

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

**EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA COM DIFERENTES
COMPOSIÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS NO
METABOLISMO PERIFÉRICO E NEUROGLIAL DE RATOS
*Wistar***

Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete

Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre

2012

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

**EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA COM DIFERENTES
COMPOSIÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS NO
METABOLISMO PERIFÉRICO E NEUROGLIAL DE RATOS
*Wistar***

Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete

Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2012.

"A vida é como jogar uma bola na parede:
Se for jogada uma bola azul, ela voltará azul;
Se for jogada uma bola verde, ela voltará verde;
Se a bola for jogada fraca, ela voltará fraca;
Se a bola for jogada com força, ela voltará com força.
Por isso, nunca "jogue uma bola na vida" de forma
que você não esteja pronto a recebê-la.
A vida não dá nem empresta;
não se comove nem se apieda.
Tudo quanto ela faz é retribuir e transferir
aquilo que nós lhe oferecemos."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo amor, incentivo e apoio em toda a minha vida. Em especial à minha mãe que está sempre por perto sendo aquela *mãezona*.

À Jô pela nossa grande amizade e por todas nossas conversas que me incentivaram a voltar à pesquisa. Aos meus dois grandes amigos, Lê e Jef, pela atenção e carinho em todos esses anos.

Ao meu orientador, C.A., por ter acreditado em mim e pela oportunidade de novamente fazer pesquisa. Obrigada pela disponibilidade e “por ter me permitido entrar na festa”!

À Júlia por incontáveis vezes que fui incomodar e discutir sobre ração e lipídios – obrigada por toda a atenção.

À Letícia Ribeiro que no meio do feriado deixou de ficar com a família para me ensinar sobre dieta cetogênica.

À Caroline e Ana Feoli por também disponibilizarem seus tempos e discutirem sobre o projeto.

Ao laboratório 33 – em especial a Dani, hoje *mãezona* da Helena, obrigada por todos os seus ensinamentos e oportunidades. Caren pela amigona que és e sempre será, saiba que me ajudaste muito. Lucas pelo carinho especial e boas risadas. Cris e Paty pelo bom humor e pelas conversas. Márcio, Maria, Marina, Rê, Ana pela grande ajuda no trabalho. Enfim, “por me deixarem entrar na pista e me ensinarem a dançar de novo”.

Ao grupo do Prof. Perry, o pessoal do laboratório 27, em especial ao Adriano e a Ana, por toda a ajuda em tirar minhas dúvidas sobre ração e por toda a disponibilidade.

À Lize que começou uma nova vida em Floripa, mas que está em meus pensamentos. A Dê, querida, pelas conversas. Claudinha por ser meu presente de mestrado!

Agradeço também à UFRGS e aos órgãos de apoio à pesquisa, que viabilizaram a execução do projeto.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

PARTE I	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
I.INTRODUÇÃO	6
I.1. Dieta cetogênica.....	6
I.2. Ácidos graxos poliinsaturados	11
I.3. Metabolismo astrocítico	14
I.4. Fator de necrose tumoral alfa.....	17
I.5. Fator de crescimento derivado do encéfalo.....	17
I.6. Proteína S100B	19
I.7. Glutathiona	19
I.8. Proteína desacopladora mitocondrial.....	21
II. OBJETIVOS.....	23
PARTE II	24
Capítulo 1.....	25
PARTE III	49
III. DISCUSSÃO	50
IV. CONCLUSÃO.....	61
V.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	76

PARTE I

RESUMO

A dieta cetogênica (DC) é constituída por alta quantidade de ácidos graxos, baixa ou ausência de carboidratos e baixos ou normais níveis de proteínas. Na ingestão de DC promove substituição parcial de glicose por corpos cetônicos (CCs) como combustível energético. Além de CCs, o teor e proporção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) pode ser considerado um mediador dos efeitos de DC. A DC tem sido proposta como uma abordagem neuroprotetora em casos de epilepsia refratária, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, transtornos psiquiátricos como a depressão e a doença bipolar. No entanto, o mecanismo de ação neuroprotetora da dieta não é bem conhecido e seus efeitos sobre o SNC são limitados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da DC com diferentes composições de PUFAs no metabolismo periférico e neuroglial. Ratos Wistar machos (30 dias) foram submetidos a 8 semanas de ingestão de diferentes dietas: controle, cetogênica clássica e cetogênica enriquecida com ômega-3. Ao final do tratamento, foram analisados parâmetros bioquímicos da periferia e do sistema nervoso central. Não houve alterações no perfil sérico dos animais e ambas DCs promoveram cetogênese nos animais. As DCs reduziram os níveis de duas moléculas supostamente com ação neurotrófica no SNC: BDNF no estriado e S100B no líquido cefalorraquidiano de ratos. Enquanto que, o nível de GSH aumentou no hipocampo. Essas alterações não foram afetadas pela proporção de PUFAs entre as diferentes DCs. Esses achados reforçam a importância desta dieta como indutor de mudanças do SNC, o que pode contribuir para entender a atividade neuroprotetora ou efeitos colaterais da DC em distúrbios cerebrais.

ABSTRACT

The ketogenic diet (KD) is constituted by high amount of fatty acids, low or absence of carbohydrates and low or normal protein levels. It has been proposed that ketone bodies partially replace glucose consumption as a fuel to maintain neuronal activity. In addition to KBs, the content and proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) can be considered as a mediator of KD. The KD have been proposed as one approach neuroprotective in cases of refractory epilepsy, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, psychiatric disorders as depression and bipolar disorder. However, the mechanism of their neuroprotective's action is not well known and its effects on the CNS is limited. The objective of this study was to evaluate the effect of KD with different compositions of PUFAs in neuronal and peripheral metabolism. Male Wistar rats (30 days) fed 8 weeks of different diets: control, classic ketogenic and ketogenic enriched with omega-3. At the treatment end, were analyzed biochemical parameters from the periphery and CNS. No change on serum profile of animals, both KDs were ketogenic's effects in animals. The KDs reduced the levels of two putatively-neurotrophic molecules of two molecules supposedly neurotrophic with the CNS, BDNF in the striatum and S100B in cerebrospinal fluid of rats. However, the level of GSH increased in the hippocampus. These changes were not affected by the proportion of PUFAs between different KDs. These findings reinforce the importance of diet to induce changes in the CNS, which may contribute to understand the neuroprotective activity (or effects) of the KD on brain disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfatada

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo

β HB: β -hidroxibutirato

BHE: barreira hemato-encefálica

CC: corpo cetônico

GLUT: transportador de glicose

GSH: glutationa

DC: dieta cetogênica

LCR: líquido cefalorraquidiano

MCT: transportador de ácidos monocarboxílicos

PUFA: ácido graxo poliinsaturado

SNC: sistema nervoso central

s-DC: dieta cetogênica clássica

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UCP: proteína desacopladora

w3-DC: dieta cetogênica enriquecida com ômega-3

I - INTRODUÇÃO

I.1. Dieta Cetogênica

A dieta cetogênica (DC) é constituída por alta concentração de lipídios, baixa ou ausência de carboidratos e níveis baixos ou normais de proteínas (Freeman et al 2006; Hartman et al 2007).

Durante a ingestão crônica de alta quantidade de lipídios e baixa de carboidratos, o metabolismo sofre alterações semelhantes ao que ocorre no jejum, como o aumento de lipólise, gliconeogênese e síntese de corpos cetônicos, como acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona, a partir de lipídios para consumo energético. O fígado é o principal local de síntese de corpos cetônicos. Entretanto, no sistema nervoso central (SNC), os astrócitos também são capazes de sintetizar corpos cetônicos a partir de lipídios (Baranano & Hartman 2008; Maalouf et al 2009). Silva em 2005 demonstrou que a DC é capaz de promover a proliferação da glia, especificamente os astrócitos, na região CA3 do hipocampo, esta astrogliose não afeta prejudicialmente o sistema nervoso central e sim melhora a eficiência da síntese de corpos cetônicos pelos astrócitos (Silva et al 2005).

Durante a DC, a energia para a manutenção da atividade celular é obtida da β -oxidação na mitocôndria a partir dos ácidos graxos provindos da dieta, que em níveis elevados gera alta quantidade de acetil-CoA, intermediário que será direcionado para o Ciclo de Krebs e a síntese de adenosina trifosfatada (ATP) (Baranano & Hartman 2008; Kim do & Rho 2008). Entretanto, moléculas de oxaloacetato, intermediário inicial do ciclo, são desviadas para a gliconeogênese a fim de manter os níveis de glicose no organismo.

Conseqüentemente, moléculas de acetil-Coa acumulam no citosol e são destinadas para síntese de corpos cetônicos, como β -hidroxibutirato, acetoacetato e acetona (figura 1) (Hartman et al 2007). Destes, o principal corpo cetônico (CC) é o β -hidroxibutirato (78%) e a acetona é volátil, sendo excretada na respiração pulmonar ou metabolizada em outros compostos como acetol, 1,2-propanediol, metilglioxal e ácido pirúvico (Hartman et al 2007).

Os corpos cetônicos formados substituirão parcialmente o papel da glicose na oxidação e síntese de ATP (figura 1). Em geral, células portadoras de mitocôndria e com elevado metabolismo energético serão o destino do consumo dos corpos cetônicos (por exemplo, sistema nervoso central e músculos esquelético e cardíaco) (Westman et al 2003). Os corpos cetônicos são convertidos à acetil-CoA pela D- β -hidroxibutirato desidrogenase, acetoacetato-succinil-CoA transferase e acetoacetil-CoA tiolase, que é oxidado no Ciclo de Krebs gerando energia para a síntese de ATP (Hartman et al 2007).

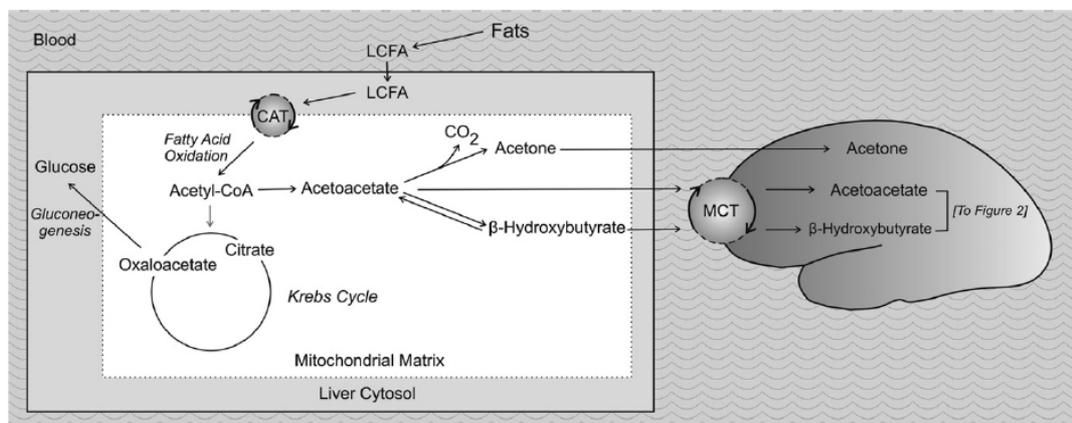


Figura 1: Alterações no metabolismo decorrentes de dieta cetogênica. A alta ingestão de lipídios e baixo nível de carboidrato, aumenta a β -oxidação e gliconeogênese. O intermediário do Ciclo de Krebs, oxaloacetato é desviado para síntese de glicose, diminuindo a eficiência do Ciclo de Krebs. O Acetil-CoA gerado pela degradação de ácidos graxos acumula e, então, é utilizado

para síntese de corpos cetônicos (acetoacetato, acetona e B-hidroxibutirato). Estes compostos conseguem atravessar a barreira hematoencefálica através dos transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT) ocorrendo uma substituição parcial da glicose como combustível para o sistema nervoso central. (figura retirada de Hartman et al, 2007).

As alterações bioquímicas decorrentes da ingestão da dieta cetogênica também ocorrem no sistema nervoso central, cujo metabolismo energético substitui parcialmente a glicose por corpos cetônicos como combustível energético em uma resposta adaptativa a fim de manter a atividade neuronal (Melo et al 2006). Os corpos cetônicos diferentemente dos ácidos graxos conseguem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) através dos transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT). Este transporte ocorre principalmente pela presença de MCT1 nas células endoteliais. No sistema nervoso, os corpos cetônicos são captados e catabolizados tanto por neurônios quanto por astrócitos, via MCT2 e MCT4, respectivamente (Hartman et al 2007; Pierre & Pellerin 2005). Tanto no estado de jejum quanto na dieta cetogênica há um aumento da permeabilidade da BHE por corpos cetônicos devido ao aumento da expressão de MCTs (Maalouf et al 2009).

No sistema nervoso central, o corpo cetônico principalmente metabolizado é o β -hidroxibutirato (β HB) devido à presença de sistema enzimático específico para a sua metabolização no encéfalo (β -hidroxibutirato desidrogenase, β -cetoácido-Coa-transferase, acetil-CoA transferase).

Originalmente, a dieta cetogênica foi empregada para tratar casos de epilepsia refratária, diminuindo as convulsões e choques epiléticos (Freeman et al 2006; Hartman et al 2007). Atualmente, sua utilização vem sendo ampliada para tratar outras disfunções neuronais como doença de Parkinson (Vanitallie et al 2005), doença de Alzheimer (Henderson 2008; Van der Auwera et al 2005), esclerose lateral amiotrófica e depressão (Zhao et al 2006), isquemia cerebral (Tai et al 2008), doença bipolar (El-Mallakh & Paskitti 2001) e autismo (Evangelidou et al 2003).

Entretanto, o mecanismo de ação da cetogênese não está completamente elucidado. Schwartzkroin em 1999, hipotetizou que a diminuição da epileptogênese e a neuroproteção poderia ser resultado da cetogênese promovida pela dieta rica em lipídios e alteração do metabolismo energético (Schwartzkroin 1999). A alteração do consumo de substratos energéticos e direcionamento de rotas não usuais para a síntese de ATP promoveria mudanças na excitabilidade neuronal, como aumento ou diminuição da síntese de neurotransmissores (Bough 2008). Sabe-se que além do papel energético, os corpos cetônicos também são capazes de induzir modificações na atividade neurotransmissora e sináptica, alterando o equilíbrio de concentração de neurotransmissores excitatórios e inibitórios e os níveis de fatores neuromoduladores e neurotróficos. Os corpos cetônicos participam de síntese de aminoácidos e neurotransmissores, como o *ácido γ -aminobutírico* (GABA) (Kunnecke et al 1993; Yudkoff et al 2005). Em um estudo com marcação radioativa, foi comprovada a diminuição da concentração total de glutamato no cérebro em resposta a dieta cetogênica (Melo et al 2006).

Estudos mais atuais incluíram diferentes formas de modulação das rotas celulares em resposta aos elevados níveis de corpos cetônicos gerados pela administração da dieta cetogênica. Acetoacetato e β -hidroxibutirato interferem nas reações energéticas da célula promovendo a elevação do Ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, assim como a diminuição nas reações de transaminação a partir de intermediários do Ciclo de Krebs (Hartman et al 2007). O aumento do metabolismo mitocondrial e da concentração intracelular de ATP promove neuroproteção ao fornecer energia, diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), manter o estado redox mitocondrial e favorecer a síntese de neurotransmissores (Baranano & Hartman 2008; Maalouf et al 2009; Veech 2004). Maalouf em revisão de 2009, hipotetizou que um dos mecanismos de ação da dieta seria a regulação da atividade mitocondrial, como a modulação da produção de EROs e a atividade antioxidante da mitocôndria. Outros estudos suportam evidências desta ação da dieta sobre a mitocôndria (Milder & Patel 2011). Ratos alimentados com DC apresentam aumento da expressão e da atividade de proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) (Sullivan et al 2004), bem como, o aumento do conteúdo de glutatona (Jarrett et al 2008) e glutatona peroxidase (Ziegler et al 2003) no hipocampo.

Maalouf (2009) também discute que um dos efeitos da DC é promover restrição calórica devido a ambos tratamentos promoverem alterações similares no metabolismo energético do organismo. É importante destacar que a restrição calórica possui efeito neuroprotetor em doenças cerebrais diversas e assim como a DC também altera o metabolismo energético, que resulta em mudanças mitocondriais e antioxidantes. A atividade da restrição calórica tem

sido atribuída a mudanças no equilíbrio e expressão de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF-alfa) e fatores neurotróficos (por exemplo, o fator de crescimento derivado do encéfalo - BDNF). Estudos sugerem que a ingestão de DC, diminui os níveis de S100B no líquido de ratos (Ziegler et al 2004) e promove alterações nos parâmetros inflamatórios (Adibhatla & Hatcher 2008; Jeong et al 2011; Ruskin et al 2009).

I. 2. Ácidos Graxos Poliinsaturados

Além dos corpos cetônicos, sugere-se que outro efeito da DC é de elevar os níveis e alterar a proporção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) que modulam diversas reações no organismo (Borges 2008; Cunnane 2004).

Observa-se que a dieta cetogênica quando enriquecida com PUFAs, como ácido linolênico (ômega-3) e linoléico (ômega-6) é capaz de aumentar a cetogênese do organismo (Cunnane 2004; Pifferi et al 2008). O ácido linolênico e linoléico são altamente cetogênicos devido a um processo de reciclagem de carbonos, tanto o ômega-3 quanto o ômega-6 podem ser fonte de carbonos para a cetogênese. Na reciclagem, o carbono provindo de PUFAs pode ser removido do esqueleto carbônico e se ligar na porção terminal de moléculas lipídicas, como colesterol ou ácidos graxos saturados ou monoinsaturados (Cunnane 2004).

Acredita-se que os ácidos linolênico e linoléico podem ser usados preferencialmente na indução da cetogênese devido a sua alta conversão em corpos cetônicos ou pela sua abundância no organismo. Cunnane em 2004, postulou que esta preferência de conversão poderia ser primeiramente para

proteger a célula de danos causados por radicais livres formados pela alta facilidade de peroxidação destes ácidos graxos. Outra razão seria a capacidade limitada do SNC em desenvolvimento de captar palmitato e colesterol. O encéfalo a fim de manter sua atividade e desenvolvimento, converte linoleato e linoléico em lipídios. E finalmente, devido ao fígado abundantemente captar e converter o palmitato em surfactante, os PUFAs tornam-se disponíveis para reciclagem e conversão em outros lipídios, suprimindo a necessidade do encéfalo de sintetizar CCs que conseguem atravessar a BHE através de MCTs (Cunnane 2004).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são ácidos graxos formados por cadeias carbonadas longas e com múltiplas ligações duplas no esqueleto carbônico, abrangendo as famílias de ácidos graxos ômega-3 (ω 3) e ômega-6 (ω 6) (Curi et al, 2002).

Os mamíferos não são capazes de introduzir ligações duplas entre os C1 e C9 do ácido insaturado devido à ausência de enzimas específicas, tornando o ômega-3 e o ômega-6 ácidos graxos essenciais. Ômega-3 e ômega-6 não podem ser obtidos pela síntese de novo, mas podem ser formados a partir dos ácidos linolênico e linoléico, respectivamente, presentes na dieta (figura 2) (Marszalek & Lodish 2005). Os principais derivados originados do precursor ácido linolênico são ácido alfa-linolênico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaexanóico (DHA). O ácido linoléico

produz predominantemente o ácido araquidônico (AA) (Curi et al, 2002).

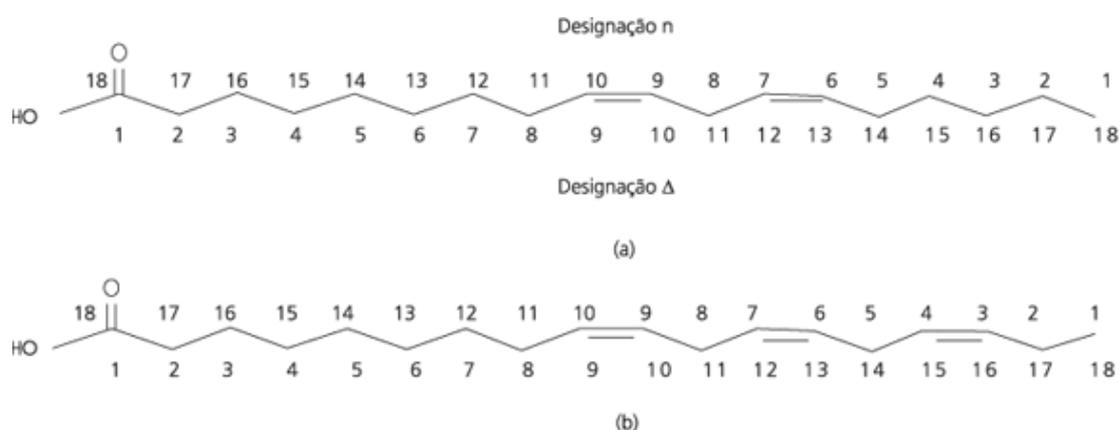


Figura 2: Estrutura dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) essenciais. a) Ácido linoléico (ômega-6). b) Ácido linolênico (ômega-3). (figura retirada de Martini et al, 2006)

O ácido linolênico e linoléico são abundantemente encontrados no SNC, constituindo as membranas neuronais. Os principais tipos são: ácido docosaexanóico (DHA, 22:6n-3) e ácido araquidônico (AA, 20:4n-6), respectivamente (Marszalek & Lodish 2005).

DHA controla o crescimento neurítico, sendo importante para o desenvolvimento do cérebro e da retina (Marszalek et al 2005; Marszalek & Lodish 2005). Nos neurônios, os PUFAs ao serem internalizados do meio extracelular para o meio intracelular, afetam a fluidez da membrana plasmática e alteram a atividade de proteínas integrais e/ou associadas à membrana (Rapoport 2001). Quando liberados da membrana neuronal, PUFAs podem ser convertidos em moléculas sinalizadoras do grupo eicosanóide, como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, modulando a resposta

imunológica no sistema nervoso (Serhan et al 2004). As moléculas de ômega-6 atuam de forma pró-inflamatória, enquanto que ômega-3 possui propriedade antiinflamatória (Marszalek & Lodish 2005).

O DHA também exerce atividade neuroprotetora, diminuindo de forma direta os efeitos da acumulação do peptídeo β amilóide e a hiperfosforilação da proteína *Tau*, diminuindo a formação de placas neuríticas e de neurofibrilas no cérebro, alterações que ocorrem na Doença de Alzheimer. Portanto, DHA possui papel na prevenção do declínio cognitivo e o desenvolvimento de demências (Florent et al 2006). Outra propriedade do DHA e de EPA que contribuem para neuroproteção é a ação anti-inflamatória, que modula os níveis de citocinas e ativação da microglia (Cunnane et al 2009).

A dieta rica em ômega-3 pode prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diminuindo os níveis séricos de triacilgliceróis o que contribui para uma redução da inflamação dos vasos sanguíneos e da formação de placas ateroscleróticas (Cunnane et al 2009).

A recomendação ideal de ingestão de PUFA e a razão ideal de ômega-6/ômega-3 na dieta para sua biodisponibilidade e conversão em AA e DHA é a proporção de 5:1 (Marszalek & Lodish 2005)

I. 3. Metabolismo astrocítico

O SNC é constituído basicamente por neurônios e células gliais. As células gliais mantêm o ambiente para a atividade dos neurônios e são agrupadas em 1) microglia, células de defesa, capazes de realizar fagocitose e envolvidas na resposta inflamatória, e 2) macroglia – composta por oligodendrócitos, células que sintetizam mielina e auxiliam na formação da

bainha de mielina presente no axônio de neurônios; células endoteliais, que revestem os ventrículos cerebrais, e astrócitos (Araque et al 1999; Jessen 2004; Perea et al 2009).

Os astrócitos são células que interagem com os neurônios e participam da regulação e organização da transmissão sináptica tornando a sinapse um evento que não apenas inclui os neurônios, mas também as células astrocíticas, o que atualmente caracteriza-se em sinapse tripartite (Araque et al, 1999; Blasko et. al., 2004). Os astrócitos participam da sinaptogênese ao sintetizar moléculas de adesão e fatores tróficos, promovendo o desenvolvimento do SNC.

Os astrócitos modulam a atividade sináptica ao controlar os níveis iônicos no espaço extracelular (Verkhratsky & Steinhauser 2000), principalmente, tamponando os níveis de potássio (K^+) através da presença de canais de K^+ (Kir) e de aquaporina 4 (AQP 4) (Seifert et al 2010). Também é capaz de regular a concentração de neurotransmissores na fenda sináptica (Kimmelberg e Katz, 1985), sendo uma célula importante no controle dos níveis de glutamato (Parpura et al 1994).

Os astrócitos são responsáveis pelo metabolismo de síntese e degradação de aminoácidos (Maragakis & Rothstein 2006), síntese e liberação de glutatona (Dickinson & Forman 2002; Dringen 2000). Também produzem fatores tróficos (Eriksen & Druse 2001; Yoo et al 2003), como resposta ao ambiente inflamatório (Saha & Pahan 2006) e estimulam a gliogênese, aumentando os níveis de microglia ativada e amplificando a resposta inflamatória (Sukumari-Ramesh et al 2010).

Outra grande importância dessas células é o seu papel energético para o SNC. Os astrócitos são células responsáveis pelo suporte energético para os neurônios (Pellerin 2005; Pellerin et al 2007; Simpson et al 2007) e participam da constituição da barreira hemato-encefálica (Abbott et al 2006) e junto com as células endoteliais são os grandes responsáveis pela captação de nutrientes para o SNC.

Os astrócitos em uma dieta balanceada e em um organismo saudável são responsáveis pela captação de glicose a partir do fluido presente na microvasculatura em torno do encéfalo através dos transportadores de glicose, o GLUT 1. Além disso, os astrócitos armazenam energia na forma de glicogênio (Brown & Ransom 2007; Brunet et al 2010; Schousboe et al 2010). Normalmente, os astrócitos através da via glicolítica consomem a glicose até piruvato que seguirá o metabolismo oxidativo a fim de sintetizar energia e outros compostos orgânicos mantendo as atividades astrocíticas. O piruvato produzido pela via glicolítica também pode ser convertido em lactato e este ser liberado para o espaço extracelular através de MCT4 (Simpson et al 2007), onde será o combustível preferencialmente consumido pelos neurônios que captam lactato via MCT2 (Simpson et al 2007) para seu metabolismo energético, num processo denominado “lançadeira de lactato astrócito-neurônio” (Pellerin 2003; Pellerin et al 2007; Schurr 2006).

Entretanto, durante a dieta cetogênica, os astrócitos substituem parcialmente a captação de glicose por corpos cetônicos que atravessam a BHE através de MCTs. Além disso, os próprios astrócitos conseguem sintetizar corpos cetônicos a partir de ácidos graxos (Auestad et al 1991) e do aminoácido leucina (Bixel & Hamprecht 1995). Os corpos cetônicos,

principalmente o β HB (Laeger et al 2010), tornam-se a principal fonte energética do SNC no que poderia ser denominado de lançadeira de corpos cetônicos astrócito-neurônio (Guzman & Blazquez 2001).

I. 4. Fator de necrose tumoral alfa

A citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é um mediador importante da inflamação, com ações voltadas para a destruição dos tecidos e recuperação dos danos causados. TNF- α é produzida por células do SNC como astrócitos, microglia e até neurônios quando expostos a estímulos fisiológicos e patológicos (Munoz-Fernandez & Fresno 1998). É ativada por receptores Toll-like e promove uma cascata de liberação de outras citocinas inflamatórias (IL-1 e IL-6) e quimiocinas (Beutler 1999; Munoz-Fernandez & Fresno 1998). Citocinas ativam o sistema imune inato e promovem a sobrevivência do organismo, são mediadores da comunicação bidirecional entre o SNC e o sistema imune (Wilson et al 2002). A expressão de TNF- α eleva-se em ambientes patológicos como injúrias, isquemia e infecções, estimulando em um primeiro momento uma resposta benéfica para o SNC. No entanto, durante uma crônica ativação, as citocinas podem cooperar para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (McCoy & Tansey 2008).

I.5. Fator neurotrófico de derivado do encéfalo

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é um fator de crescimento da grande família de neurotrofinas relacionadas a fatores de crescimento composta por exemplo pelo fator de crescimento de nervos (NGF), BDNF, neurotrofiina-4 (NT-4) e neurotrofina-3 (NT-3).

O BDNF é considerado a principal neurotrofina do SNC, sendo produzido pelos astrócitos e núcleos neuronais. A expressão de BDNF é alta nas regiões do hipocampo, neocórtex, amígdala e cerebelo (Kawamoto et al 1996). BDNF estimula a neurogênese e diferenciação neuronal, resultando no neurodesenvolvimento e na plasticidade neuronal ao modular os diversos tipos de sinapses, induzir a maturação, nutrição, crescimento, sobrevivência e integridade neuronal (Chao et al 2006).

BDNF é sintetizado *de novo* pelos neurônios e é liberado para o espaço extracelular tanto como BDNF maduro quanto como seu precursor, o pró-BDNF (Bergami et al 2008; Haydon & Carmignoto 2006). Sabe-se que a transdução do sinal de BDNF ocorre quando se liga ao seu receptor de tirosina relacionado a quinase (TRK B) é a inibição de rotas de apoptose, promovendo a sobrevivência de certos tipos de neurônios (Barde 1994; Binder & Scharfman 2004). Os astrócitos também são capazes de regular os níveis de BDNF, isto é, captam o precursor de BDNF, reciclam-o e liberam na forma madura na fenda sináptica, contribuindo para a regulação da plasticidade neuronal (Bergami et al 2008; Haydon & Carmignoto 2006).

Recente trabalho, demonstrou que BDNF também pode aumentar a expressão de MCT 2 no botão terminal na região do hipocampo, incrementando o suporte energético para atividade neuronal o que auxilia na formação do potencial de longa duração (LTP) e o processo de formação de memória (Robinet & Pellerin 2011).

Em estudo com fêmeas de camundongos tratadas com 2-desoxi-D-glucose (2-DG), indutor de cetogênese, a expressão de fatores de crescimento

neurotróficos, como BDNF e NGF aumentaram. Entretanto, não há trabalhos que relacionem a DC modulando a expressão de BDNF.

I. 6. Proteína S100B

A proteína S100B pertence à família de proteínas ligantes de cálcio (Ca^{++}), é uma proteína solúvel produzida e secretada predominantemente pelos astrócitos no cérebro (Donato 2001). Entretanto, sua expressão não é exclusiva de astrócitos, já sendo identificada nos oligodendrócitos em maturação e certas populações neuronais (Donato et al 2009).

A S100B no meio intracelular regula o metabolismo ao induzir a diferenciação, mitose e plasticidade do citoesqueleto (Donato 2001) e quando secretada para o meio extracelular exerce ação parácrina sobre neurônios e microglia e autócrina sobre os próprios astrócitos (Donato et al 2009; Ponath et al 2007), resultando em um efeito dual dependente da sua concentração. S100B quando varia entre níveis micromolares à nanomolares como um fator neurotrófico, promovendo o crescimento de neuritos, a modulação sináptica e a sobrevivência neuronal (Van Eldik & Wainwright 2003). A S100B pode promover efeitos tóxicos quando atinge concentrações mais elevadas, que variam entre micromolar a molar, levando à ativação da sinalização de injúria tecidual, resposta inflamatória e apoptose (Donato et al 2009; Goncalves et al 2008). Em condições onde ocorrem processos inflamatórios sua secreção é elevada, sinalizando a injúria do tecido e a astrogliose (de Souza et al 2009; Guerra et al 2011).

I. 7. Glutathione

Glutathione (GSH) é um tripeptídeo com grupamento tiol constituído por γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina. É o antioxidante não enzimático mais abundante no SNC, que protege a célula contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e promove detoxificação celular (Dringen 2000; Martin & Teismann 2009; Sukumari-Ramesh et al 2010). Devido à presença do resíduo de cisteína, GSH é um composto facilmente metabolizado na presença de metais de transição ou é responsável pela manutenção do estado redox da célula ao manter grupamentos sulfidril na forma reduzida nas proteínas (Dickinson & Forman 2002; Dringen 2000).

A glutathione geralmente está em equilíbrio na forma reduzida, GSH, e na forma oxidada, GSSG, podendo alterar os níveis de suas formas conforme o estado redox celular (Griffith 1999).

GSH é predominantemente sintetizada e secretada pelos astrócitos através da ação consecutiva de duas enzimas. Inicialmente, γ -glutamyl cisteína sintase (γ -GluCys sintase) condensa glutamato e cisteína em γ GluCys. Este dipeptídeo é condensado com glicina pela glutathione sintetase, formando glutathione em reações que consomem energia (ATP). GSH age diretamente sobre os radicais livres através de reação não-enzimática ou de forma indireta transferindo elétrons para o NADP através da glutathione redutase, formando NADPH que pode usado com cofator da ação da glutathione peroxidase, enzima que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Dickinson & Forman 2002).

GSH quando secretada é clivada pela γ -glutamyltranspeptidase no meio extracelular em cisteinilglicina. Este dipeptídeo é novamente clivado em

cisteína e glicina pela dipeptidase. Os aminoácidos liberados são captados pelos neurônios e são responsáveis pela ressíntese de glutathiona (Dringen, 2000; (Griffith 1999). Portanto, os astrócitos possuem um papel central na defesa antioxidante do SNC, pois ao captarem aminoácidos da corrente sanguínea, sintetizam GSH que quando secretada, será empregada para a defesa antioxidante dos neurônios (Martin & Teismann 2009).

Estudos com animais submetidos à DC demonstram que a dieta aumenta a proporção de GSH/GSSG na mitocôndria de hipocampo, contribuindo para ação da dieta na manutenção do estado redox da célula (Jarrett et al 2008).

I. 8. Proteína desacopladora mitocondrial (UCP2)

As proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) pertencem a família de transportadores de ânions presentes na membrana interna das mitocôndrias. São responsáveis pela dissipação da força próton motriz que é estabelecida pelo bombeamento ativo de prótons contra seu gradiente de concentração para o espaço intermembranoso quando os elétrons são transferidos pela cadeia fosforilativa oxidativa. A ativação de UCPs permite que os prótons voltem para a matriz mitocondrial, dissipando a energia, responsável pela ativação da ATP sintase, na forma de calor (Andrews et al 2005; Erlanson-Albertsson 2003).

A UCP 1 é a proteína desacopladora mais conhecida e estudada. Presente no tecido adiposo marrom é responsável pela liberação de calor e termogênese em certos animais. Outras proteínas desacopladoras vêm sendo identificadas e estudadas. A UCP 2 é expressa em diversos tecidos,

incluindo o SNC, enquanto que UCP 3 é expressa apenas no músculo esquelético e cardíaco. A UCP 4 e UCP 5 (BMCP 1) também foram identificados e são altamente expressas no SNC (Andrews et al 2005; Erlanson-Albertsson 2003; Kim-Han & Dugan 2005).

Diversas evidências demonstram que a UCP2 diminui a produção de EROs (Kim-Han & Dugan 2005; Korshunov et al 1998), protegendo a célula de danos oxidativos, promovendo um retardo no envelhecimento celular e atenuando injúrias neuronais (Andrews et al 2005; Bechmann et al 2002; Dietrich & Horvath 2010).

Em estudo de Sullivan (2004) em camundongos, a DC alterou a expressão de UCP 2, UCP 4 e UCP 5, sugerindo que os ácidos graxos da dieta alteram a atividade mitocondrial, podendo ser este um dos mecanismos de ação da DC para diminuir a produção de EROs.

II - OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar os efeitos da dieta cetogênica com diferentes composições de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) no metabolismo periférico e neuroglial de ratos *Wistar*.

Objetivos específicos

- padronizar dieta cetogênica enriquecida com PUFAs;
- investigar o metabolismo periférico através da análise dos níveis séricos de glicose, β -hidroxibutirato, colesterol, triglicerídeos (TG), HDL, uréia, ácido úrico, albumina, TNF- α e S100B;
- avaliar parâmetros da atividade anti-inflamatória na modulação do agente pró-inflamatório TNF- α do imunoconteúdo desta citocina no hipocampo e estriado;
- avaliar o imunoconteúdo de S100B no hipocampo e estriado;
- analisar a expressão de fatores tróficos, como o imunoconteúdo BDNF no hipocampo estriado;
- investigar o estado *redox* da célula no hipocampo e estriado através do conteúdo de GSH e a expressão mitocondrial de UCP2;
- investigar a composição do líquido cefalorraquidiano quanto a S100B, TNF- α e β -hidroxibutirato.

PARTE II

CAPÍTULO 1

BRAIN CHANGES IN BDNF AND S100B INDUCED BY KETOGENIC DIETS IN WISTAR RATS

Artigo submetido no periódico British Journal of Nutrition

Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats

Adriana Fernanda Vizuete¹, Daniela Fraga de Souza¹, Maria Cristina Guerra¹, Cristiane Batassini¹, Márcio Ferreira Dutra¹, Caren Bernardi², Ana Paula Costa¹, Carlos-Alberto Gonçalves^{1,2}

Programas de Pós-Graduação em Bioquímica¹ e Neurociências², Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

* Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Fax: 55-51-3308 5535

E-mail: casg@ufrgs.br

Introduction

The ketogenic diets (KD) are diets that are high in fat, and have low levels or no carbohydrate and low or normal levels of protein (Freeman et al, 2006; Hartman et al, 2007). This diet induces an increase in ketone bodies that are available to the central nervous system (CNS) (Baranano & Hartman 2008). Ketone bodies, mainly beta-hydroxy-butyrate, can cross the blood brain barrier (BBB) through transporters of monocarboxylic acids (MCT), mainly via MCT1, present in the endothelial cells of the BBB. In the CNS, ketone bodies are taken up and catabolized by both neurons and astrocytes via MCT2 and MCT4, respectively (Hartman et al 2007; Pierre & Pellerin 2005).

It has been proposed that ketone bodies partially replace glucose consumption as a fuel to maintain neuronal activity (Melo et al 2006), but it is not clear whether these compounds are directly involved in the beneficial effects of this diet on the CNS. In addition to ketone bodies, the content and proportion of polyunsaturated fatty acids has been suggested to be a mediator of the effects of KD on brain disorders (Borges 2008; Cunnane 2004).

KD were originally proposed for epileptic disorders (Baranano & Hartman 2008) and have a wide use today for treating brain disorders including Parkinson's disease (Vanitallie et al 2005), Alzheimer's disease (Henderson 2008; Van der Auwera et al 2005), amyotrophic lateral sclerosis, depression (Zhao et al 2006) brain ischemia (Tai & Truong 2007)), bipolar disease (El-Mallakh & Paskitti 2001) and autism (Evangelidou et al 2003)

The neuroprotective mechanisms that are induced by the KD are unknown. However, some current hypotheses suggest changes in the mitochondrial and antioxidant activities (Maalouf et al 2009) In support of this, KD fed rats exhibit

increased UCP expression and activity (Sullivan et al 2004), as well as increased glutathione content (Jarret *et al*, 2008) and glutathione peroxidase activity (Ziegler et al 2003) in the hippocampus. It is important to mention that mitochondrial and antioxidant changes are also observed under caloric restriction, which has a neuroprotective effect on several brain diseases (Maalouf et al 2009). The activity of caloric restriction has been attributed to changes in the balance and expression of inflammatory (e.g. TNF- α) and neurotrophic (e.g. neurotrophins) factors. With regard to KD feeding, some reports suggest changes in inflammatory parameters (Adibhatla & Hatcher 2008; Jeong et al 2011; Ruskin et al 2009).

In this study, we investigated the effects of KD on levels of TNF- α (a classical pro-inflammatory cytokine) and BDNF (an important neurotrophin associated with synaptic plasticity), as well as S100B, an astrocyte protein involved in metabolism regulation, which is secreted in inflammatory conditions (de Souza et al 2009; Guerra et al 2011) and has a trophic extracellular role (Donato et al 2009; Goncalves et al 2008). Wistar rats were fed during 8 weeks with two KD, containing different proportions of ω 6 and ω 3 polyunsaturated fatty acids, and two brain regions of the hippocampus and striatum were analyzed, as well as blood serum and cerebrospinal fluid.

Experimental methods

Animals and diet

Male Wistar rats (30 days old) were obtained from our breeding colony (in the Department of Biochemistry, UFRGS) and maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$). Animals were divided into three groups of twenty animals with the respective diets: control (C), standard ketogenic diet (s-KD) prepared as described previously (Ziegler et al 2002) and enriched omega-3 ketogenic diet (ω 3-KD). Chow composition

is detailed in Table 1. All animals were fed *ad libitum* and had free access to water for 8 weeks. Procedures were in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) following the regulations of the local animal house authorities.

During treatment, the rats were weighed weekly and observed for behavior and coat to check if the diet was contributing to malnutrition and protein loss.

Analysis of serum

Rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75mg/Kg) and xylazine (10mg/Kg) and blood was collected by cardiac puncture; serum was obtained by centrifuging at 1000 X g for 10 min (Eppendorf 5402, Hamburg, Germany) before storing for 24 h at 8 °C until the biochemical measurement of glucose, β -hydroxybutyrate, cholesterol, triacylglycerol, HDL cholesterol, urea, uric acid, albumin and total protein.

Biochemical analyses were carried out with colorimetric kits by Human Brazil, using specific tests: glucose (GPO-PAP method, Ref 10261) total protein (biuret method, Ref 013), albumin (bromocresol method, Ref 001), urea (enzymatic colorimetric test, Ref 10505), uric acid (enzymatic colorimetric test, Ref 10687), triglycerides (triglycerides liquicolor test, Ref 10726), cholesterol (enzymatic colorimetric test, Ref 10013) and HDL cholesterol (cholesterol precipitation and enzymatic colorimetric, Ref 004). Serum β -hydroxybutyrate was determined using the enzymatic colorimetric test by Ranbut (Ref RB1007).

Brain tissue and CSF samples

Anaesthetized rats were positioned in a stereotaxic apparatus to extract cerebrospinal fluid (CSF) from the cisterna magna. CSF samples were frozen (-80°C) until further analysis. After decapitation, the brain was dissected and the hippocampus

and striatum dissected on ice. The structures were cut into 0.3 mm slices with a McIlwain chopper and frozen (-80 °C).

Quantification of S100B

Slices were homogenized in PBS (50mM NaCl, 18mM Na₂HPO₄, 83mM NaH₂PO₄.H₂O, pH 7.4), containing 1 mM EGTA and 1 mM phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF). The S100B content in the CSF and brain tissue was measured by ELISA, as described previously (Leite et al 2008). Briefly, 50 µl of sample plus 50 µl of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate that was previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 10 ng/ml.

Quantification of TNF-alpha

Slices were homogenized in PBS, pH 7.4, containing 1 mM EGTA and 1 mM PMSF and centrifuged at 1000 X g for 5 min at 4°C. The TNF α content in the soluble fraction was measured by ELISA (eBioscience, Ref. 88-7340).

Quantification of BDNF

For BDNF measurement slices were homogenized in lysis buffer: 100mM Tris/HCl, pH 7.0, 2% bovine serum albumin (BSA), 1M NaCl, 4 mM EDTA.Na₂, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide and protease inhibitors (from Sigma) containing 5 µg/mL aprotinin, 0.5µg/mL antipain, 157 µg/mL benzamidine, 0.1µg/mL pepstatin A and 17 µg/mL PMSF. Hippocampal and striatal homogenates were centrifuged at 14 000 X g for 30 min at 4°C and soluble samples were used for BDNF ELISA (Millipore, Ref. CYT306).

Quantification of protein

Protein was measured by Lowry's method, modified by Peterson, using bovine serum albumin as a standard (Peterson 1977).

Statistical Analysis

Data from the experiments are presented as mean \pm standard error mean and analyzed statistically by two-way and one-way analysis of variance followed by the Tukeys' test. ANOVA of repeated measurements was used to compare the growth of rats during treatments.

Results

Body weight and biochemical serum parameters

Young rats were fed on ketogenic diets or the control diet for 8 weeks. During the first two weeks they gained weight at the same rate. However, from the second week on, rats fed on the ketogenic diet had a lower weight gain (Fig 1), independently of whether the diet was enriched in ω -3 fat acids or not. No significant change was observed between the groups for the total serum protein and albumin content at the end of treatment (Table 2). Lipidemia (based on total cholesterol and triglycerides) and glycemia were also not different between the groups. The increase in ketonemia (evaluated by measuring serum β -hydroxybutyrate) was confirmed in both ketogenic groups. We found a small decrease in serum urea in ketogenic rats (about 20%) that was significant only in rats fed on a standard ketogenic diet.

Hippocampal and striatal contents of TNF α

The immunocontent of TNF α , a pro-inflammatory cytokine, was similar in the two brain regions studied: hippocampus and striatum (Fig 2), as well as in the cerebrospinal fluid and blood serum (data not shown).

Hippocampal and striatal contents of BDNF

The hippocampal content of BDNF, an important neurotrophin, was similar among the groups (Fig 3). However, the striatal content was significantly lower in ketogenic rats, independently of whether the diet was enriched in ω -3 fat acids or not.

Hippocampal and striatal contents of S100B

No changes in the content of S100B, an astroglial protein marker, were observed in the hippocampus or striatum, when comparing them with their respective controls (Fig 4). The content of striatal S100B was different for rats fed on the standard ketogenic diet and enriched in ω -3 ketogenic diet.

Cerebrospinal fluid and serum contents of S100B

The immunocontent of S100B in the cerebrospinal fluid was significantly lower in ketogenic rats, whether fed on the standard or ω 3 enriched ketogenic diet (Fig 5B). No significant changes were observed in serum S100B among the groups (Fig 5A).

Discussion

KD have been proposed as a neuroprotective approach for several brain disorders, particularly epilepsies, but also in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and psychiatric disorders such as depression and bipolar disease (El-Mallakh & Paskitti 2001; Evangelidou et al 2003; Henderson 2008; Tai et al 2008; Van der Auwera et al 2005; Vanitallie et al 2005; Zhao et al 2006). However, our knowledge about the effects on brain is limited and neuroprotective mechanisms remain elusive. The production KB *per se* does not explain all the changes observed (Freeman et al 2006; Hartman et al 2007) and some studies have suggested that the availability of polyunsaturated fatty acids, derived from the KD, may underly, in part, such changes (Borges 2008; Cunnane 2004). The changes induced by KD could affect brain levels of neurotrophins and cytokines. In order to investigate this hypothesis we measured the brain contents of

BDNF, TNF-alpha and S100B, in rats treated with two different KD that contained different proportions of ω 3 and ω 6 fatty acids.

It is important to mention that our KD treatment reproduced changes previously observed in weight body development (Ziegler et al 2002). In fact, KD induced a lower body weight gain from the second week onwards and this change did not differ between the two types of KD. No significant changes were observed in biochemical serum parameters such as glycemia, proteinemia and lipidemia. The increment in ketonemia was evident in the KD rats. Interestingly, a reduced content of serum urea was observed in s-KD treated rats confirming previous results (Ziegler et al 2002), but this decrease was not significant in ω 3-KD rats.

BDNF is widely expressed in the rodent brain, and is especially abundant in the hippocampus, cerebral cortex, cerebellum, striatum and the amygdale (Kawamoto et al 1996), where it modulates synaptic transmission, plasticity and survival of different types of neurons (Noble et al 2011). Our study confirmed that BDNF immunocontent in the hippocampus is higher than in the striatum in Wistar rats. No changes in BDNF content were induced by KD in the hippocampus, but unexpectedly a decrease in BDNF was observed in the striatum. Several studies have suggested that peripheral metabolic changes could alter the expression and release of brain BDNF. For example, physical exercise induced an up-regulation of the BDNF in the hippocampus and might therefore play an important role in the enhancement of cognitive functions in rodent models and in mood in humans (Zoladz & Pilc 2010). Caloric restriction also increases BDNF levels in brain structures, such as the hippocampus, cerebral cortex, and striatum of rats (Duan et al 2001). All these studies have suggested a neuroprotective role of BDNF, including in dopaminergic neurons (Peng et al 2011). Therefore, current data suggest that KD may not be beneficial for striatum cells. The apparently harmful effect of KD in

specific brain regions has been also reported. For example, oxidative stress is reduced by KD in the hippocampus, but is exacerbated in the cerebellum (Ziegler et al 2003); morphological changes induced by KD were apparently beneficial in the CA1 region of the hippocampus, but not in the dentate gyrus (Baliatti et al 2008). However, we investigated only the basal effect of KD and further studies should focus on investigating the effects of KD in the striatum and hippocampus under conditions of injury, such as epilepsy or Parkinson's disease models.

Moreover, we did not observe any changes in TNF- α content in the hippocampus and striatum. TNF- α is a pro-inflammatory cytokine that is mainly up-regulated and released by glial cells in brain, particularly under conditions of injury (McCoy & Tansey 2008; Nishioku et al 2010; Wilson et al 2002) and chronic elevations of this cytokine are observed in neurodegenerative diseases (Eskandari et al 2003; Krause & Muller 2010; McCoy & Tansey 2008; Stoll & Jander 1999). Cytokines work as bidirectional signals of communication between CNS and the peripheral immune system (Wilson et al 2002). It has been demonstrated that metabolic modifications alter the expression and release of cytokines. For example, a high cholesterol diet enhances the expression of pro-inflammatory cytokines in rats (Lewis et al, 2010) and caloric restriction in aging rodents models down regulate the expression of inflammatory cytokines (Wilson et al 2002). Moreover, KD reduced the levels of the proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) and promoted the survival of dopaminergic neurons in a mice model of Parkinson's disease with MPTP (Yang & Cheng 2010). Under the conditions of this study, KD did not change basal levels of TNF- α .

S100B is a calcium-binding protein mainly expressed and secreted by astrocyte cells in the central nervous system. In the cell, it can regulate glucose metabolism, the cytoskeleton and proliferation (Donato et al 2009). Extracellular S100B plays a trophic

role in neuron and glial cell cultures and acute elevation of this protein in cerebrospinal fluid has been observed in injury conditions (Goncalves et al 2008). This protein is secreted in vitro and in vivo in response to inflammatory signals, such as interleukin 1 β and LPS (de Souza et al 2009; Guerra et al 2011).

We did not find any changes in S100B content in the hippocampus and striatum induced by KD, when compared with control rats. However, a direct comparison between s-KD and ω 3-KD suggests a difference in the expression of this protein. The functional meaning of this finding is unclear, but it is possible to conceive that PUFA modulate the expression of S100B, particularly in the striatum. Arundic acid has been shown to be able to inhibit the expression of S100B, but the transcriptional mechanism involved is unknown (Asano et al 2005).

On the other hand, the S100B content decreases in CSF after KD feeding. We previously reported this effect (Ziegler et al 2004) and suggested that it could be mediated by elevated levels of KB, as reported in astrocyte cultures (Leite et al 2004). This could be triggered by and/or be indicative of changes in fuel metabolism, i.e. a decrease in glucose utilization. In fact, in rats submitted to the intracerebroventricular administration of streptozotocin (Rodrigues et al 2009) or chronic cerebral hypoperfusion (Vicente et al 2009), two conditions associated with the decrease in glucose consumption, a decrease in cerebrospinal fluid S100B has been reported. This decrease, alone, could be interpreted as an extracellular neurotrophic decrease and therefore, as a “bad” signal. However, elevated levels of S100B in cultures are potentially harmful because they induce cell death and, in some conditions, extracellular S100B reduction could be conceived as a “good” signal. Notice that serum S100B did not change during the KD, suggesting that adipose release of S100B was not affected by this diet. This finding is interesting, because adipose tissue is an important source of

serum S100B (Goncalves et al 2010) and considerably increases during KD (Ribeiro et al 2008). These apparent independent actions of the brain and adipose tissue were also observed during fasting (Netto et al 2006) and LPS stimulation (Guerra *et al.*, 2011).

In summary, our data suggest that a KD for 8 weeks was able to reduce the levels of two putatively-neurotrophic molecules; BDNF in the striatum and S100B in the cerebrospinal fluid of rats. These alterations were not affected by the proportion of PUFA of the KD offered. No changes were observed in the content of BDNF in the hippocampus, neither in the content of TNF α in the hippocampus or in the striatum. No changes in serum S100B were observed. These findings reinforce the importance of this diet as an inductor of alterations in the brain, and might contribute to the understanding of the neuroprotective activity (or side effects) of KD in brain disorders.

Acknowledgements

Specific contributions in this work: Conception and Design of the Study (AFV, CAG); Generation Assembly and/or Interpretation of Data (AFV, DFS, MCG, CB, MFD,CB and APC); Drafting of the Manuscript (AFV and CAG). This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP (IBN 01.06.0842-00) and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

Figure legends

Figure 1: Evolution of body weight in rats fed control chow (circle), standard ketogenic diet (s-KD) (square) or enriched omega-3 ketogenic diet (ω 3-KD) (triangle symbol) for 8 weeks. Values are mean \pm S.E.M. of 17–19 rats. All groups gained body weight during the different diets (Repeated measures ANOVA). *Significantly different rate of growth between control and KD rats from the second week onwards (One-way ANOVA followed by Tukey's Test, $p < 0.01$).

Figure 2: Immunocontent of TNF-alpha in hippocampus and striatum. Rats were fed with control, standard ketogenic (s-KD) and ketogenic with increased omega-3 (ω 3-KD) diets for 8 weeks. TNF- α was measured by ELISA. Values are mean \pm S.E.M. of 10 rats (One-way ANOVA, $p < 0.05$).

Figure 3: Immunocontent of BDNF in the hippocampus and striatum. Rats were fed with control, standard ketogenic (s-KD) and ketogenic with increased omega-3 (ω 3-KD) diets for 8 weeks. BDNF was measured by ELISA. Values are mean \pm S.E.M. of 10 rats. * Significantly decreased expression of BDNF in the striatum of KD rats. (One-way ANOVA followed by Tukey's Test, $p < 0.05$).

Figure 4: Immunocontent of S100B in hippocampus and striatum. Rats were fed with control, standard ketogenic (s-KD) and ketogenic with increased omega-3 (ω 3-KD) diets for 8 weeks. S100B was measured by ELISA. Values are mean \pm S.E.M. of 10 rats. The levels of S100B in hippocampus were the same for the different treatments (One-way ANOVA, $p < 0.05$). *Significant differences in the levels of S100B in the striatum of rats treated with different KD (One-way ANOVA followed by Tukey's Test $p < 0.05$).

Figure 5: S100B levels of serum (A) and cerebrospinal fluid (B) of rats treated with control, standard ketogenic (s-KD) and ketogenic with increase omega-3 (ω 3-KD) diets. Values are mean \pm S.E.M. of 10 rats.* Significantly decrease level of S100B in CSF from KD fed rats. (One-way ANOVA followed by Tukey's Test, $p < 0.05$).

References

- Adibhatla RM & Hatcher JF (2008) Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem* 49, 241-268.
- Asano T, Mori T, Shimoda T, Shinagawa R, Satoh S, Yada N, Katsumata S, Matsuda S, Kagamiishi Y & Tateishi N (2005) Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 127-142.
- Baliotti M, Giorgetti B, Fattoretti P, Grossi Y, Di Stefano G, Casoli T, Platano D, Solazzi M, Orlando F, Aicardi G & Bertoni-Freddari C (2008) Ketogenic diets cause opposing changes in synaptic morphology in CA1 hippocampus and dentate gyrus of late-adult rats. *Rejuvenation Res* 11, 631-640.
- Baranano KW & Hartman AL (2008) The ketogenic diet: uses in epilepsy and other neurologic illnesses. *Curr Treat Options Neurol* 10, 410-419.
- Borges K (2008) Mouse models: the ketogenic diet and polyunsaturated fatty acids. *Epilepsia* 49 Suppl 8, 64-66.
- Cunnane SC (2004) Metabolism of polyunsaturated fatty acids and ketogenesis: an emerging connection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 237-241.
- de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, Gottfried C, Leal RB & Goncalves CA (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* 206, 52-57.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C & Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1008-1022.
- Duan W, Lee J, Guo Z & Mattson MP (2001) Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J Mol Neurosci* 16, 1-12.
- El-Mallakh RS & Paskitti ME (2001) The ketogenic diet may have mood-stabilizing properties. *Med Hypotheses* 57, 724-726.
- Eskandari F, Webster JI & Sternberg EM (2003) Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 5, 251-265.
- Evangelidou A, Vlachonikolis I, Mihailidou H, Spilioti M, Skarpalezou A, Makaronas N, Prokopiou A, Christodoulou P, Liapi-Adamidou G, Helidonis E, Sbyrakis S & Smeitink J (2003) Application of a ketogenic diet in children with autistic behavior: pilot study. *J Child Neurol* 18, 113-118.
- Freeman JM, Kossoff EH & Hartman AL (2007) The ketogenic diet: one decade later. *Pediatrics* 119, 535-543.
- Goncalves CA, Leite MC & Guerra MC (2010) Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2010, 790431.
- Goncalves CA, Leite MC & Nardin P (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* 41, 755-763.
- Guerra MC, Tortorelli LS, Galland F, Da Re C, Negri E, Engelke DS, Rodrigues L, Leite MC & Goncalves CA (2011) Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation* 8, 128.
- Hartman AL, Gasior M, Vining EP & Rogawski MA (2007) The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 36, 281-292.

- Henderson ST (2008) Ketone bodies as a therapeutic for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5, 470-480.
- Jeong EA, Jeon BT, Shin HJ, Kim N, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Choi WS & Roh GS (2011) Ketogenic diet-induced peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation decreases neuroinflammation in the mouse hippocampus after kainic acid-induced seizures. *Exp Neurol* 232, 195-202.
- Kawamoto Y, Nakamura S, Nakano S, Oka N, Akiguchi I & Kimura J (1996) Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* 74, 1209-1226.
- Krause DL & Muller N (2010) Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010.
- Leite M, Frizzo JK, Nardin P, de Almeida LM, Tramontina F, Gottfried C & Goncalves CA (2004) Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull* 64, 139-143.
- Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C & Goncalves CA (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169, 93-99.
- Maalouf M, Rho JM & Mattson MP (2009) The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res Rev* 59, 293-315.
- McCoy MK & Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5, 45.
- Melo TM, Nehlig A & Sonnewald U (2006) Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochem Int* 48, 498-507.
- Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, Vidal P, Benfato MS, Giugliani R & Goncalves CA (2006) Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res* 37, 683-686.
- Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, Shuto H, Yamauchi A & Kataoka Y (2010) Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 112, 251-254.
- Noble EE, Billington CJ, Kotz CM & Wang C (2011) The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300, R1053-1069.
- Peng C, Aron L, Klein R, Li M, Wurst W, Prakash N & Le W (2011) Pitx3 is a critical mediator of GDNF-induced BDNF expression in nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 31, 12802-12815.
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-356.
- Pierre K & Pellerin L (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 94, 1-14.
- Ribeiro LC, Chitto AL, Muller AP, Rocha JK, Castro da Silva M, Quincozes-Santos A, Nardin P, Rotta LN, Ziegler DR, Goncalves CA, Da Silva RS, Perry ML & Gottfried C (2008) Ketogenic diet-fed rats have increased fat mass and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. *Mol Nutr Food Res* 52, 1365-1371.

- Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, Quilfeldt JA, Achaval M & Goncalves CA (2009) Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis* 17, 193-202.
- Ruskin DN, Kawamura M & Masino SA (2009) Reduced pain and inflammation in juvenile and adult rats fed a ketogenic diet. *PLoS One* 4, e8349.
- Stoll G & Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58, 233-247.
- Sullivan PG, Rippey NA, Dorenbos K, Concepcion RC, Agarwal AK & Rho JM (2004) The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. *Ann Neurol* 55, 576-580.
- Tai KK & Truong DD (2007) Ketogenic diet prevents seizure and reduces myoclonic jerks in rats with cardiac arrest-induced cerebral hypoxia. *Neurosci Lett* 425, 34-38.
- Van der Auwera I, Wera S, Van Leuven F & Henderson ST (2005) A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Metab (Lond)* 2, 28.
- Vanitallie TB, Nonas C, Di Rocco A, Boyar K, Hyams K & Heymsfield SB (2005) Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: a feasibility study. *Neurology* 64, 728-730.
- Vicente E, Degerone D, Bohn L, Scornavaca F, Pimentel A, Leite MC, Swarowsky A, Rodrigues L, Nardin P, de Almeida LM, Gottfried C, Souza DO, Netto CA & Goncalves CA (2009) Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* 1251, 204-212.
- Wilson CJ, Finch CE & Cohen HJ (2002) Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc* 50, 2041-2056.
- Yang X & Cheng B (2010) Neuroprotective and anti-inflammatory activities of ketogenic diet on MPTP-induced neurotoxicity. *J Mol Neurosci* 42, 145-153.
- Zhao Z, Lange DJ, Voustantiokouk A, MacGrogan D, Ho L, Suh J, Humala N, Thiyagarajan M, Wang J & Pasinetti GM (2006) A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci* 7, 29.
- Ziegler DR, Araujo E, Rotta LN, Perry ML & Goncalves CA (2002) A ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. *J Nutr* 132, 483-487.
- Ziegler DR, Oliveira DL, Pires C, Ribeiro L, Leite M, Mendez A, Goncalves D, Tramontina F, Portela LV, Wofchuk ST, Perry ML & Goncalves CA (2004) Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res* 50, 375-379.
- Ziegler DR, Ribeiro LC, Hagen M, Siqueira IR, Araujo E, Torres IL, Gottfried C, Netto CA & Goncalves CA (2003) Ketogenic diet increases glutathione peroxidase activity in rat hippocampus. *Neurochem Res* 28, 1793-1797.
- Zoladz JA & Pilc A (2010) The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. *J Physiol Pharmacol* 61, 533-541.

Table 1: *Composition of the control, standard ketogenic (s-KD) and ketogenic with increase omega-3 (w3-KD) diets*

	Control (g/100g)	s-KD (g/100g)	w3-KD (g/100g)
Ash ^a	4	4	4
Vitamin ^b	1	1	1
Fiber	1	1	1
Protein ^c	33,5	33,5	33,5
DL- methionine ^d	0,3	0,3	0,3
Carbohydrates	55,2	-----	-----
Soybean oil	0,5	0,5	0,5
Fish oil ^e	-----	-----	1,0
Lard	4,5	59,7	58,7
Rate w6/w3	11:1	10:1	5:1

^a Mineral salt mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100 g of diet:

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.

^b Vitamin mixture: mg/100 g of diet (from Roche, São Paulo, Brazil): Vitamin A, 4; Vitamin D, 0.5; Vitamin E, 10; menadione, 0.5; choline, 200; PABA 10; inositol 10; niacin,4; pantothenic acid, 4; riboflavin, 0.8; thiamin, 0.5; pyridoxine, 0.5; folic acid, 0.2; biotin, 0.04; Vitamin B12, 0.003.

^cSoyprotein Isolate, purity 97% (from Solae, Esteio, Brazil)

^d D-L-Methionin (from Merk, Rio de Janeiro, Brazil).

^eFishoil: DocosahexaenoicAcid (DHA) 5 : 1 Eicosapentaenoic Acid (EPA) (Naturalis SA, Porto Alegre, Brazil.)

Table 2: Serum biochemistry of rats fed control and ketogenic diets for 8 weeks¹.

	Control	s-KD	w3-KD
		<i>(mg/dL)</i>	
Protein	1,76 ± 0,17	1,76 ± 0,18	1,74 ± 0,20
HDL	1,08 ± 0,06	0,93 ± 0,03	0,74 ± 0,07
		<i>(g/dL)</i>	
Albumin	2,44 ± 0,06	2,47 ± 0,06	2,51 ± 0,08
		<i>(mmol/L)</i>	
Glucose	7,0 ± 0,66	7,89 ± 0,40	8,18 ± 0,59
Triglycerides	0,24 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,26 ± 0,03
Cholesterol	1,28 ± 0,05	1,14 ± 0,04	1,08 ± 0,10
β-Hydroxybutyrate	0,14 ± 0,01	0,25 ± 0,04 *	0,29 ± 0,04 *
Urea	4,84 ± 0,18	3,94 ± 0,29 *	4,08 ± 0,23
Uricacid	0,35 ± 0,04	0,34 ± 0,04	0,28 ± 0,02

¹ Values are means ± S.E.M, *n*=10.

* Statistically significant from control by one-way ANOVA (*p* < 0.05).

Figure 1

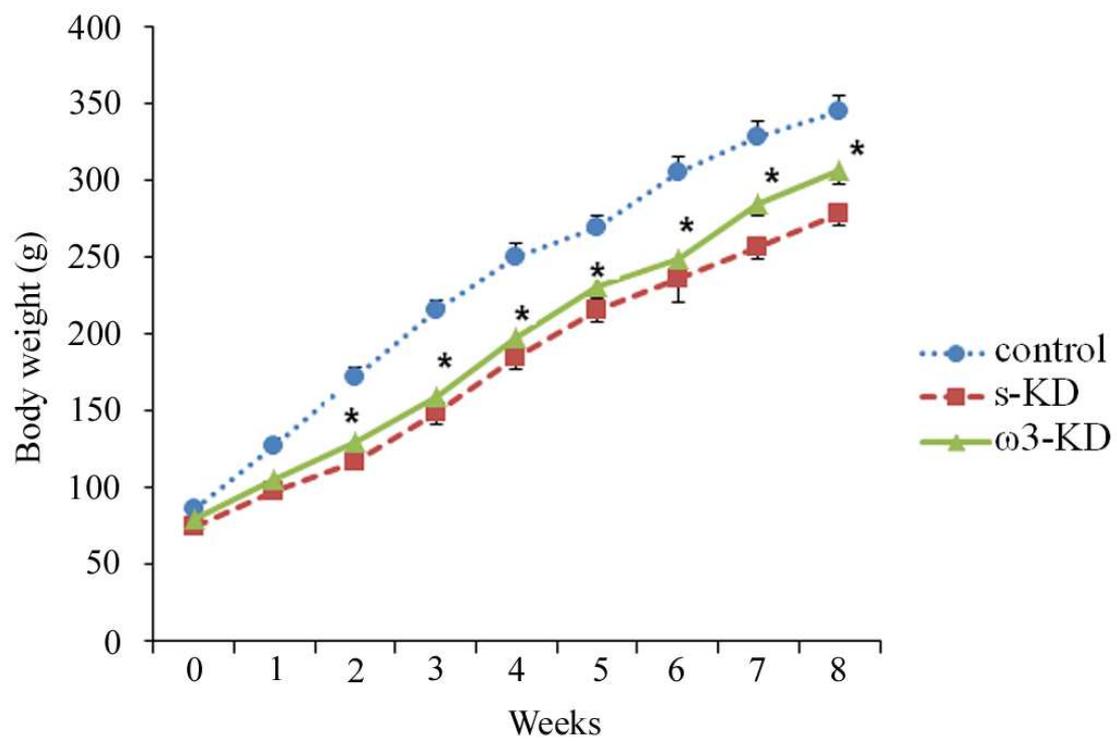


Figure 2

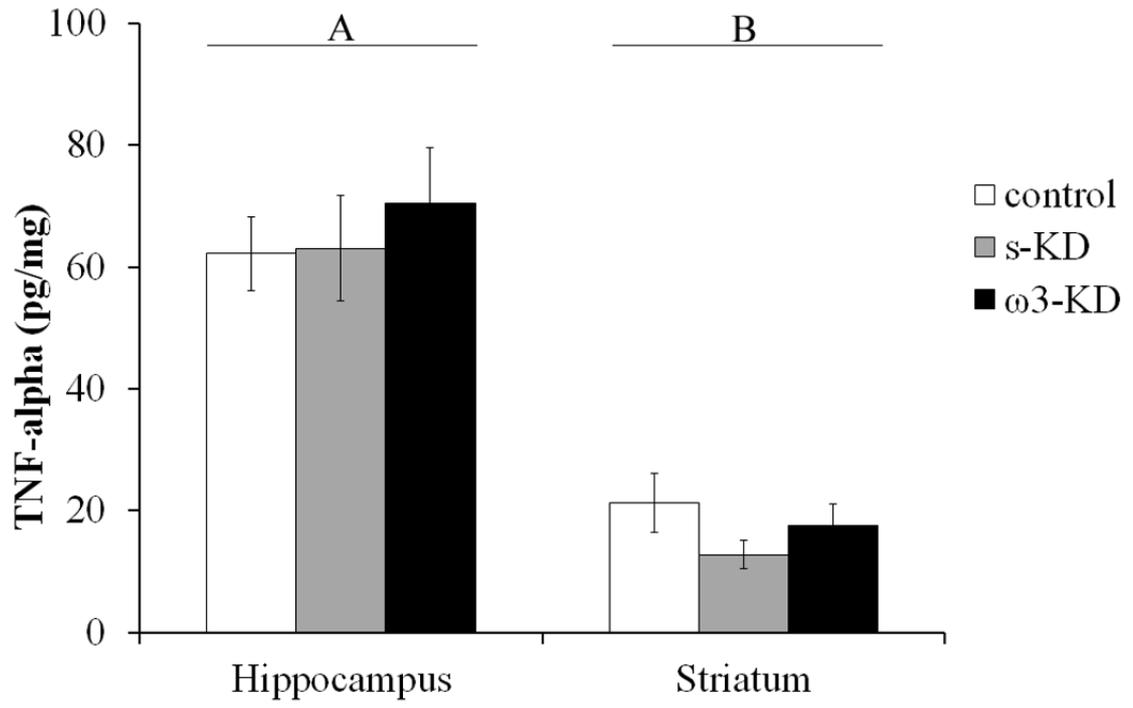


Figure 3

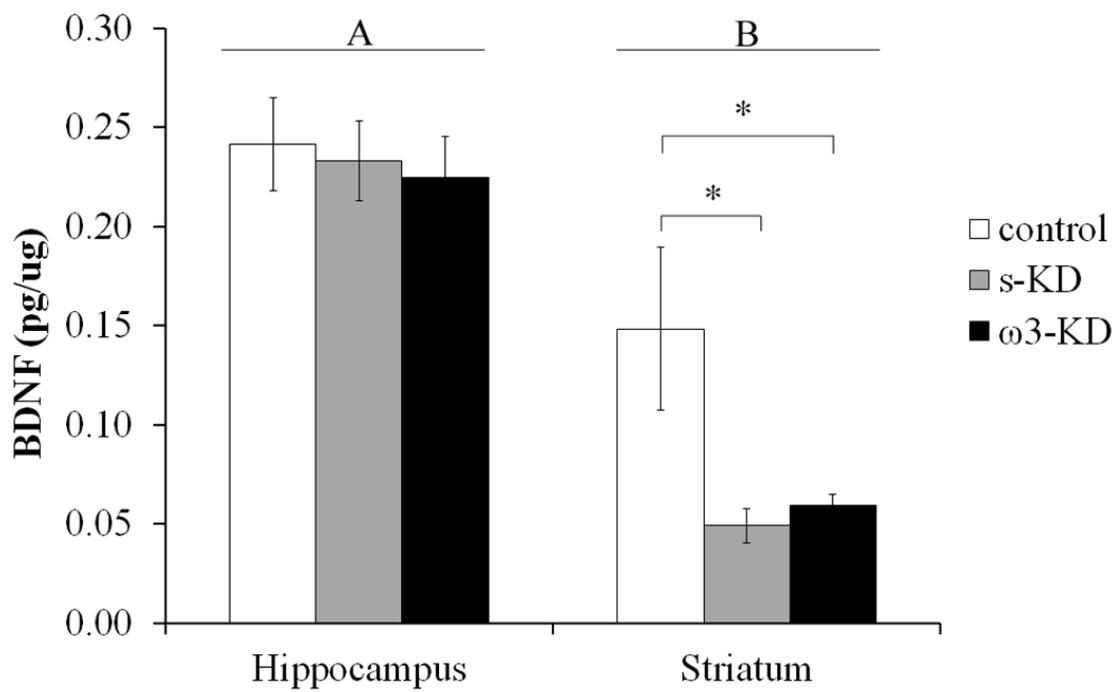


Figure 4

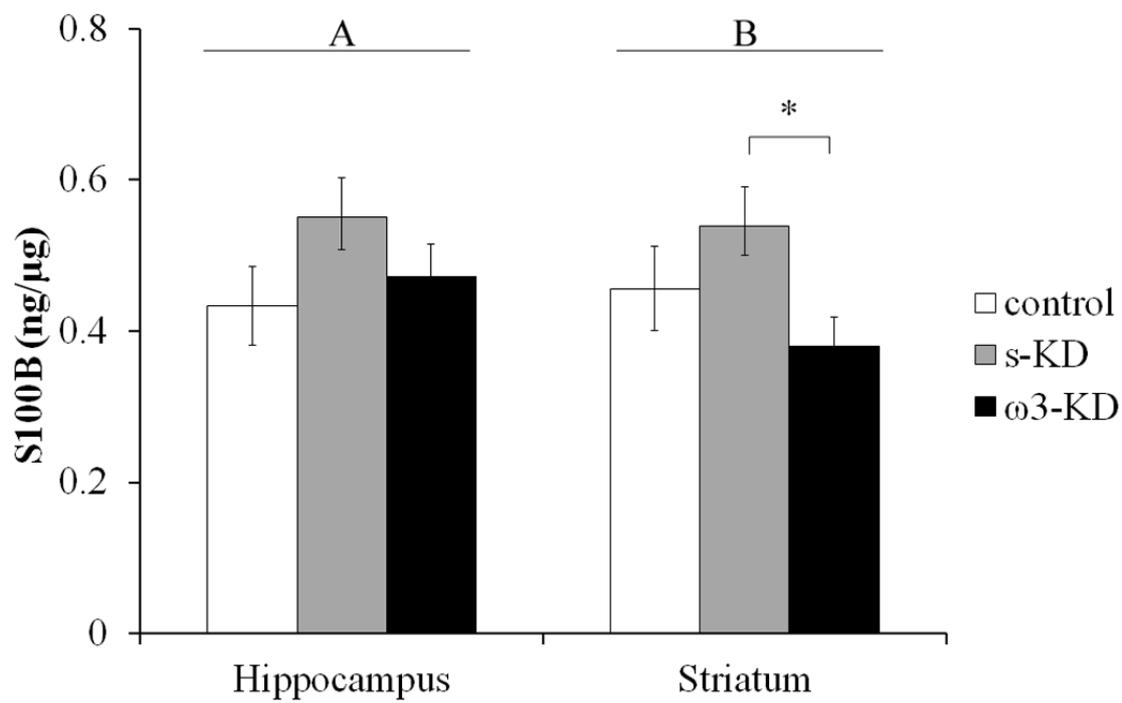
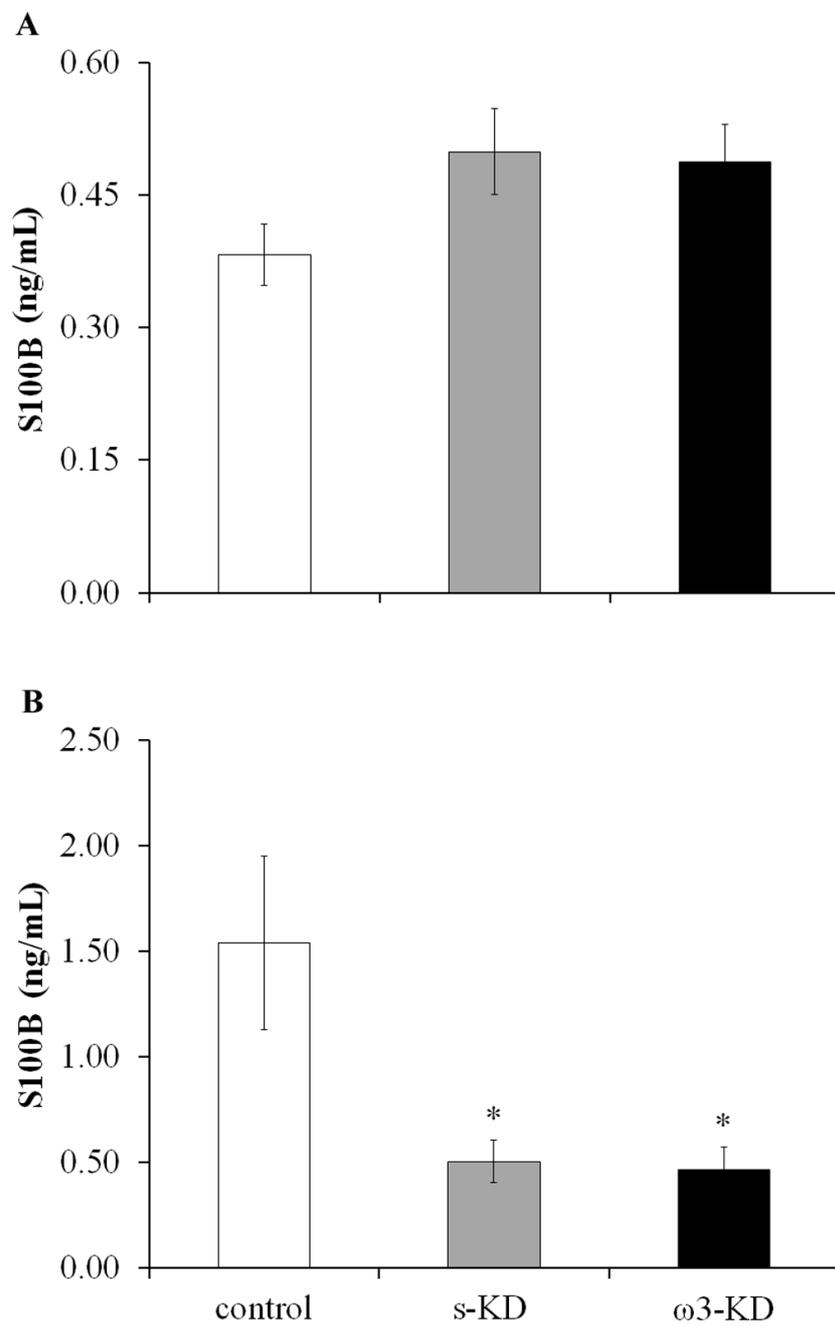


Figure 5



PARTE III

III. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a dieta cetogênica a partir da segunda semana diminui a velocidade de crescimento do animal quando comparada com animais que consumiram dieta balanceada. Entretanto, deve-se ressaltar que os animais não apresentaram desnutrição nem deixaram de ganhar massa corporal ao longo das oito semanas de tratamento. Os animais tratados com as diferentes dietas cetogênicas apresentaram a mesma taxa de crescimento. É importante mencionar que o nosso tratamento DC reproduz alterações previamente observadas no desenvolvimento do peso corporal (Baranano & Hartman 2008; Kim do & Rho 2008; Ziegler et al 2002).

Através da análise bioquímica do soro, podemos observar que os níveis de albumina, proteína total, triglicerídeos, ácido úrico e glicose não se alteraram nos diferentes tratamentos. A quantidade de uréia na dieta cetogênica clássica (s-DC) diminuiu em relação aos outros grupos. Sabe-se que a glicemia dos ratos submetidos à dieta cetogênica sem nenhuma fonte de carboidrato pode ser controlada pelas reações de gliconeogênese e que a DC não provoca degradação de proteínas (Hartman et al 2007; Westman et al 2003). Em nosso trabalho demonstramos que os níveis séricos de proteína total e albumina não possuem diferença entre os grupos, sendo que inclusive nos indivíduos tratados com s-DC houve redução da concentração de uréia sérica.

Em relação à HDL e colesterol, houve uma tendência à diminuição nos níveis séricos tanto da lipoproteína quanto do colesterol em ambas DCs, sendo que a maior redução ocorreu nos animais tratados pela DC enriquecida com w3

(ω 3-DC). Quanto à quantidade de β -hidroxibutirato, ambas as dietas cetogênicas apresentaram maiores níveis.

Interessantemente, observou-se que todos os animais tratados com ambos tipos de DCs tornaram-se cetogênicos, isto é, houve aumento significativo dos níveis de β -hidroxibutirato no soro, corpo cetônico que pode ser usado pelo SNC como combustível energético a fim de manter a atividade neuronal (Melo et al 2006).

Portanto, não foram observadas alterações significativas em parâmetros bioquímicos séricos, como proteinemia, glicemia e lipidemia, ocorrendo um aumento da cetonemia em ratos DC. Curiosamente, uma redução do nível de uréia foi observado apenas em ratos s-DC confirmando resultados anteriores (Ziegler et al 2002), mas esta diminuição não foi significativa em ω 3-DC.

Acredita-se que o acréscimo de ômega-3 na alimentação promova uma qualidade cardiovascular, diminuindo a agregação plaquetária e por consequência a formação de placas ateroscleróticas dos indivíduos (Cunnane et al 2009), melhorando o perfil lipídico sérico. Entretanto, no nosso trabalho, através da análise bioquímica sérica, não podemos visualizar esta alteração em relação à s-DC e ω 3-DC.

Nós também mensuramos os níveis de β -hidroxibutirato no líquido cefalorraquidiano (LCR) (figura 1, em anexos) e observamos que em ambas as dietas DCs os níveis do CC estão reduzidos. Sabe-se que os CCs conseguem atravessar a BHE devido à presença de MCT 1 nas células endoteliais e são captados por astrócitos e neurônios via MCT 4 e MCT2, respectivamente (Hartman et al 2007; Pierre & Pellerin 2005). O nível reduzido de β -hidroxibutirato nos animais submetidos a ambas DCs sugere que este CC está

sendo altamente captado e consumido pelas células do SNC e indicam a substituição parcial de glicose por CCs como combustível energético, evento conhecido na cetogênese promovida pela dieta (Hartman et al 2007; Westman et al 2003).

As mudanças induzidas pela DC podem afetar os níveis cerebrais de neurotrofinas e citocinas. Para investigar esta hipótese medimos o conteúdo no SNC de BDNF, TNF-alfa e S100B, em ratos tratados com dois diferentes tipos de DCs, contendo proporções diferentes de PUFA, $\omega 3$ e $\omega 6$.

O BDNF é amplamente expresso no cérebro de roedores, e, é especialmente, abundante no hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, estriado e amígdala (Kawamoto et al 1996). BDNF modula a transmissão sináptica, plasticidade, sobrevivência de diferentes tipos de neurônios (Noble et al 2011), resultando na regulação do desenvolvimento, manutenção e função de múltiplas redes neuronais (Baliatti et al 2010). Nosso trabalho confirmou que o imunoc conteúdo de BDNF no hipocampo é maior do que no estriado em ratos *Wistar*. As diferentes dietas DCs não alteraram o conteúdo de BDNF no hipocampo, contudo, inesperadamente, houve diminuição de BDNF no estriado.

Vários estudos têm sugerido que alterações metabólicas periféricas podem alterar a expressão e liberação de BDNF no cérebro. Por exemplo, o exercício físico é capaz de induzir um aumento da regulação do BDNF no hipocampo e poderia, portanto, desempenhar um papel importante na melhoria das funções cognitivas em modelos de roedores e de humor em humanos (Zoladz & Pilc 2010). A restrição calórica (CR) também aumenta os níveis de BDNF em estruturas cerebrais como hipocampo, córtex cerebral e estriado de

ratos, aumentando a qualidade de vida e a longevidade de roedores (Duan et al 2001). E, acredita-se, que a DC promove alterações de BDNF similares com as que ocorrem na CR (Maalouf et al 2009).

Todos esses estudos têm sugerido um papel neuroprotetor do BDNF, inclusive em neurônios dopaminérgicos (por exemplo, Peng et al, 2011). Portanto, neste momento, aparentemente, a DC não seria benéfica para as células do estriado. Este aparente efeito prejudicial da DC em regiões específicas do cérebro já foi relatado anteriormente. Por exemplo, o estresse oxidativo é reduzido pela DC no hipocampo, mas é agravado no cerebelo (Ziegler et al 2003). Alterações morfológicas e moleculares, envolvidas em processos de plasticidade sináptica, induzidas por DC foram benéficas na região CA1 do hipocampo, mas não no giro dentado (Baliatti et al 2010). Em nosso estudo, a DC também promoveu efeitos antagônicos, no hipocampo nenhuma alteração de conteúdo de BDNF foi observada, enquanto que no estriado, a dieta inibiu a expressão de BDNF. Sabe-se que BDNF modula a expressão de MCT 2 no botão terminal no hipocampo (Robinet & Pellerin 2011). Podemos supor que a captação de CCs na região do estriado pode estar comprometida acarretando um desbalanço energético nesta região. No entanto, investigamos apenas o efeito basal da DC e mais estudos devem ser feitos a fim de investigar as mudanças induzidas pela DC no estriado e hipocampo em condições de lesão, tais como, modelos de epilepsia ou de doença de Parkinson a fim de saber se esta redução é benéfica ou maléfica para o estriado.

Além disso, não se observou alterações de conteúdo de TNF- α no hipocampo, estriado, soro e LCR (figura 3, em anexos). Citocinas são proteínas

potentes, multifuncionais e de ação pleiotrópica, capazes de ativar células e de realizar a comunicação célula-a-célula do sistema imunológico (Vitkovic et al 2000). As citocinas foram identificadas no SNC por imunistoquímica (Breder et al 1988; Plata-Salaman et al 1988) e hoje são vistas como mediadores da comunicação bidirecional entre o SNC e o sistema imune periférico (Wilson et al 2002).

Acreditava-se que a expressão das citocinas no SNC só ocorria em resposta a uma infecção, insulto ou outras perturbações a fim de desencadear uma interação entre sistema nervoso e sistema imune a fim de proteger os neurônios de danos promovidos pelo ambiente (Vitkovic et al 2000). Entretanto, crescentes evidências, suportam as citocinas como mediadores do SNC saudável e muitas vezes sinalizando como fatores neurotróficos para a funcionalidade das células neuronais e gliais (McCoy & Tansey 2008; Vitkovic et al 2000; Wilson et al 2002; Yirmiya & Goshen 2011).

TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória que no cérebro é principalmente *up-regulada* e liberada pelas células gliais incluindo astrócitos e, principalmente, a microglia. TNF- α desempenha papel no início das reações inflamatórias do sistema imune inato. Em condições de lesão há um aumento da produção e da liberação de TNF- α , mediador que ativa a microglia e os astrócitos (McCoy & Tansey 2008; Nishioku et al 2010; Wilson et al 2002). No entanto, níveis crônicos elevados de citocinas podem desenvolver uma exposição crônica ao estresse oxidativo, alterar a permeabilidade da barreira hemato-encefálica e incrementar a neuroinflamação e doença neurodegenerativa (Eskandari et al 2003; Krause & Muller 2010; McCoy & Tansey 2008; Stoll & Jander 1999).

Outro estudo sugere que TNF- α pode ser um agente neuroprotetor ao induzir a expressão de BDNF e pré-condicionar os neurônios a fim de ampliar sua resistência a neurotoxinas ou lesões futuras (Saha et al 2006).

Diversas condições do metabolismo periférico, tais como aterosclerose, obesidade, diabetes tipo 2 e exercício físico crônico, alteram as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , na periferia (Hotamisligil et al 1995; Hotamisligil & Spiegelman 1994; Spranger et al 2003; Woods et al 2009). Em alguns trabalhos já foi demonstrado que mudanças do metabolismo promovidas por dieta podem alterar a expressão e liberação de citocinas no SNC (Galic et al 2011). Por exemplo, dieta rica em colesterol aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias em ratos (Lewis et al 2010) e a CR em roedores envelhecidos regula negativamente a expressão de citocinas inflamatórias (Wilson et al 2002). Além disso, pré-tratamento com DC reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), diminuindo a neuroinflamação e promovendo uma maior sobrevivência de neurônios dopaminérgicos em modelo da doença de Parkinson com MPTP em camundongos (Yang & Cheng 2010).

Em nossas condições, a DC não alterou os níveis basais de TNF- α no hipocampo e estriado e com nossos dados não podemos relacionar a modulação de TNF- α sobre a expressão de BDNF nas diferentes estruturas cerebrais em virtude de os níveis desta citocina não alterarem no estriado, enquanto que, o conteúdo de BDNF foi reduzido no estriado.

Deve-se ressaltar a importância de se avaliar o efeito da dieta em condições de lesão na modulação de TNF- α e a baixa sensibilidade do kit que utilizamos para as amostras do soro e LCR.

S100B é uma proteína ligante de Ca^{++} , predominantemente expressa e secretada pelos astrócitos no SNC (Donato 2001). Atualmente, sabe-se que sua expressão não é exclusiva de astrócitos, sendo identificada em oligodendrócitos em maturação e certas populações neuronais, como neurônios colinérgicos do rombencéfalo (Donato et al 2009; Yang et al 1995). Além dessas células, foi também identificada a expressão de S100B em outras células de tecidos não-neuronais, como adipócitos, condrócitos e células de melanoma (Goncalves et al 2010).

A S100B no meio intracelular pode regular o metabolismo da glicose, plasticidade do citoesqueleto e da proliferação celular (Donato et al 2009). A S100B secretada pode desempenhar diferentes papéis dependendo da sua concentração (Van Eldik & Wainwright 2003). Em concentrações baixas a S100B atua como fator trófico sobre células gliais e neurônios, nos quais promove crescimento de neuritos, modulação sináptica e sobrevivência neuronal (Van Eldik & Wainwright 2003). Em concentrações mais elevadas, a S100B sinaliza que a injúria tecidual e torna-se um mediador da resposta inflamatória e de apoptose (Donato et al 2009; Goncalves et al 2008). Esta proteína também é secretada *in vitro* e *in vivo* em resposta a sinais inflamatórios como a presença de interleucina IL-1 β e LPS em meio de cultura (de Souza et al 2009; Guerra et al 2011). Sua elevada concentração no LCR tem sido observada como resposta à condições de lesão agudas (Goncalves et al 2008).

S100B também é regulada por alterações no metabolismo periférico. Por exemplo, ratos diabéticos apresentam níveis elevados de S100B no LCR e quando, submetidos a exercício físico, há redução da concentração de S100B

ao mesmo nível dos animais controles (de Senna et al 2011). Entretanto, ratos submetidos a CR não sofreram alterações do imunoconteúdo de S100B tanto no hipocampo quanto no soro desses animais (Ribeiro et al 2009).

No nosso estudo, também não encontramos alterações do conteúdo de S100B induzida pelas diferentes DCs no hipocampo e estriado quando comparados com ratos alimentados com dieta controle. No entanto, uma comparação direta entre s-DC e ω 3-DC sugere uma diferença de expressão dessa proteína no estriado. O significado funcional deste achado não é claro, mas é possível conceber que PUFAs são moduladores da expressão de S100B particularmente no estriado. Já foi descrito que o ácido arundico é capaz de inibir a expressão de S100B, mas o mecanismo de transcrição envolvido é desconhecido (Asano et al 2005).

Em relação ao conteúdo de S100B no tecido adiposo também não houve alteração da expressão desta proteína nas diferentes dietas (figura 2, em anexos). O tecido adiposo expressa e secreta diversas adipocinas como resposta às alterações do metabolismo periférico (por exemplo, TNF- α , IL-6) (Wang et al, 2007). Este tecido também é capaz de expressar e secretar S100B na periferia e acredita-se que devido a grande quantidade de tecido adiposo no organismo, este seria a principal fonte de S100B no soro (Goncalves et al 2010). Em um estudo em humanos, demonstrou-se correlação entre índice de massa corporal (IMC), níveis séricos de S100B e duas proteínas derivadas do tecido adiposo, a leptina e a proteína ligante de ácido graxo derivada de adipócitos (A-FABP), em indivíduos sem história prévia de distúrbios neurológicos ou psiquiátricos (Steiner et al 2010).

Em modelo de *diabets mellitus* tipo I induzido por estreptozotocina em ratos, há aumento de expressão de S100B no tecido adiposo (Zimmer et al 1997). Além disso, alterações no metabolismo lipídico promovem alterações na regulação dos adipócitos, aumentando a expressão de citocinas no tecido (Wang et al 2007). A DC aumenta consideravelmente o tecido adiposo no organismo (Ribeiro et al 2008) e altera o metabolismo de adipócitos, elevando a taxa de lipólise, reação que se acredita estar relacionada com a secreção de S100B pelo tecido adiposo (Goncalves et al 2010). Esperávamos que as DCs modulassem positivamente a expressão e liberação de S100B. Entretanto, apenas observamos uma tendência de elevação de S100B no tecido adiposo (figura 2, em anexos) em ambas DCs. Esta tendência pode ter sido resultado do protocolo de experimentação que utilizamos para eutásia dos animais, pois para análise bioquímica todos os indivíduos estavam em jejum.

Não observamos diferenças nos níveis de S100B no soro dos animais submetidos as diferentes dietas. Talvez isso tenha ocorrido por uma medida compensatória, pois, no protocolo de experimentação, submetemos os ratos a 8h de jejum.

No LCR, há redução do nível de S100B nos animais submetidos as diferentes DCs, esse efeito já havia sido relatado anteriormente pelo nosso grupo (Ziegler et al 2004). A alteração dos níveis de S100B no LCR pode ser resultado da modulação dos CCs sobre os astrócitos e a secreção da proteína. Leite em 2004 observou em cultura de astrócitos expostos a uma concentração de 5 mM β -hidroxibutirato por 24h, que CCs podem modular a secreção de S100B, diminuindo os níveis desta proteína no espaço extracelular (Leite et al 2004). Esta alteração no LCR poderia ser desencadeada por e/ou ser um

indicativo de alterações do metabolismo energético, ou seja, um decréscimo de utilização da glicose. De fato, em ratos submetidos a administração intracerebroventricular de estreptozotocina (Rodrigues et al 2009) ou hipoperfusão cerebral crônica (Vicente et al 2009), duas condições associadas com a redução do consumo de glicose, é observado um decréscimo de S100B no LCR.

Esta redução isolada poderia ser interpretada como uma diminuição da ação extracelular de S100B como fator neurotrófico e, portanto, acarretaria um prejuízo ao SNC. Entretanto, níveis elevados de S100B em culturas são potencialmente prejudiciais pois induzem a morte celular e, em algumas condições, a redução da S100B extracelular pode ser concebida como um sinal benéfico para o organismo (Donato et al 2009; Goncalves et al 2008).

Portanto, observamos que S100B não se alterou no soro, mas diminuiu no LCR de ratos submetidos à DC o que pode sugerir ações independentes de expressão e secreção do SNC e da periferia. Esta independência já foi observada em trabalhos anteriores, em modelo de jejum prolongado (Netto et al 2006) e estimulação periférica de inflamação por injeção intraperitoneal de LPS (Guerra et al 2011).

Em relação ao estado redox, as DCs elevaram o conteúdo de GSH apenas na região do hipocampo (figura 4, em anexos). Este efeito já havia sido relatado anteriormente na literatura (Jarrett et al 2008). E em outro trabalho do nosso grupo a DC aumentou a atividade da glutathione peroxidase (Ziegler et al 2003). A expressão de UCP 2 no hipocampo em ratos submetidos a ambas DCs não foi alterada (figura 5, em anexos), sendo este dado contrário ao que já foi relatado em camundongos na literatura (Sullivan et al 2004). A partir dos

nossos resultados não podemos concluir se a DC age de forma neuroprotetora, mantendo o estado redox da célula e diminuindo os danos promovidos por estresse oxidativo. No entanto, investigamos apenas o efeito basal da DC. Mais estudos devem ser feitos a fim de investigar as mudanças induzidas por DC também no estriado. Para confirmar o mecanismo da DC na regulação da produção de EROs e da atividade antioxidante também devem ser feitos estudos em condições de injúria no SNC, como modelo de epilepsia.

IV. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que DC durante 8 semanas foi capaz de alterar a taxa de crescimento dos ratos submetidos às diferentes DCs. Durante este período, a DC foi capaz de induzir cetogênese e não promover degradação de proteínas na periferia dos ratos submetidos tanto pela s-DC quanto pela w3-DC. Podemos concluir que os ratos substituíram parcialmente o consumo de glicose como combustível para a manutenção da atividade do SNC devido à redução de β -hidroxibutirato no líquido cefalorraquidiano. A DC reduziu os níveis de duas moléculas supostamente com ação neurotrófica no SNC: BDNF no estriado e S100B no líquido cefalorraquidiano de ratos. Essas alterações não foram afetadas pela proporção de PUFAs entre as diferentes DCs ingeridas. Não foram observadas alterações no conteúdo de BDNF no hipocampo, nem no conteúdo do TNF- α no hipocampo ou estriado. Não ocorreram alterações no soro e no conteúdo no tecido adiposo de S100B.

Os níveis de GSH aumentaram no hipocampo, enquanto que, no estriado não foi observada nenhuma alteração. A expressão de UCP 2 não foi alterada no hipocampo de ambas as dietas. Portanto, como nossos resultados não podemos observar a regulação do estado redox da célula.

Esses achados reforçam a importância desta dieta como indutor de mudanças do SNC, o que pode contribuir para entender a atividade neuroprotetora (ou efeitos colaterais) da DC em distúrbios cerebrais.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53
- Adibhatla RM, Hatcher JF. 2008. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem* 49:241-68
- Andrews ZB, Diano S, Horvath TL. 2005. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* 6:829-40
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-15
- Asano T, Mori T, Shimoda T, Shinagawa R, Satoh S, et al. 2005. Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:127-42
- Auestad N, Korsak RA, Morrow JW, Edmond J. 1991. Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 56:1376-86
- Baliatti M, Giorgetti B, Di Stefano G, Casoli T, Platano D, et al. 2010. A ketogenic diet increases succinic dehydrogenase (SDH) activity and recovers age-related decrease in numeric density of SDH-positive mitochondria in cerebellar Purkinje cells of late-adult rats. *Micron* 41:143-8
- Baliatti M, Giorgetti B, Fattoretti P, Grossi Y, Di Stefano G, et al. 2008. Ketogenic diets cause opposing changes in synaptic morphology in CA1 hippocampus and dentate gyrus of late-adult rats. *Rejuvenation Res* 11:631-40
- Baranano KW, Hartman AL. 2008. The ketogenic diet: uses in epilepsy and other neurologic illnesses. *Curr Treat Options Neurol* 10:410-9
- Barde YA. 1994. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res* 390:45-56
- Bechmann I, Diano S, Warden CH, Bartfai T, Nitsch R, Horvath TL. 2002. Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol* 64:363-7
- Bergami M, Santi S, Formaggio E, Cagnoli C, Verderio C, et al. 2008. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J Cell Biol* 183:213-21
- Beutler BA. 1999. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl* 57:16-21
- Binder DK, Scharfman HE. 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22:123-31
- Bixel MG, Hamprecht B. 1995. Generation of ketone bodies from leucine by cultured astroglial cells. *J Neurochem* 65:2450-61
- Borges K. 2008. Mouse models: the ketogenic diet and polyunsaturated fatty acids. *Epilepsia* 49 Suppl 8:64-6
- Bough K. 2008. Energy metabolism as part of the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Epilepsia* 49 Suppl 8:91-3
- Breder CD, Dinarello CA, Saper CB. 1988. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science* 240:321-4
- Brown AM, Ransom BR. 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-71
- Brunet JF, Allaman I, Magistretti PJ, Pellerin L. 2010. Glycogen metabolism as a marker of astrocyte differentiation. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:51-5

- Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. 2006. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 110:167-73
- Cunnane SC. 2004. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and ketogenesis: an emerging connection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:237-41
- Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, Begin M, Feart C, Barberger-Gateau P. 2009. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res* 48:239-56
- de Senna PN, Ilha J, Baptista PP, do Nascimento PS, Leite MC, et al. 2011. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis* 26:269-79
- de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, et al. 2009. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* 206:52-7
- Dickinson DA, Forman HJ. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019-26
- Dietrich MO, Horvath TL. 2010. The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflugers Arch* 459:269-75
- Donato R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637-68
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, et al. 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793:1008-22
- Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-71
- Duan W, Lee J, Guo Z, Mattson MP. 2001. Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J Mol Neurosci* 16:1-12
- El-Mallakh RS, Paskitti ME. 2001. The ketogenic diet may have mood-stabilizing properties. *Med Hypotheses* 57:724-6
- Eriksen JL, Druse MJ. 2001. Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. *Brain Res Dev Brain Res* 131:9-15
- Erlanson-Albertsson C. 2003. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand* 178:405-12
- Eskandari F, Webster JI, Sternberg EM. 2003. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 5:251-65
- Evangelidou A, Vlachonikolis I, Mihailidou H, Spilioti M, Skarpalezou A, et al. 2003. Application of a ketogenic diet in children with autistic behavior: pilot study. *J Child Neurol* 18:113-8
- Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, et al. 2006. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J Neurochem* 96:385-95
- Freeman J, Veggiotti P, Lanzi G, Tagliabue A, Perucca E. 2006. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. *Epilepsy Res* 68:145-80
- Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. 2011. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol*
- Goncalves CA, Leite MC, Guerra MC. 2010. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2010:790431

- Goncalves CA, Leite MC, Nardin P. 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* 41:755-63
- Griffith OW. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27:922-35
- Guerra MC, Tortorelli LS, Galland F, Da Re C, Negri E, et al. 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation* 8:128
- Guzman M, Blazquez C. 2001. Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrinol Metab* 12:169-73
- Hartman AL, Gasior M, Vining EP, Rogawski MA. 2007. The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 36:281-92
- Haydon PG, Carmignoto G. 2006. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-31
- Henderson ST. 2008. Ketone bodies as a therapeutic for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5:470-80
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-15
- Hotamisligil GS, Spiegelman BM. 1994. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-8
- Jarrett SG, Milder JB, Liang LP, Patel M. 2008. The ketogenic diet increases mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem* 106:1044-51
- Jeong EA, Jeon BT, Shin HJ, Kim N, Lee DH, et al. 2011. Ketogenic diet-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation decreases neuroinflammation in the mouse hippocampus after kainic acid-induced seizures. *Exp Neurol* 232:195-202
- Jessen KR. 2004. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1861-7
- Kawamoto Y, Nakamura S, Nakano S, Oka N, Akiguchi I, Kimura J. 1996. Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* 74:1209-26
- Kim-Han JS, Dugan LL. 2005. Mitochondrial uncoupling proteins in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal* 7:1173-81
- Kim do Y, Rho JM. 2008. The ketogenic diet and epilepsy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:113-20
- Korshunov SS, Korkina OV, Ruuge EK, Skulachev VP, Starkov AA. 1998. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂⁻ and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett* 435:215-8
- Krause DL, Muller N. 2010. Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010
- Kunnecke B, Cerdan S, Seelig J. 1993. Cerebral metabolism of [1,2-¹³C₂]glucose and [U-¹³C₄]3-hydroxybutyrate in rat brain as detected by ¹³C NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 6:264-77
- Laeger T, Metges CC, Kuhla B. 2010. Role of beta-hydroxybutyric acid in the central regulation of energy balance. *Appetite* 54:450-5
- Leite M, Frizzo JK, Nardin P, de Almeida LM, Tramontina F, et al. 2004. Beta-hydroxy-butyrates alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull* 64:139-43

- Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, et al. 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169:93-9
- Lewis DK, Bake S, Thomas K, Jezierski MK, Sohrabji F. 2010. A high cholesterol diet elevates hippocampal cytokine expression in an age and estrogen-dependent manner in female rats. *J Neuroimmunol* 223:31-8
- Maalouf M, Rho JM, Mattson MP. 2009. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res Rev* 59:293-315
- Maragakis NJ, Rothstein JD. 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679-89
- Marszalek JR, Kitidis C, Dirusso CC, Lodish HF. 2005. Long-chain acyl-CoA synthetase 6 preferentially promotes DHA metabolism. *J Biol Chem* 280:10817-26
- Marszalek JR, Lodish HF. 2005. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:633-57
- Martin HL, Teismann P. 2009. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J* 23:3263-72
- McCoy MK, Tansey MG. 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45
- Melo TM, Nehlig A, Sonnewald U. 2006. Neuronal-glial interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochem Int* 48:498-507
- Milder J, Patel M. 2011. Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet. *Epilepsy Res*
- Munoz-Fernandez MA, Fresno M. 1998. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56:307-40
- Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, et al. 2006. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res* 37:683-6
- Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, et al. 2010. Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 112:251-4
- Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. 2011. The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R1053-69
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-7
- Pellerin L. 2003. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int* 43:331-8
- Pellerin L. 2005. How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol* 32:59-72
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, et al. 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251-62
- Peng C, Aron L, Klein R, Li M, Wurst W, et al. 2011. Pitx3 is a critical mediator of GDNF-induced BDNF expression in nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 31:12802-15
- Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-31
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-56

- Pierre K, Pellerin L. 2005. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 94:1-14
- Pifferi F, Tremblay S, Plourde M, Tremblay-Mercier J, Bentourkia M, Cunnane SC. 2008. Ketones and brain function: possible link to polyunsaturated fatty acids and availability of a new brain PET tracer, 11C-acetoacetate. *Epilepsia* 49 Suppl 8:76-9
- Plata-Salaman CR, Oomura Y, Kai Y. 1988. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res* 448:106-14
- Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, et al. 2007. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol* 184:214-22
- Rapoport SI. 2001. In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling. *J Mol Neurosci* 16:243-61; discussion 79-84
- Ribeiro LC, Chitto AL, Muller AP, Rocha JK, Castro da Silva M, et al. 2008. Ketogenic diet-fed rats have increased fat mass and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. *Mol Nutr Food Res* 52:1365-71
- Ribeiro LC, Quincozes-Santos A, Leite MC, Abib RT, Kleinkauf-Rocha J, et al. 2009. Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. *Neurosci Res* 64:330-4
- Robinet C, Pellerin L. 2011. Brain-derived neurotrophic factor enhances the hippocampal expression of key postsynaptic proteins in vivo including the monocarboxylate transporter MCT2. *Neuroscience* 192:155-63
- Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, et al. 2009. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis* 17:193-202
- Ruskin DN, Kawamura M, Masino SA. 2009. Reduced pain and inflammation in juvenile and adult rats fed a ketogenic diet. *PLoS One* 4:e8349
- Saha RN, Liu X, Pahan K. 2006. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:212-22
- Saha RN, Pahan K. 2006. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem Int* 49:154-63
- Schousboe A, Sickmann HM, Walls AB, Bak LK, Waagepetersen HS. 2010. Functional importance of the astrocytic glycogen-shunt and glycolysis for maintenance of an intact intra/extracellular glutamate gradient. *Neurotox Res* 18:94-9
- Schurr A. 2006. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J Cereb Blood Flow Metab* 26:142-52
- Schwartzkroin PA. 1999. Mechanisms underlying the anti-epileptic efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 37:171-80
- Seifert G, Carmignoto G, Steinhauser C. 2010. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev* 63:212-21
- Serhan CN, Arita M, Hong S, Gotlinger K. 2004. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* 39:1125-32
- Silva MC, Rocha J, Pires CS, Ribeiro LC, Brolese G, et al. 2005. Transitory gliosis in the CA3 hippocampal region in rats fed on a ketogenic diet. *Nutr Neurosci* 8:259-64

- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1766-91
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, et al. 2003. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812-7
- Steiner J, Schiltz K, Walter M, Wunderlich MT, Keilhoff G, et al. 2010. S100B serum levels are closely correlated with body mass index: an important caveat in neuropsychiatric research. *Psychoneuroendocrinology* 35:321-4
- Stoll G, Jander S. 1999. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58:233-47
- Sukumari-Ramesh S, Laird MD, Singh N, Vender JR, Alleyne CH, Jr., Dhandapani KM. 2010. Astrocyte-derived glutathione attenuates hemin-induced apoptosis in cerebral microvascular cells. *Glia* 58:1858-70
- Sullivan PG, Rippy NA, Dorenbos K, Concepcion RC, Agarwal AK, Rho JM. 2004. The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. *Ann Neurol* 55:576-80
- Tai KK, Nguyen N, Pham L, Truong DD. 2008. Ketogenic diet prevents cardiac arrest-induced cerebral ischemic neurodegeneration. *J Neural Transm* 115:1011-7
- Tai KK, Truong DD. 2007. Ketogenic diet prevents seizure and reduces myoclonic jerks in rats with cardiac arrest-induced cerebral hypoxia. *Neurosci Lett* 425:34-8
- Van der Auwera I, Wera S, Van Leuven F, Henderson ST. 2005. A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Metab (Lond)* 2:28
- Van Eldik LJ, Wainwright MS. 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21:97-108
- Vanitallie TB, Nonas C, Di Rocco A, Boyar K, Hyams K, Heymsfield SB. 2005. Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: a feasibility study. *Neurology* 64:728-30
- Veech RL. 2004. The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:309-19
- Verkhatsky A, Steinhauser C. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32:380-412
- Vicente E, Degerone D, Bohn L, Scornavaca F, Pimentel A, et al. 2009. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* 1251:204-12
- Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. 2000. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74:457-71
- Wang Z, Masternak MM, Al-Regaiey KA, Bartke A. 2007. Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology* 148:2845-53
- Westman EC, Mavropoulos J, Yancy WS, Volek JS. 2003. A review of low-carbohydrate ketogenic diets. *Curr Atheroscler Rep* 5:476-83
- Wilson CJ, Finch CE, Cohen HJ. 2002. Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc* 50:2041-56
- Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. 2009. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Immunol Allergy Clin North Am* 29:381-93

- Yang Q, Hamberger A, Hyden H, Wang S, Stigbrand T, Haglid KG. 1995. S-100 beta has a neuronal localisation in the rat hindbrain revealed by an antigen retrieval method. *Brain Res* 696:49-61
- Yang X, Cheng B. 2010. Neuroprotective and anti-inflammatory activities of ketogenic diet on MPTP-induced neurotoxicity. *J Mol Neurosci* 42:145-53
- Yirmiya R, Goshen I. 2011. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25:181-213
- Yoo YM, Kim YJ, Lee U, Paik DJ, Yoo HT, et al. 2003. Neurotrophic factor in the treatment of Parkinson disease. *Neurosurg Focus* 15:ECP1
- Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Horyn O, Lazarow A, et al. 2005. Response of brain amino acid metabolism to ketosis. *Neurochem Int* 47:119-28
- Zhao Z, Lange DJ, Voustantiouk A, MacGrogan D, Ho L, et al. 2006. A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci* 7:29
- Ziegler DR, Araujo E, Rotta LN, Perry ML, Goncalves CA. 2002. A ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. *J Nutr* 132:483-7
- Ziegler DR, Oliveira DL, Pires C, Ribeiro L, Leite M, et al. 2004. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res* 50:375-9
- Ziegler DR, Ribeiro LC, Hagenn M, Siqueira IR, Araujo E, et al. 2003. Ketogenic diet increases glutathione peroxidase activity in rat hippocampus. *Neurochem Res* 28:1793-7
- Zimmer DB, Chessher J, Wilson GL, Zimmer WE. 1997. S100A1 and S100B expression and target proteins in type I diabetes. *Endocrinology* 138:5176-83
- Zoladz JA, Pilc A. 2010. The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. *J Physiol Pharmacol* 61:533-41

Anexos

Resultados da dissertação não submetidos à publicação

- β -hidroxibutirato no líquido cefalorraquidiano

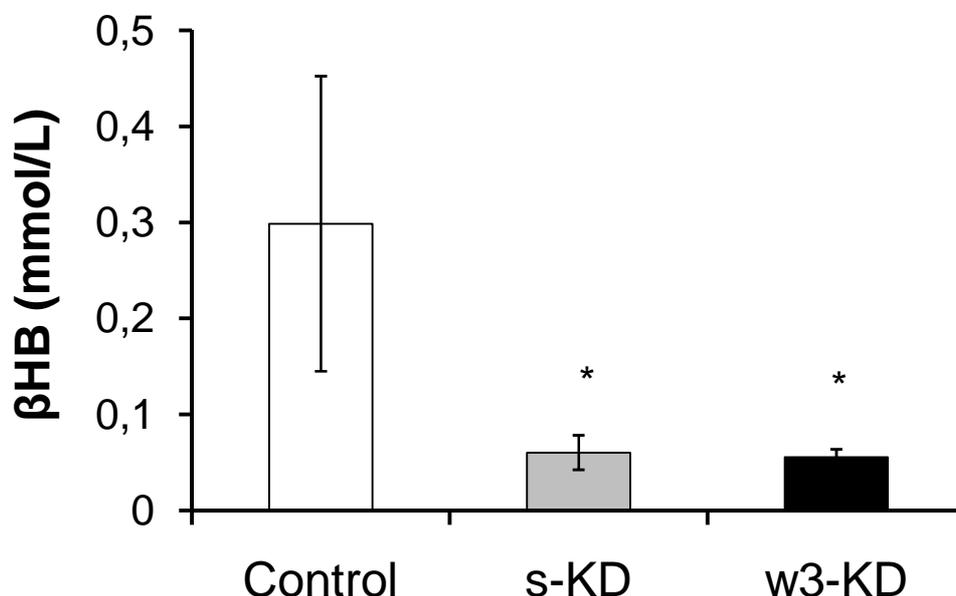


Figura 1: **Nível de β -hidroxibutirato (β HB) no líquido cefalorraquidiano (LCR) em ratos submetidos a diferentes dietas.** Ratos *Wistar* machos foram submetidos a dieta controle (control), dieta cetogênica clássica (s-DC) e dieta cetogênica enriquecida com ômega-3 (w3-DC). Após 8 semanas de tratamento, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina e xilasina (75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente). Após a observação da perda do reflexo álgico na compressão do rabo do animal, os ratos foram submetidos à coleta de LCR na cisterna magna. Amostra foi congelada a -80°C . Níveis de β HB foram mensurados através de reação espectrofotométrica (Kit Ranbut, CAT RB1007). Os valores representam a média \pm erro padrão. ANOVA de uma via, seguida de *post-hoc* Teste de Tukey. * diferenças significativas ($p < 0,05$).

- S100B no tecido adiposo

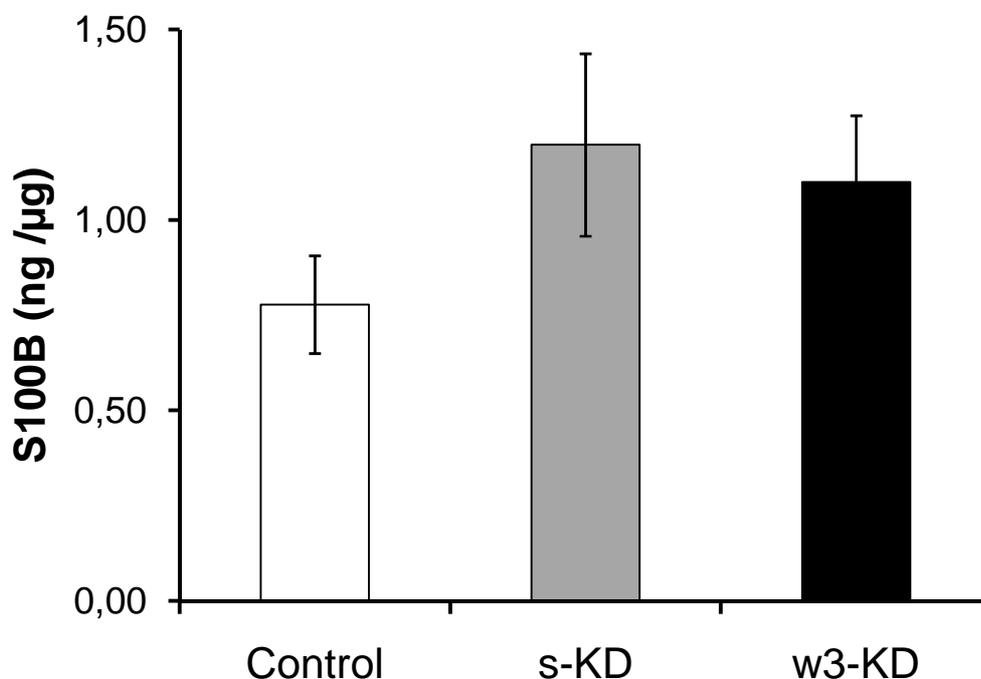


Figura 2: **Conteúdo de S100B no tecido adiposo em ratos submetidos a diferentes dietas.** Ratos *Wistar* machos foram submetidos a dieta controle (control), dieta cetogênica clássica (s-DC) e dieta cetogênica enriquecida com ômega-3 (w3-DC). Após 8 semanas de tratamento, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina e xilasina (75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente). Após a observação da perda do reflexo álgico na compressão do rabo do animal, os ratos foram submetidos à coleta de tecido adiposo epididimal. Amostra foi congelada a -80°C . Para mensurar S100B, o tecido adiposo foi preparado através de deslipidação. O imunocónteuo de S100B foi mensurado através de técnica imunológica de ELISA conforme Leite et al., (2008). Os valores representam a média \pm erro padrão. ANOVA de uma via, seguida de *post-hoc* Teste de Tukey ($p < 0,05$).

- TNF- α no soro e líquido cefalorraquidiano

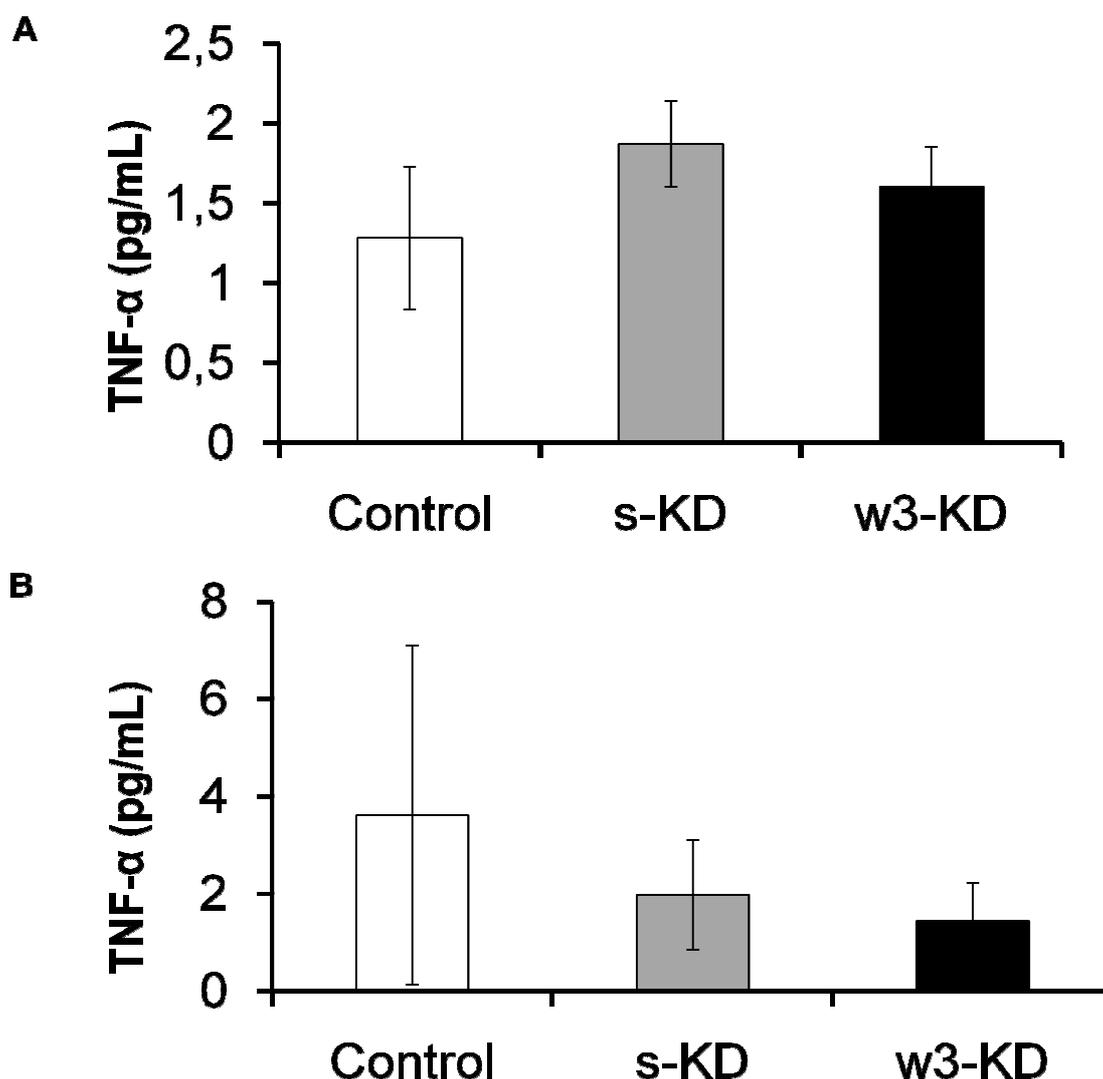


Figura 3: Conteúdo de TNF- α no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) em ratos submetidos a diferentes dietas. Ratos Wistar machos foram submetidos a dieta controle (control), dieta cetogênica clássica (s-DC) e dieta cetogênica enriquecida com ômega-3 (w3-DC). Após 8 semanas de tratamento, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina e xilasina (75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente). Após a observação da perda do reflexo álgico na compressão do rabo do animal, os ratos foram submetidos à coleta de tecido adiposo ependimal. Amostra foi congelada a -80°C . O imunoc conteúdo de TNF- α foi mensurado através de técnica imunológica de ELISA (eBioscience, Ref. 88-7340). Os valores representam a média \pm erro padrão. ANOVA de uma via, seguida de *post-hoc* Teste de Tukey ($p < 0,05$).

- GSH no hipocampo e estriado

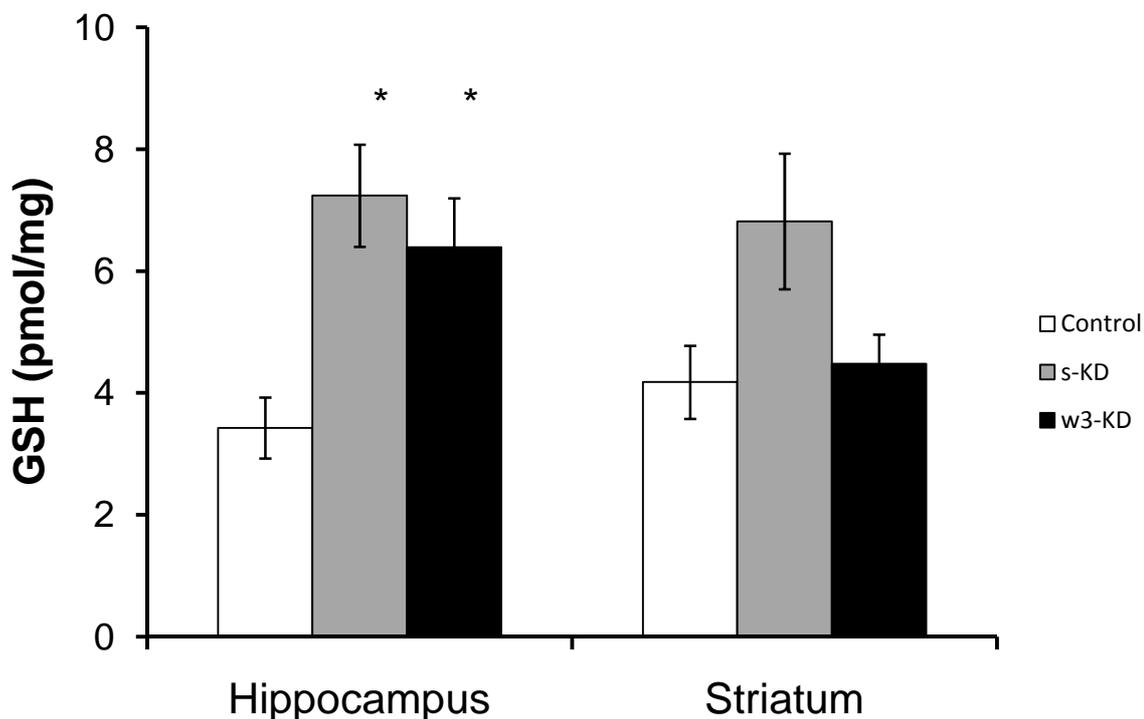


Figura 4: **Conteúdo de glutathiona (GSH reduzida) no hipocampo e estriado em ratos submetidos a diferentes dietas.** Ratos Wistar machos foram submetidos a dieta controle (control), dieta cetogênica clássica (s-DC) e dieta cetogênica enriquecida com ômega-3 (w3-DC). Após 8 semanas de tratamento, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina e xilasina (75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente). Após a observação da perda do reflexo álgico na compressão do rabo do animal, fatias de hipocampo de 0,3 mm foram congeladas a -80°C. O conteúdo de GSH foi mensurado através de reação espectrofotométrica com adição de OPT. Os valores representam a média \pm erro padrão. ANOVA de uma via, seguida de *post-hoc* Teste de Tukey. ($p < 0,05$).

- UCP 2 no hipocampo

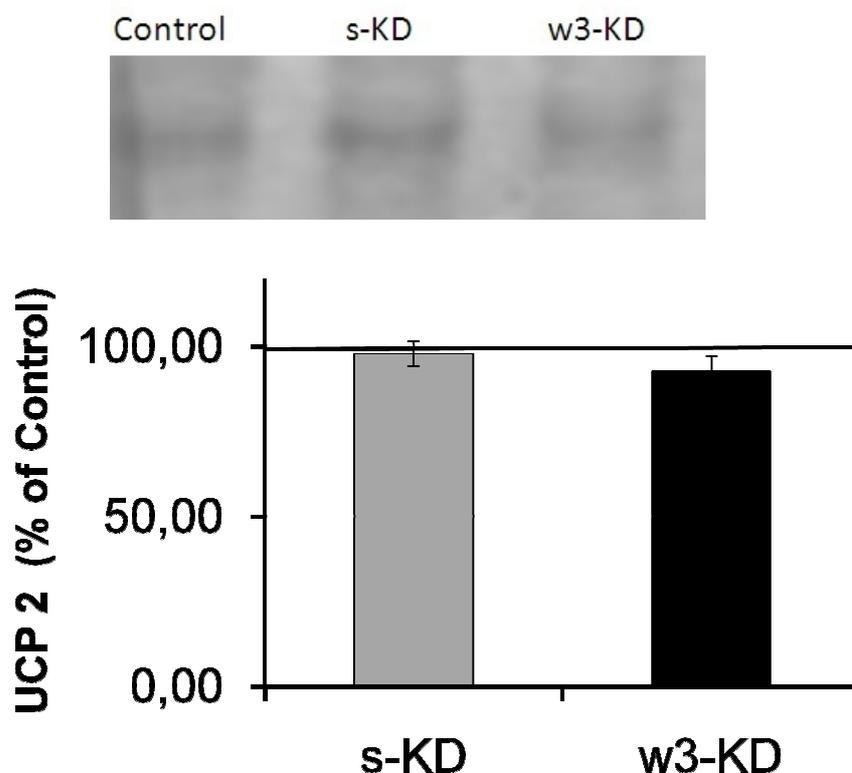


Figura 5: **Expressão de UCP 2 no hipocampo em ratos submetidos a diferentes dietas.** Ratos *Wistar* machos foram submetidos a dieta controle (control), dieta cetogênica clássica (s-DC) e dieta cetogênica enriquecida com ômega-3 (w3-DC). Após 8 semanas de tratamento, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina e xilasina (75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente). Após a observação da perda do reflexo álgico na compressão do rabo do animal, fatias de hipocampo de 0,3 mm foram congeladas a -80°C . A expressão de UCP2 foi mensurada por *Western blot* (Anticorpo goat polyclonal IgG UCP2, Santa Cruz, sc-6526). ANOVA de uma via, seguida de *post-hoc* Teste de Tukey ($p < 0,05$).