares (Eckel et al., 2005).

O elevado fluxo de AGs livres parece ser outro fator importante que contribui para a síndrome metabólica. Entretanto, em camundongos que super-expressam PEPCK no tecido adiposo não foram observadas associações entre adiposidade e resistência à insulina (Franckhauser et al., 2002). Esses autores sugerem que o aumento dos estoques de gordura, evitando desta forma os efeitos tóxicos dos altos níveis de AGs livres circulantes, pode proteger contra a resistência à insulina.

No caso de administração de uma dieta cetogênica, ocorre a mimetização do perfil metabólico do jejum, com a observação de que os AGs livres circulantes também são provenientes da dieta. Segundo Fraser et al. (2003), crianças tratadas com dieta cetogênica apresentam níveis mais elevados de AGs livres circulantes. Em ratos alimentados com a dieta cetogênica pode estar ocorrendo um elevado fluxo de AGs livres (Fraser et al., 2003) e isso não é necessariamente acompanhado pela dislipidemia observada na síndrome metabólica, particularmente caracterizada pelos altos níveis de triacilgliceróis (Eckel et al., 2005). Em

nosso estudo, encontramos dados que mostram níveis lipêmicos normais, bem como outros estudos realizados com humanos e roedores sob administração da dieta. No entanto, esta lipemia normal não reflete normalidade na distribuição e no estoque de ácidos graxos. Além disso, a grande maioria dos dados sobre a regulação da PEPCK é em roedores e uma elevada gliceroneogênese e suas conseqüências necessitam de mais investigações em humanos.

Em suma, nossos dados indicam, pela primeira vez, um elevado acúmulo de gordura, em ratos tratados com a dieta cetogênica, apesar de apresentarem níveis lipêmicos normais, reportados aqui e em vários outros trabalhos. A lipogênese visceral foi mantida por um aumento da atividade da PEPCK, fornecendo assim, quantidades suficientes de G3P para a síntese de triacilglicerol. Esse acúmulo de gordura foi acompanhado por intolerância à glicose. Esses dados contribuem para a compreensão dos efeitos metabólicos da dieta cetogênica e sugerem alguns riscos potenciais dessa dieta.

7 CONCLUSÕES

Conclusões Parciais

Em função dos resultados obtidos com ratos que receberam dieta normal e dieta cetogênica durante seis semanas pode-se concluir que:

1. O aumento de massa adiposa total em ratos tratados com dieta cetogênica indica que o ciclo fútil nos adipócitos está deslocado para o lado da lipogênese.
2. Apesar de não haver diferença significativa entre o peso de tecido adiposo na primeira semana de dieta, a relação peso de tecido adiposo / peso corporal nos ratos tratados com dieta cetogênica apresenta um aumento de três vezes desde a primeira semana de vida pós-natal e se mantém até a última semana de tratamento. Este perfil demonstra um efeito da dieta cetogênica sobre aumento de tecido adiposo já na primeira semana de tratamento.
3. O aumento da atividade da enzima PEPCK no tecido adiposo de ratos tratados com dieta cetogênica pode estar relacionada com a formação de glicerol por gliceroneogênese, levando à re-esterificação de ácidos graxos e consequentemente ao maior estoque de triacilgliceróis.
4. O aumento do estoque de lipídeos na forma de triacilgliceróis pode ser resultado de um mecanismo de proteção contra o aumento de ácidos graxos livres, os quais podem estar envolvidos em estresse oxidativo e resistência à insulina. Apesar disto, a maior tolerância à glicose nestes animais pode sugerir um quadro de resistência à insulina, provavelmente devido ao grande aporte de lipídeos da dieta.

Conclusão Final

Com base nos resultados descritos nesta dissertação, pode-se concluir que a dieta cetogênica pode ocasionar alguns danos periféricos ao organismo, como intolerância à glicose, sugerindo um quadro de resistência à insulina e maior acúmulo de tecido adiposo branco. Segundo Robbins et al. (1996) a obesidade é definida como o excesso de gordura corporal. Desta forma, podemos concluir que os dados obtidos também caracterizam o desenvolvimento de obesidade nesses animais. Apesar de esta dieta ser bastante utilizada como terapia em pacientes com epilepsia e ter sua eficácia comprovada na proteção cerebral contra as crises, são necessários estudos posteriores com ratos e também com humanos, para que se possa definir o grau de comprometimento que esta dieta possa estar causando ao organismo.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta dissertação originaram novas perspectivas de trabalho que podem contribuir para esclarecer o efeito da dieta cetogênica em vários aspectos do metabolismo. Algumas estratégias que serão abordadas são:

A. Em pacientes epiléticos tratados com dieta cetogênica:

1. Avaliar a composição corporal (percentual de massa magra e gorda) e evolução ponderal;
2. Avaliar parâmetros bioquímicos do soro;
3. Dosagem de hormônios envolvidos na regulação do apetite, tais como leptina e grelina;

B. Em ratos tratados com dieta cetogênica:

1. Investigar o efeito de insulina, através do teste de resistência à insulina;
2. Quantificar alguns marcadores da atividade do tecido adiposo na corrente sanguínea; tais como: insulina, leptina e S100B;
4. Verificar a expressão gênica do fator de transcrição PPAR gama no tecido adiposo.
5. Dosagem de hormônios envolvidos na regulação do apetite, tais como leptina e grelina nas diversas estruturas;
6. Quantificar ácidos graxos livres.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA RS, FLIER JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **Trends Endocrinol Metab.** Oct; 11(8): 327-32; 2000. Review.

ALFORD BB, BLANKENSHIP AC, HAGEN RD. The effects of variations in carbohydrate, protein, and fat content of the diet upon weight loss, blood values, and nutrient intake of adult obese women. **J Am Diet Assoc**, 90:534–540, 1990.

ANDERSON GD, RHO JM & BOUGH KJ. Rats fed a ketogenic diet exhibit significantly elevated levels of long chain, polyunsaturated fatty acids. **Epilepsia** 42:262–263, 2001.

ASTRUP A, MEINERT LT & HARPER A. Atkins and other low-carbohydrate diets: hoax or an effective tool for weight loss? **Lancet**. 364:897-9, 2004.

ATKINS RC. **Dr. Atkins' New Diet Revolution**. 1. ed. New York.: Harpercollins, 1972. 540p.

BALLARD FJ, HANSON RW, LEVEILLE GA. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. **J Biol Chem**. Jun 10;242(11):2746-50, 1967.

BEALE EG, HAMMER RE, ANTOINE B, FOREST C. Glyceroneogenesis comes of age. **FASEB J**. Nov; 16(13): 1695-6 2002. Review.

BEALE EG, HAMMER RE, ANTOINE B, FOREST C. Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. **Trends Endocrinol Metab**. Apr;15(3):129-35, 2004. Review. Erratum in: **Trends Endocrinol Metab**. Jul; 15(5): 192 2004.

BELL D, MARGEN S, CALLOWAY H. Ketosis, weight loss, uric acid, and nitrogen balance in obese women fed single nutrients at low calorie levels. **Metabolism**, 18:193–208, 1969.

BOTION LM, KETTELHUT IC & MIGLIORINI RH. Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. **Horm. Metab. Res.** 27:310-3, 1995.

CHALDAKOV GN, STANKULOV IS, HRISTOVA M, GHENEV PI. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. **Curr Pharm Des**, 9: 1023-1031, 2003.

CHALDAKOV GN, FIORE M, HRISTOVA MG, ALOE L. Metabotropic potential of neurotrophins: implication in obesity and related diseases? **Med Sci Monit**, 9 (10), 19-21, 2003.

CHAMPIGNY O, RICQUIER D. Evidence from in vitro differentiating cells that adrenoceptor agonists can increase uncoupling protein mRNA level in adipocytes of adult humans: an RT-PCR study. **J. Lipid Res**, 37:1907–14, 1996.

CRONIGER CM, OLSWANG Y, RESHEF L, KALHAN SC, TILGHMAN SM, HANSON RW. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Revisited. Insights into its metabolic role. **Biochemistry and Molecular Biology Education**. Vol. 30, No. 1, pp. 14–20, 2002.

DASHTI HM, BO-ABBAS YY, ASFAR SK, MATHEW TC, HUSSEIN T, BEHBAHANI A, KHOURSHEED MA, AL-SAYER HM, AL-ZAID NS. Ketogenic diet modifies the risk factors of heart disease in obese patients. **Nutrition**. Oct;19(10):901-2, 2003.

DIGIROLAMO M, FINE JB. Obesity. In: Branch WT Jr, Alexander RW, Schlant RC, Hurst J (eds). **Cardiology in Primary Care**, McGraw-Hill: New York, 2000, pp 265–278.

DUFFY TH, MARKOVITZ PJ, CHUANG DT, UTTER MF, NOWAK T. Comparative inhibition of mitochondrial and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinases by stereospecific substrate analogues. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Nov;78(11):6680-3, 1981.

DUPLUS E, BENELLI C, REIS AF, FOUQUE F, VELHO G, FOREST C. Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in human adipose tissue: induction by rosiglitazone and genetic analyses of the adipocyte-specific region of the promoter in type 2 diabetes. **Biochimie**. Dec;85(12):1257-64, 2003.

ECKEL RH, GRUNDY SM & ZIMMET PZ. The metabolic syndrome. **Lancet**. 365:1415-28, 2005.

EVANS E, STOCK AL, YUDKIN J. The absence of undesirable changes during consumption of the low carbohydrate diet. **Nutr Metab**, 17:360–367, 1974.

FRANCKHAUSER S, MUNOZ S, PUJOL A, CASELLAS A, RIU E, OTAEGUI P, SU B & BOSCH F. Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. **Diabetes** 51:624-30, 2002.

Fraser DD, Whiting S, Andrew RD, Macdonald EA, Musa-Veloso K, Cunnane SC. Elevated polyunsaturated fatty acids in blood serum obtained from children on the ketogenic diet. **Neurology**, Mar 25;60(6):1026-9, 2003.

FRAYN KN, KARPE F, FIELDING BA, MACDONALD IA, COPPACK SW. Integrative physiology of human adipose tissue. **Inter J Obesity**, 27, 875-888, 2003.

FOREST C, TORDJMAN J, GLORIAN M, DUPLUS E, CHAUVET G, QUETTE J, BEALE EG, ANTOINE B. Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. **Biochemical Society**, 31: 1125-1129, 2003.

GARLID KD, JABUREK M, JEZEK P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. **FEBS Letts**, 438:10–14, 1998.

GARRUTI G, RICQUIER D. Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 16:383–90, 1992.

GOLAY A, EIGENHEER C, MOREL Y, KUJAWSKI P, LEHMANN T, DE TONNAC N. Weight-loss with low or high carbohydrate diet? **Int J Obes Relat Metab Disord**, 20:1067–1072, 1996.

GORIN E, TAL-OR Z, SHAFRIR E. Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats. **Eur J Biochem**. Apr; 8(3):370-5, 1969.

HANSON RW & RESHEF L. Glyceroneogenesis revisited. **Biochimie**. 85:1199-205, 2003.

HAUSMAN DB, DIGIROLAMO M, BARTNESS TJ, HAUSMAN GJ, MARTIN RJ. The biology of white adipocyte proliferation. **Obes Rev**, (2):239-254, 2001. Review.

KERSTEN S, MANDARD S, TAN NS, ESCHER P, METZGER D, CHAMBON P, GONZALEZ FJ, DESVERGNE B, WAHLI W. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator- activated receptor target gene. **J Biol Chem**, 275: 28488–28493, 2000.

KERSTEN S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO Rep**. Apr;2(4):282-6, 2001. Review.

LIU YM, WILLIAMS S, BASUALDO-HAMMOND C, STEPHENS D & CURTIS RA prospective study: growth and nutritional status of children treated with the ketogenic diet. **J. Am. Diet. Assoc**. 103:707-12, 2003.

LOWELL BB, BACHMAN ES. β -adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis and obesity. **J Biol Chem**, 278 (32): 29385-29388, 2003.

MARKS DB, MARKS AD, SMITH CM. **Basic Medical Biochemistry – A clinical Approach**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1996.

NECHUSHTAN H, BENVENISTY N, BRANDEIS R & RESHEF L. Glucocorticoids control phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in a tissue specific manner. **Nucleic Acids Res**. 15:6405-17, 1987.

NORDLI DR JR, DE VIVO DC. The ketogenic diet revisited: back to the future. **Epilepsia**, 38:743-749, Editorial Comment, 1997.

NORDLI D. The ketogenic diet: uses and abuses. **Neurology**, 25; 58 (12):S21-24. Review, 2002.

PETERSON SJ, TANGNEY CC, PIMENTEL-ZABLAH EM, HJELMGREN B, BOOTH G & BERRY-KRAVIS E. Changes in growth and seizure reduction in children on the ketogenic diet as a treatment for intractable epilepsy. **J. Am. Diet. Assoc**. 105:718-25, 2005.

RAMOS AMF, RIZZUTTI S. **Dieta Cetogênica – Uma Alternativa para a Epilepsia Refratária**. 1. ed. São Paulo: Lemos, 2004.160p.

RESHEF L, OLSWANG Y, CASSUTO H, BLUM B, CRONIGER CM, KALHAN SC, TILGHMAN SM, HANSON RW. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle.

J Biol Chem. Aug 15;278(33):30413-6, 2003. Epub Jun 4, 2003. Review.

RICCARDI G, AGGETT P, BRIGHENTI F, DELZENNE N, FRAYN K, NIEUWENHUIZEN A, PANNEMANS D, THEIS S, TUIJTELAARS S & VESSBY B. PASSCLAIM--body weight regulation, insulin sensitivity and diabetes risk. **Eur. J. Nutr.** 43:II7-II46, 2004.

ROBBINS SL, KUMAR V, COTRAN RS. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.1277p.

ROSEN ED, SPIEGELMAN BM. Molecular Regulation of Adipogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 16: 145-171, 2000.

ROSS MH, REITH EJ, ROMRELL J. **Histologia texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993.

SANKAR R, SOTERO DE MENEZES M. Metabolic and endocrine aspects of the ketogenic diet. **Epilepsy Research**, 37(3):191-201, 1999.

SPIEGELMAN M, FLIER JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. **Cell**, 87: 377-389, 1996.

VINING EP, PYZIK P, MCGROGAN J, HLADKY H, ANAND A, KRIEGLER S & FREEMAN JM. Growth of children on the ketogenic diet. **Dev. Med. Child. Neurol.** 44:796-802, 2002.

WELDON SL, RANDO A, MATATHIAS AS, HOD Y, KALONICK PA, SAVON S, COOK JS, HANSON RW. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase from the chicken. Comparison of the cDNA and protein sequences with the cytosolic isozyme. **J Biol Chem**. May 5;265(13):7308-17, 1990.

YANG MU, VAN ITALLIE B. Composition of weight loss during short-term weight reduction. Metabolic responses of obese subjects to starvation and low-calorie ketogenic and nonketogenic diets. **J Clin Invest**, 58:722-730, 1976.

ZIEGLER DR, ARAUJO E, ROTTA LN, PERRY ML, GONÇALVES CA. Ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. **Journal of Nutrition**, 132 (3): 483-487, 2002.