

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

**EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA SOBRE A HIDRÓLISE DE
NUCLEOTÍDEOS EM SINAPTOSSOMAS E SORO SANGUÍNEO DE RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE INDUÇÃO DE *STATUS EPILEPTICUS* COM
LÍTIO-PILOCARPINA**

VANESSA GASS DA SILVEIRA

Orientadora

DRa. ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI

Co-Orientador

DR. MARCOS L. SANTOS PERRY

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

Porto Alegre

2007

AGRADECIMENTOS

À Ana, pela orientação e ensinamentos durante o mestrado, pelo exemplo de profissional, pela força, carinho e confiança depositada em mim.

Ao meu co-orientador Perry, pela amizade e por suas incansáveis explicações e aulas de bioquímica, que tanto acrescentaram ao meu crescimento como pesquisadora.

À Carla, por sua inteligência e ajuda fundamental na realização de diversas etapas deste trabalho.

Ao Sarkis, pelo auxílio na realização deste trabalho.

À minha querida amiga Rosane, que me ajudou muito no início da minha caminhada no laboratório, pelas conversas e amizade.

À Alessandra Bruno, à Cristina e ao Jean, pela amizade, disponibilidade e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório 27, em especial ao Alexandre e à Carol, por toda ajuda durante a realização dos experimentos, e pela amizade dentro e fora do laboratório.

Às amigas queridas do laboratório 21, Cláudia e Josi, por toda a alegria de vocês.

Às amigas dos laboratórios 26 e 28, Vanessa, Bibi, Renata e Ana Elisa, pelo carinho e *happy hours*.

A todos os colegas do laboratório de Enzimologia, por terem me acolhido tão bem, pela convivência, cooperação e amizade.

Às minhas queridas amigas e colegas Vanessinha e Luci, por toda amizade, conversas e chimarrão no fim de tarde.

À Daia, que iniciou como minha estagiária e se tornou uma amiga querida.

Ao Fabrício, pela ajuda na realização dos experimentos.

À Joseli e à Lisandra, amigas especiais de todas as horas e para todos os momentos.

Em especial, à minha grande amiga e colega Giana, que não mede esforços para me ajudar, tanto profissional como pessoalmente. Obrigada Gi, por estar sempre fazendo parte da minha vida, segurando minha mão, principalmente nos momentos difíceis!.

A todos meus amigos queridos do Centro Geriátrico Vitalis, especialmente ao Eduardo, Adriana, Luciana, Aline, Erica, Berenice, Patrícia, Andréa e Solange.

À minha família, por todo o suporte, compreensão, torcida, carinho e união durante mais este período da minha vida. Aos meus pais, pelo amor imensurável!

A Deus, por ter me dado forças e iluminado meu caminho em todos os momentos da minha vida.

À equipe do laboratório, fundamentais na realização deste trabalho.

Ao curso de Pós-graduação em Bioquímica, ao CNPq e aos demais órgãos que apoiaram a realização deste projeto de pesquisa.

E por fim, a todas as pessoas que não foram citadas aqui, mas que de uma forma ou de outra, contribuíram para meu crescimento e concretização deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Corpos cetônicos.....	1
1.2. Dieta cetogênica.....	2
1.3. Modelo do lítio-pilocarpina.....	5
1.4. Sistema purinérgico.....	7
1.4.1. Transmissão purinérgica.....	7
1.4.2. A família das ecto-nucleotidases.....	10
1.4.3. Família das E-NTPDases.....	10
1.4.4. 5'-nucleotidase.....	15
1.4.5. NTPDases no soro sanguíneo.....	17
1.4.6. Família E-NPP (NPP1 à NPP3)	17
1.4.7. Adenosina.....	18
1.5. Enzimas séricas e doenças hepáticas.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Reagentes.....	26
3.2. Equipamentos.....	26
3.3. Animais.....	27

3.4. Desenho experimental.....	27
3.4.1. Modelo do lítio-pilocarpina.....	27
3.4.2. Grupos experimentais.....	28
3.5. Frações biológicas.....	30
3.5.1. Obtenção da fração sinaptossomal.....	30
3.5.2. Isolamento da fração sangüínea e obtenção do soro.....	31
3.6. Ensaio enzimáticos da fração sinaptossomal.....	31
3.7. Determinação de proteínas.....	32
3.8. Modelo experimental de captação de [U- ¹⁴ C]-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo.....	32
3.9. Determinação da relação tecido adiposo retroperitoneal / peso corporal total.....	33
3.10. Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. CAPÍTULO I.....	35
4.1.1. Padronização da dieta cetogênica.....	35
4.1.2. Efeito da KD sobre o peso dos ratos controle e cetogênicos.....	35
4.1.3 Efeito da KD sobre a relação tecido adiposo retroperitoneal / peso corporal total.....	36
4.1.4 Efeito da KD sobre a captação de [U- ¹⁴ C]-Deoxiglicose em músculo sóleo de ratos controle e cetogênicos.....	39
4.1.5 Efeito da KD sobre as ectonucleotidases em sinaptossomas de hipocampo de ratos controle e cetogênicos.....	39
4.2. CAPÍTULO II - Manuscrito a ser submetido à revista Life Sciences.....	44
5. DISCUSSÃO.....	72

6. CONCLUSÕES.....	81
7. PERSPECTIVAS.....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

RESUMO

A epilepsia é um dos mais frequentes distúrbios do sistema nervoso central e se caracteriza por uma atividade neuronal encefálica hipsincrônica, paroxística e anormal. A dieta cetogênica (KD), uma dieta rica em lipídeos e pobre em carboidratos, tem sido usada como alternativa terapêutica para crises convulsivas de difícil controle, principalmente em crianças. Mas apesar do sucesso clínico do tratamento com KD, seu mecanismo de ação ainda é incerto. O neuromodulador adenosina tem sido relatado como um anticonvulsivante endógeno devido à sua interação com os receptores adenosinérgicos do tipo A1. O neurotransmissor ATP é liberado para o meio extracelular e influencia a atividade sináptica através de sua interação com os receptores do tipo P2. Sua ação é terminada através de uma casacata de enzimas chamadas ectonucleotidases, que incluem as NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) e a ecto-5'-nucleotidase. Essas enzimas hidrolisam o ATP extracelular, produzindo o neuromodulador adenosina. Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que as atividades nucleotídicas estão aumentadas em cérebro (hipocampo e córtex cerebral) e soro sanguíneo de ratos submetidos a diferentes modelos de epilepsia. Devido às ações protetoras da KD na epilepsia não estarem claramente identificadas e as nucleotidases estarem associadas a mudanças plásticas induzidas pelo *status epilepticus* (SE), tem sido importante estudarmos a correlação entre estes dois parâmetros. Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem observar, de uma forma geral, que as ectonucleotidases apresentam suas atividades diferentemente alteradas na epilepsia. Em sinaptossoma hipocampal, a indução do SE pelo modelo do lítio-pilocarpina, mas não a KD, promoveu uma diminuição da hidrólise do ATP e um aumento da hidrólise do ADP. Já no soro, a indução do SE por este modelo causou um aumento da hidrólise do ATP e uma diminuição da hidrólise do ADP. Além disso, a KD provocou um aumento da hidrólise de ATP, ADP e AMP, bem como da atividade das enzimas FAL, ALT e AST, levando-nos a propor que a terapia crônica com esta dieta pode levar a danos hepáticos.

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most frequent disorders of the central nervous system and it is characterized by abnormal hypersynchronous neuronal activity. The ketogenic diet (KD), a high-fat and low-carbohydrate diet, has been used as therapeutic alternative to seizures refractory, especially in children. Despite the clinical successes of the KD treatment, the mechanism of action is still unknown. The neuromodulator adenosine has been reported as an endogenous anticonvulsant through activation of adenosine A₁ receptors. The neurotransmitter ATP is released to extracellular space and participates of synaptic activity by activation of P2 purinoreceptors. Its action is terminated by enzyme chain named ectonucleotidases, which include NTPDase family (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) and ecto-5'-nucleotidase. These enzymes hydrolyze extracellular ATP to neuromodulator adenosine. Previous studies have shown that nucleotidase activities are increased in brain (hippocampus and cerebral cortex) and blood serum of rats submitted to different animals models of epilepsy. Owing protective actions from KD in epilepsy not been totally clear and nucleotidases were be associated to plasticity induced for *status epilepticus* (SE), has been important to study the correlation between these two parameters. The results presented in this work leave us to observe that ectonucleotidases presented the activities differently altered in epilepsy. In hippocampus synaptosome, the lithium-pilocarpine-induced SE, but not the KD, promote a decreased in ATP hydrolyze and an increased in ADP hydrolyze. Already in blood serum, the lithium-pilocarpine-induced SE caused an increased ATP hydrolyzes and a decreased ADP hydrolyzes. Moreover, the KD promoted a increased of ATP, ADP and AMP hydrolysis, as well as ALP, AST and ALT activities, suggest that the chronic therapy with the KD can promote a hepatic damages.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Funções do ATP liberado no terminal nervoso e sua completa hidrólise até adenosina no espaço extracelular.....11
- Figura 2.** Topografia de membrana de ectonucleotidases.....12
- Figura 3.** Principais mecanismos pelos quais os componentes podem fornecer neuroproteção por modulação da transmissão de adenosina.....20

CAPÍTULO I

- Figura 4.** Peso total dos ratos após 45 dias de tratamento com as dietas controle e cetogênica.....37
- Figura 5.** Concentração de tecido adiposo retroperitoneal de ratos.....38
- Figura 6.** Captação de [U-¹⁴C]-Deoxiglicose em músculo sóleo de ratos.....41
- Figura 7.** Hidrólise do ATP (A), ADP (B) e AMP (C) em sinaptossoma de hipocampo de ratos.....42

CAPÍTULO II

- Figure 1.** ATP, ADP and AMP hydrolysis from rat blood serum.....69
- Figure 2.** Alkaline phosphatase (ALP) activity from rat blood serum.....70
- Figure 3.** Aspartate aminotranferase (AST) and alanine aminotranferase (ALT) activities from blood serum of rats.....70

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Características dos receptores de adenosina e distribuição no SNC.....	9
Tabela 2. Nomenclatura e preferência de substratos dos membros da família E-NTPDase em vertebrados.....	14
Tabela 3. Subtipos da família das 5'-nucleotidases.....	16
Tabela 4. Composição das dietas controle e cetogênica.....	29

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composition of control and ketogenic diets.....	68
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina 5'-difosfato

AEDs – drogas anticonvulsivantes

ALT – alanina aminotransferase

AMP – adenosina 5'-monofosfato

AMPc – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

AST – aspartato aminotransferase

ATP – adenosina 5'-trifosfato

ATP- λ -S – adenosina 5'-O-(3-tiotrifosfato)

BHB – β -hidroxibutirato

CD39 – antígeno de ativação celular linfóide

CI-IB-MECA – 2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methylcarboxamide

DPCPX – 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

Ecto-5'-NT – ecto-5'-nucleotidase

EEG – atividade eletroencefalográfica

E-NPP – pirofosfatase/fosfodiesterase

FAL – fosfatase alcalina

GABA – ácido gama-aminobutírico

GGt – γ -glutamil transferase

IP₁ – inositol monofosfato

KD – dieta cetogênica

Li-Pilo – lítio-pilocarpina

LTP – potenciação de longa duração

MCT – ácidos monocarboxílicos

NMDA – N-metil-D-aspartato

NTPDase – nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

SE – status epilepticus

SNC – sistema nervoso central

SRS – crises espontâneas recorrentes

VMH – neurônios ventromediais hipotalâmicos

1. INTRODUÇÃO

1.1 Corpos cetônicos

Os corpos cetônicos são gerados a partir de ácidos graxos de cadeia longa presentes no sangue, os quais são catabolizados nas mitocôndrias dos hepatócitos por β -oxidação. A degradação desses ácidos graxos gera altas concentrações de acetil-CoA intracelular, um metabólito chave incapaz de sair da célula. Entretanto, esta situação normalmente é burlada pela ativação da via cetogênica, onde o acetil-CoA é convertido a corpos cetônicos (acetona, acetoacetato e β -hidroxibutirato), que podem retornar ao sangue por difusão (Cullingford, 2004; Pan et al., 2001). Acredita-se que a interconversão entre acetoacetato e β -hidroxibutirato (BHB) seja rápida (Hawkins et al., 1986) e que a razão de acetoacetato:BHB no plasma humano após um período de 3 dias de jejum seja de aproximadamente 1:3 (Balasse et al., 1978).

Uma variedade de hormônios, sujeitos a mudanças na concentração sangüínea em resposta à qualidade e à quantidade de dieta, exerce potentes ações na cetogênese hepática. Estes hormônios incluem a insulina e o glucagon, que inibem e estimulam a cetogênese, respectivamente, em resposta a mudanças nos níveis de glicose sangüínea, bem como os glicocorticóides secretados pelo córtex da adrenal, que estimulam a cetogênese em resposta ao aumento do estresse. No estado alimentado, a cetogênese a partir de ácidos graxos é muito baixa, resultado de níveis sangüíneos de insulina relativamente altos, em contrapartida aos níveis sangüíneos de glucagon e cortisol, que se apresentam baixos. Por outro lado, sob condições de jejum ou dieta cetogênica, esta relação se inverte, promovendo cetogênese hepática (Cullingford, 2004).

O metabolismo dos corpos cetônicos no cérebro é regulado pela permeabilidade da barreira cérebro-sangue, que depende da abundância de transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs). Os MCTs estão presentes nas membranas plasmáticas de neurônios e glia, mas seu papel na regulação do metabolismo de corpos cetônicos é incerto (Morris, 2005).

Evidências indicam que o cérebro utiliza corpos cetônicos como substratos energéticos alternativos sob diversas condições fisiológicas, incluindo jejum e dietas ricas em lipídeos (Robinson & Williamson, 1980; Balasse & Fery 1985). Pan e colaboradores (2000) têm mostrado que após 2 e 3 dias de jejum, quando os níveis plasmáticos de BHB alcançam aproximadamente 1,7 e 3 mM, respectivamente, o nível de BHB no cérebro humano também aumenta, atingindo cerca de 0,6 e 1 mM, respectivamente.

1.2 Dieta Cetogênica

O nome dieta cetogênica (KD) deriva de sua capacidade de causar aumento substancial nos níveis de corpos cetônicos no sangue. É uma dieta rica em lipídeos e pobre em carboidratos, que tem sido usada como alternativa terapêutica para crises convulsivas de difícil controle em crianças (Prasad et al, 1996; Swink et al, 1997; Wheless, 1995).

A KD tem origem datando de tempos bíblicos. No registro histórico, pode-se encontrar uma referência ao jejum como uma terapia para epilepsia no Novo Testamento: São Marcos 9:14-29. Foi no século V a.C. quando Hipócrates utilizou o jejum como um tratamento específico para epilepsia. Em 1921, Wilder introduziu uma dieta rica em lipídeos e com baixa concentração de carboidratos e proteínas para induzir

os efeitos metabólicos do jejum como um tratamento para a epilepsia. O desenvolvimento de efetivas drogas anticonvulsivantes (AEDs) na década de 30, entretanto, proporcionou um meio mais tranquilo de controle das convulsões do que a disciplina do tratamento com KD (Merritt e Putnam, 1938).

Das crianças mantidas na dieta por ao menos 1 ano, 40-50% mostraram mais de 50% de redução na frequência das crises convulsivas. Dessas crianças que apresentaram marcante melhora, 7-10% tornaram-se livres das convulsões (Freeman et al, 1998; Vining et al, 1998) e o êxito não pareceu estar restrito a tipos particulares de crises convulsivas (Schwartz et al, 1989; Vining et al, 1998; Freeman et al, 1998).

Apesar do sucesso clínico do tratamento com KD, suas ações permanecem inexploradas. Diversos estudos têm descrito o papel anticonvulsivante desta dieta em camundongos (Millichap et al, 1964; Uhlemann e Neims, 1972, Otani et al, 1984; Nakazawa et al, 1983; Rho et al, 1999) e em ratos (Appleton e DeVivo, 1974; DeVivo et al, 1978; Mahoney et al, 1983; Hori et al, 1997; Muller-Schwarze et al, 1999), mas variações na dieta, idade, linhagem e protocolo têm rendido difíceis comparações. Bough e colaboradores (1999) mostraram que ratos que iniciaram o tratamento com KD aos 22 dias de idade apresentaram maiores níveis de BHB, bem como maior resistência às crises convulsivas, quando comparados a ratos mais velhos. Esses fatos sugerem que a idade é inversamente proporcional ao limiar de convulsão. Além disso, o exato mecanismo de ação da KD permanece desconhecido. O que se sabe, é que a produção de corpos cetônicos é induzida nas primeiras 24 horas e atinge um platô em 7-30 dias (Freeman & Kelly, 1994; Lefevre e Aronson, 2000; Phelps et al, 1998).

Um dos possíveis mecanismos para a ação da KD envolve um aumento no ácido gama-aminobutírico (GABA, um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central) (Daikhin e Yudkoff, 1998). Altas concentrações de corpos cetônicos podem aumentar o

conteúdo sinaptossomal de GABA *in vitro* (Erecinska et al, 1996). Elevadas concentrações de GABA têm sido relatadas no hipocampo dorsal de camundongos (Rho et al, 1999) e em homogenato cerebral de camundongos alimentados com KD (Yudkoff et al, 2001). Entretanto, Al-Mudallal e colaboradores (1996) não encontraram alterações nos níveis de GABA no córtex cerebral de ratos que ingeriram KD. Estruturalmente, os corpos cetônicos são semelhantes ao GABA e poderiam ter um papel inibitório direto na excitabilidade celular, através da estimulação dos receptores de GABA ou aumento da ação destes receptores (Ge & Niesen, 1998; Niesen & Ge, 1998). Além disso, os efeitos potenciais de modificação no conteúdo de água e eletrólitos têm sido indicados como mediadores antiepiléticos (Phelps et al, 1998), bem como uma diminuição da quantidade de Na^+ , K^+ e Mg^{+2} , com um elevado *turnover* de Ca^{+2} . Entretanto, ainda é incerto que essas alterações iônicas ocorram no sistema nervoso central e não foi demonstrado que há efeito definido nas concentrações no tecido cerebral destas alterações iônicas plasmáticas (DiMario e Holland, 2002).

Tieu e colaboradores (2003) demonstraram que o BHB protege neurônios dopaminérgicos em um modelo de doença de Parkinson em camundongos. Estudos em cultura de células também têm mostrado que BHB protege neurônios em modelos de Parkinson e Alzheimer (Kashiwaya et al, 2000), bem como em situações de hipóxia (Masuda et al, 2005). Considerando que o número de astrócitos em relação ao de neurônios está na proporção de 9:1 e que ocupam a metade do volume do cérebro, é notável que os astrócitos, assim como as células hepáticas, possam produzir grandes quantidades de corpos cetônicos. Tem sido proposto que os astrócitos poderiam suprir os neurônios com corpos cetônicos e, por isso, exercer efeito neuroprotetor (Guzmán & Blázquez, 2001).

Enquanto a KD tem sido extensivamente estudada, particularmente como uma terapia antiepilética, a atividade direta dos corpos cetônicos na atividade elétrica neuronal ainda permanece pouco documentada. Estudando neurônios ventromediais hipotalâmicos (VMH), Minami e colaboradores (1990) encontraram que BHB facilitou significativamente o disparo dos neurônios VMH, de forma dose-dependente. Por outro lado, Thio e colaboradores (2000) viram que o BHB não altera a transmissão sináptica em neurônios hipocâmpais de ratos. Entretanto, como reconhecido pelos autores, estes resultados negativos poderiam refletir uma insuficiência nos métodos, tecidos e/ou neurotransmissores selecionados.

1.3 Modelo do Lítio-Pilocarpina

O modelo do lítio-pilocarpina reproduz a maioria das características clínicas, temporais e neuropatológicas da epilepsia de lobo temporal humana (Turski et al, 1989; Cavalheiro, 1995; Dubé et al, 2001a,b; Rigoulot et al, 2004). Em ratos adultos, a injeção sistêmica de pilocarpina associada ao lítio leva a crises convulsivas parciais e *status epilepticus* (SE). Esta fase aguda é seguida de uma fase latente livre de convulsões, que precede a expressão de crises espontâneas recorrentes (SRS) (Cavalheiro, 1995; Dubé et al, 2001a,b; Rigoulot et al, 2004).

A administração sistêmica de uma alta dose de pilocarpina (300-380 mg/Kg) leva a uma excessiva estimulação colinérgica no cérebro, manifestada como alteração na atividade eletroencefalográfica (EEG), dano celular e convulsões (Cavalheiro et al, 1987; Turski et al, 1989). Tem sido mostrado que o pré-tratamento com lítio potencia a atividade convulsivante induzida por pilocarpina (Honchar et al, 1983).

O lítio é conhecido por influenciar na função cerebral, ao menos em parte, pela interferência com o metabolismo do fosfoinositol. Este efeito poderia ser esperado devido ao desacoplamento da produção de segundos mensageiros da ação da interação transmissor-receptor. Concentrações terapêuticas do lítio (1 mM) inibe o inositol monofosfato (IP₁), resultando em concentrações aumentadas de IP₁ no cérebro de ratos, *in vitro* e *in vivo* (Sherman et al, 1986).

O pré-tratamento com lítio resulta em uma potencialização das convulsões induzidas por pilocarpina, em aproximadamente 20 vezes (Morrison et al, 1971; Clifford et al, 1987; Persinger et al, 1988). Foi proposto que o lítio poderia influenciar diretamente a transmissão colinérgica através do aumento da liberação de acetilcolina (Jope, 1979), modificando a ligação ao receptor muscarínico (Hruska et al, 1984), ou pela alteração do sistema do segundo mensageiro fosfolípídeo inositol (Casebolt & Jope, 1989; Whitworth et al, 1989). Alternativamente, o lítio poderia potencializar os efeitos da pilocarpina, afetando a transmissão de dopamina. Na realidade, foi demonstrado que o lítio aumenta a afinidade dos receptores dopaminérgicos D₁ (Gottberg et al, 1989a) e altera o *turnover* de dopamina no cérebro (Otero et al, 1985; Gottberg et al, 1989b), aumentando a suscetibilidade aos efeitos pró-convulsivantes da estimulação dos receptores D₁. Além disso, interações do lítio com neurolépticos têm sido atribuídas ao envolvimento com receptores D₂. Estes dados não são conclusivos e, enquanto alguns trabalhos têm mostrado uma diminuição (Wajda et al, 1981; Kozlowiski et al, 1983), outros observaram um aumento na densidade dos receptores D₂ (Carvey et al, 1990).

As conseqüências do SE são dependentes da idade (Cavalheiro et al, 1987; Dubé et al, 2000, 2001a; Priel et al, 1996). Nos 18-24 dias (P18 e P24) dos ratos, o SE resulta em menor perda neuronal do que em ratos adultos e somente uma parte dos ratos (30-

70%) desenvolve SE após uma fase silenciosa, que dura cerca de 37 dias no modelo da pilocarpina (Cavalheiro et al, 1987; Priel et al, 1996) e 74 dias no modelo lítio-pilocarpina (Dubé et al, 2000, 2001a). Nas idades P7-P11 o SE induzido por pilocarpina não acarretou em perda neuronal e nenhum rato desenvolveu epilepsia (Cavalheiro et al, 1987; Dubé et al, 2000, 2001b; Priel et al, 1996). Neste modelo, o dano neuronal foi registrado no tálamo em ratos P12 (Kubova et al, 2001) e na região CA1 do hipocampo nos ratos P14-P15 (Sankar et al, 1998).

1.4 Sistema Purinérgico

1.4.1 Transmissão Purinérgica

Holton & Holton (1954) e Holton (1959) apresentaram, pela primeira vez, o ATP como neurotransmissor, mostrando, através de estudos, sua liberação a partir de nervos sensoriais. Em 1972, Burnstock propôs pela primeira vez que, além da transmissão colinérgica e noradrenérgica, existe no sistema nervoso autônomo a transmissão purinérgica, onde o ATP é o principal neurotransmissor. Além disso, o ATP é co-liberado com diversos neurotransmissores em neurônios do sistema nervoso central e periférico, agindo como um rápido neurotransmissor (Burnstock, 1999).

O mecanismo exato de liberação do ATP permanece pouco claro, apesar de diversas investigações (Bodin e Burnstock, 2001). Há vários argumentos provando que o ATP armazenado em vesículas sinápticas é liberado como um co-transmissor de terminais nervosos por excitação, juntamente com outros neurotransmissores, como a acetilcolina e noradrenalina, por exemplo (Zimmermann, 1994; Burnstock, 1996).

Uma vez liberados, os nucleotídeos interagem com receptores específicos e finalmente são hidrolisados por ecto-enzimas até os seus respectivos nucleosídeos (Grobber et al, 1999; Zimmerman, 1994). Os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina podem exercer seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos subdivididos em dois grandes grupos: P₁ e P₂. Os purinorreceptores do tipo P₁ são mais eficientemente ativados por adenosina, enquanto que os P₂, por ATP, principalmente (Burnstock, 1978; Ralevic & Burnstock, 1998).

Os receptores P₁ (metabotrópicos: acoplados à proteína-G) são divididos em quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, que têm sido caracterizados de acordo com suas seqüências primárias e suas propriedades bioquímicas e farmacológicas (Abbracchio et al, 1994; Fredholm et al, 2001). As principais vias de sinalização intracelular envolvem a formação de AMPc, com receptores A₁ e A₃ causando inibição da adenilato ciclase, e receptores A_{2A} e A_{2B} ativando-a (Fredholm et al, 1998; Impagnatiello et al, 2000; Olah & Stiles, 2000). O perfil e a distribuição dos receptores de adenosina no sistema nervoso central estão mostrados na Tabela 1.

Os receptores P₂ são divididos em duas classes: P_{2X}, ligados a canais iônicos; e P_{2Y}, acoplados à proteína-G (Abbracchio et al, 1994). A subclasse P_{2X} possui sete subtipos clonados e caracterizados farmacologicamente (P_{2X1-7}) e todos eles atuam como canais ionotrópicos. A família dos receptores P_{2Y} se caracteriza por ser metabotrópica, sendo acoplados a uma proteína G. Esta família compreende os receptores P_{2Y1,2,4,6,11,12,13}, clonados a partir de mamíferos, e o receptor da UDP-glicose, agora renomeado P_{2Y14} (Ralevic & Burnstock, 1998, Abbracchio et al, 2003).

Tabela 1. Características dos receptores de adenosina e distribuição no SNC. Adaptado de Wardas (2002).

Subtipo de receptor	Distribuição no SNC	Agonistas seletivos	Antagonistas seletivos
A1	Córtex, hipocampo, estriado, tálamo, cerebelo	CPA CCPA CHA R-PIA	DPCPX CPT
A2A	Estriado, núcleo accumbens, tubérculo olfatório, globus pallidus, córtex, hipocampo	CGS 21680 2-HE-NECA	SCH 58261 KF 17837 KW 6002 ZM 241385, CSC
A2B	Baixo nível no hipocampo, tálamo, hipotálamo, estriado	Não disponível	Não disponível
A3	Baixo nível no hipocampo, tálamo, córtex, cerebelo	2-C1-IB-ECA	MRS 1220 MRE 3008F20

1.4.2 A família das Ecto-Nucleotidasas

Após a liberação no meio extracelular e a ativação dos receptores específicos, os nucleotídeos da adenina podem ser hidrolisados, através de sucessivas reações, por ectoenzimas que fazem a conversão destes nucleotídeos até adenosina. Esta via constitui uma cascata enzimática altamente eficiente e hábil em controlar a concentração e o tempo em que essas moléculas sinalizadoras permanecem no espaço extracelular (Figura 1) (Zimmermann, 1996; Zimmermann, 2001).

Trabalhos recentes têm demonstrado que a “via das ectonucleotidasas” inclui a família das E-NTPDases e a família da ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs). Os nucleosídeo-5'-monofosfatos formados estão sujeitos à hidrólise pela ação da ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT) e também pela ecto-fosfatase alcalina (Zimmermann, 2001) (Figura 2).

1.4.3 Família das E-NTPDases

Os membros da família E-NTPDase, previamente classificados como E-ATPases, constituem uma classe de ectoenzimas ancoradas à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos, com o sítio ativo voltado para o meio extracelular. Essas enzimas são caracterizadas pela sua capacidade em hidrolisar nucleotídeos tri- e difosfatados, dependência de cátions divalentes, como Ca^{+2} e Mg^{+2} , para exercer atividade catalítica, insensibilidade a inibidores clássicos de P-, F- e V-ATPases e presença de cinco regiões altamente conservadas, denominadas de “regiões conservadas da apirase” (ACR) (Plesner, 1995). Em mamíferos, já foram clonados e classificados

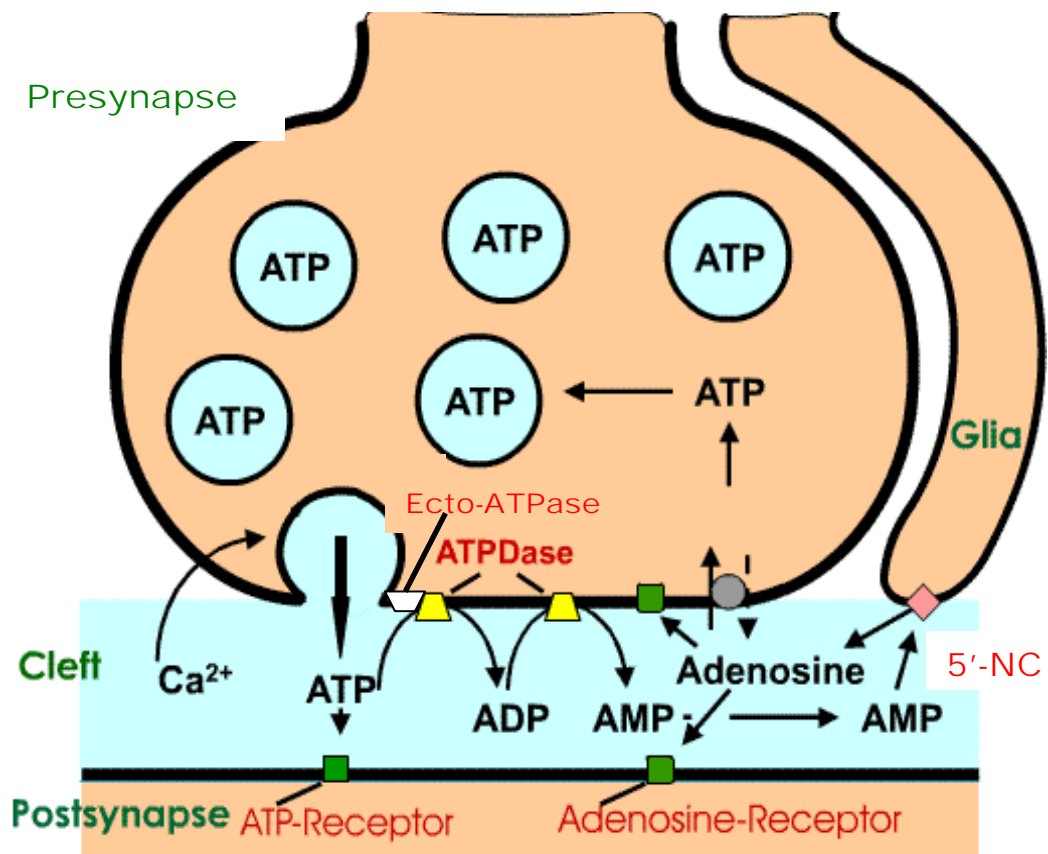


Figura 1. Funções do ATP liberado no terminal nervoso e sua completa hidrólise até adenosina no espaço extracelular.

Retirado de www.biozentrum.uni-frankfurt.de/prof/zimmermann.

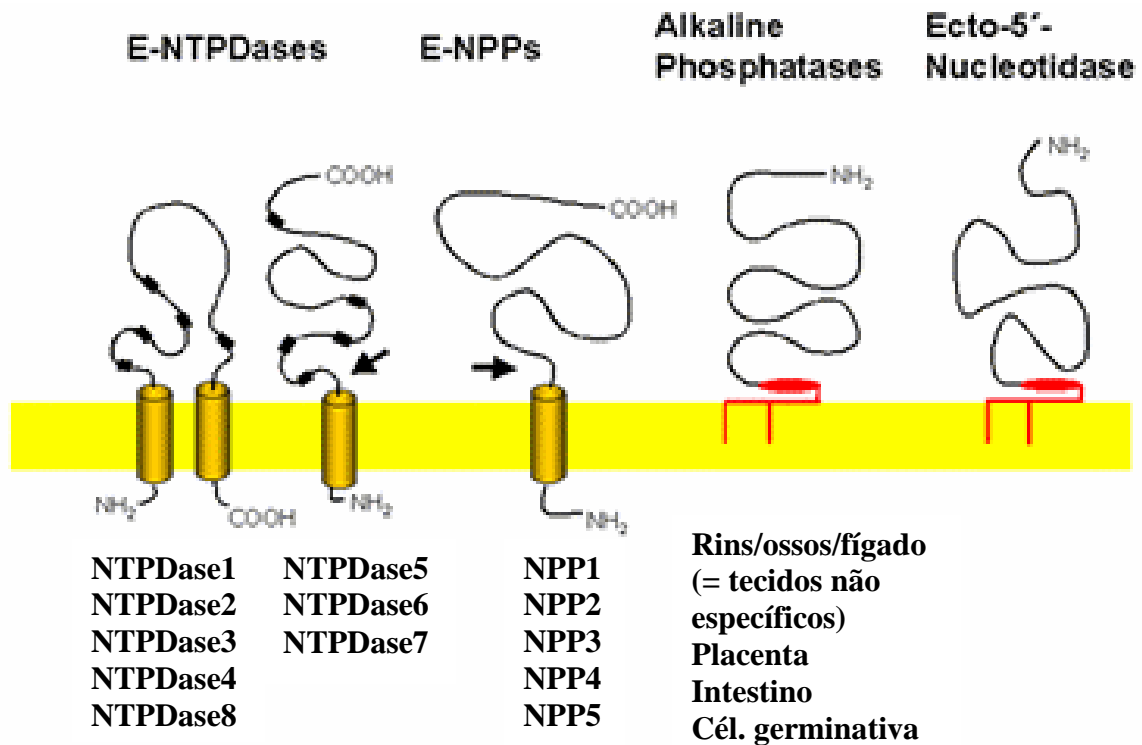


Figura 2: Topografia de membrana de ecto-nucleotidasas. As NTPDases de 1 a 4 e a NTPDase 8 estão ligadas a membrana plasmática por dois domínios transmembrana, N e C-terminal. As NTPDases 5 a 7 não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas ao próprio domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel liberada (seta). Esta clivagem também pode ocorrer na família das E-NPPs (seta). A ecto-5'-nucleotidase está ancorada à membrana plasmática por uma molécula de glicosilfosfatidilinositol, a qual também pode sofrer clivagem, resultando em uma enzima solúvel. Os quadros escuros na seqüência das E-NTPDases representam as regiões conservadas da apirase. Adaptado de Zimmermann (2001).

oito membros dessa família de ecto-enzimas, nomeados NTPDases1-8, os quais apresentam diversidade de preferência por substrato e distribuição tecidual (Tabela 2).

Tem sido identificado que a ecto-apirase/CD39 (NTPDase 1) é expressa em sinaptossomas isolados, bem como em cultura de neurônios primários de córtex cerebral e astrócitos (Battastini et al, 1991; Wang et al, 1997). Estudos imunoistoquímicos têm demonstrado que essa enzima é amplamente distribuída no cérebro de ratos, encontrando-se presente em neurônios de córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, células gliais e células endotelais (Wang & Guidotti, 1998).

Alguns estudos sobre as atividades nucleotídicas têm sido relacionados com a ontogenia. Em 1990, Müller e colaboradores demonstraram que, em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos, as atividades de hidrólise de ATP e ADP da ecto-apirase aumentam gradualmente com a idade do animal. Outro estudo demonstrou que, em frações de membrana sinápticas de hipocampo e núcleo caudato, uma ecto-ATPase possui sua maior ativação em 30 dias de vida (período importante na formação das sinapses funcionais) e em 365 dias (período de perda neuronal) (Banjac et al., 2001). Estes estudos evidenciam que as ecto-nucleotidasas podem exercer um papel importante nos processos de desenvolvimento cerebral e no envelhecimento.

Alguns estudos relacionam as ecto-nucleotidasas e a epilepsia. Foi demonstrada uma significativa diminuição na atividade ecto-ATPásica em córtex temporal de indivíduos epiléticos. Entretanto, um substancial aumento desta atividade foi observado na porção posterior do hipocampo destes pacientes (Nagy et al, 1990). Ottman e colaboradores, em 1995, demonstraram que o gene para CD39 está co-localizado com o gene envolvido na epilepsia parcial humana. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que as atividades enzimáticas da ATP-difosfoidrolase (possivelmente

Tabela 2. Nomenclatura e preferência de substratos dos membros da família E-NTPDase em vertebrados.

Nome Atual	Nomes previamente usados	Preferência de substrato
NTPDase1	CD39, ecto-ATP difosfoidrolase, ecto-apirase, ecto-ATPDase	ATP=ADP (1:1)*
NTPDase2	CD39L1, ecto-ATPase	ATP >>>>ADP (30:1)*
NTPDase3	CD39L3, HB6	ATP>ADP (3:1)*
NTPDase4	UDPase (hLALP70v), hLALP70	UDP>GDP,CDP
NTPDase5	CD39L4, ER-UDPase	UDP>GDP,IDP>>>ADP, CDP
NTPDase6	CD39L2	GDP>IDP>>UDP,CDP>>ADP
NTPDase7	LALP1	UTP, GTP, CTP
NTPDase8		ATP>ADP (2:1)*

As NTPDases de 1 a 4 e 8 são ligadas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana, N e C-terminal. NTPDase 5 e NTPDase 6 não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas próximo ao domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel liberada. As NTPDases de 4 a 7 são localizadas intracelularmente.

Adaptado a partir de Zimmermann (2001). * Razão de hidrólise NTP:NDP. As NTPDases de 1 a 3 hidrolisam todos os outros nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, similarmente ao ATP e ADP.

ecto-apirase/CD39) e da ecto-5'-nucleotidase estão aumentadas significativamente durante as fases silenciosa e crônica dos modelos animais de epilepsia induzidos por pilocarpina e ácido caínico (Bonan et al, 2000a) e do modelo de kindling induzido por pentilenotetrazol (PTZ) (Bonan et al, 2000b). Além disso, Bruno e colaboradores (2002, 2003) também demonstraram que as NTPDases estão alteradas no soro sanguíneo de ratos submetidos ao modelo de PTZ agudo e no abrasamento (“kindling”) com PTZ.

1.4.4 5'-nucleotidase

A ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) é uma enzima que está ancorada à membrana plasmática através de uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI), com peso molecular aparente de 62 a 74 kDa e que possui forma estrutural de dímero com pontes dissulfeto entre as cadeias (Zimmermann 1992, 1996, 2001). O ancoramento por GPI pode ser clivado pela ação de um fosfolipase C específica dando origem a formas solúveis desta enzima (Zimmermann, 1992).

O sítio catalítico é voltado para o meio extracelular, a atividade hidrolítica é potencializada por cátions divalentes e inibida por ADP, ATP e 5'- α,β - metileno-difosfato. Sete subtipos de 5'-nucleotidases foram clonados, sendo seis delas de localização intracelular e uma localizada na membrana plasmática (Tabela 3) (Bianchi e Spychala, 2003). Geralmente o AMP é o nucleotídeo hidrolisado com mais eficiência pela ecto-5'-NT, podendo hidrolisar também CMP, UMP, IMP, GMP, até seus respectivos nucleosídeos. A ecto-5'NT é a enzima chave na via de degradação dos nucleotídeos e a principal fonte enzimática de adenosina no meio extracelular. Uma forma solúvel desta enzima, potencialmente liberada por ação de uma fosfolipase C fosfatidilinositol

específica, tem sido descrita. A ecto-5'-NT é amplamente expressa em vários tipos de células, sob condições fisiológicas ou patológicas (Zimmermann, 1992, 1996).

No SNC, a ecto-5'-NT está predominantemente associada à glia, mas várias evidências têm demonstrado que essa atividade também está associada a neurônios (Zimmermann et al, 1998; Zimmermann, 1996, 2001). A ecto-5'-nucleotidase é transitoriamente expressa na superfície de células neuronais e nas sinapses durante o desenvolvimento sináptico (Schoen & Kreutzberg, 1994; Braun et al, 1995). Foi demonstrado que, em várias regiões cerebrais, a atividade desta enzima se mostra crescente a medida que o animal envelhece (Fuchs, 1991). A ecto-5'-NT desempenha um papel importante na diferenciação neurítica e na sobrevivência de células PC12 e células granulares de cerebelo de rato em cultura (Heilbronn et al, 1995; Heilbronn & Zimmermann, 1995). Sua atividade encontra-se aumentada em astrócitos, células microgliais (Braun et al, 1997) e em sinaptossomas de hipocampo após isquemia focal e reperfusão (Schetinger et al, 1998). Além disso, estudos têm demonstrado que a ecto-5'-NT/CD73, tem características de uma molécula de adesão (Airas et al, 1995).

Tabela 3. Subtipos da família das 5'-nucleotidases

Subtipo	Nomenclatura da proteína
Ecto-5'-nucleotidase	Ecto-5'-NT; eNT; CD73
5'-nucleotidase citosólica IA	AMP-específica 5'-NT; cN-I
5'-nucleotidase citosólica IB	cN-IA homólogo
5'-nucleotidase citosólica II	purina 5'-NT; IMP-específica 5'-NT
5'-nucleotidase citosólica III	PN-I; P5'N-1
5'-(3')-deoxinucleotidase citosólica	dNT-1; PN-II
5'-(3')-deoxinucleotidase mitocondrial	dNT-2

Adaptado a partir de Bianchi e Spychala (2003).

1.4.5 NTPDases no soro sanguíneo

A hidrólise dos nucleotídeos da adenina que circulam no sangue para formar adenosina tem sido associada à presença da NTPDase 1 (ecto-apirase, CD39), expressa na superfície das células endoteliais (Marcus *et al.* 1997). Além desta enzima associada às células, enzimas solúveis capazes de hidrolisar nucleotídeos também têm sido identificadas no sangue (Yegutkin, 1997; Yegutkin *et al.*, 2003). Desta maneira, provavelmente, as atividades ATPásica e ADPásica estudadas no soro sanguíneo são devidas à presença das ecto-NTPDases5 e/ou ecto-NTPDase6, potencialmente liberadas em formas solúveis. Entretanto, até o momento, não é possível descartar completamente a participação de outras atividades capazes de hidrolisar o ATP e o ADP, tais como as enzimas da família das ecto-5'-nucleotídeo fosfodiesterases (E-NPP), acima descritas (Zimmermann, 2001; Torres *et al.* 2002; Oses *et al.*, 2004) bem como as ecto-fosfatase alcalinas (Zimmermann, 2001).

1.4.6 Família E-NPP (NPP1 à NPP3)

A família das ecto-5'-nucleotídeo fosfodiesterases (E-NPP) são capazes de hidrolisar 3',5'- AMPc para AMP; ATP a AMP e PPi; ADP a AMP e Pi e nicotinamida adenina dinucleotídeo a AMP e nicotinamida mononucleotídeo. A relevância fisiológica dessas enzimas e seus substratos em vários tecidos e a localização celular necessitam ser melhor definidos. Entretanto, há um aumento de evidências indicando que os membros dessa família podem modular a sinalização mediada pelos receptores P₂ (Grobber *et al.*, 2000).

1.4.7 Adenosina

Adenosina está presente em todos tecidos de mamíferos, onde modula uma variedade de importantes processos fisiológicos, podendo ser formada nos espaços intra e extracelular. Entretanto, a adenosina não é considerada um neurotransmissor, pois não há indícios de que é armazenada em vesículas sinápticas (Brundege & Dunwiddie, 1997). Apesar disso, a adenosina está presente no espaço extracelular e é formada por diversos tipos de estímulos.

Existem duas principais vias de formação de adenosina no meio intracelular: a clivagem da S-adenosil-homocisteína pela enzima S-adenosil-homocisteína-hidrolase (Patel & Tudball, 1986) e a degradação de AMP a adenosina por ação de uma 5'-nucleotidase citosólica. Após sua formação, a adenosina pode passar através da membrana celular por difusão facilitada, utilizando transportadores de nucleosídeos. Estes transportadores são bidirecionais e equilibram as concentrações intra e extracelular de adenosina. Além disso, seus níveis intracelulares podem ser controlados por vias que metabolizam a adenosina dentro da célula: a fosforilação até 5'-AMP, catalisada por uma adenosina quinase e a desaminação até inosina, catalisada pela adenosina deaminase (Brundege & Dunwiddie, 1997). Adenosina extracelular também pode ser formada a partir de nucleotídeos liberados para o espaço extracelular e degradados até adenosina pela via das ecto-nucleotidases (Dunwiddie & Masino, 2001).

Diversas evidências indicam que a adenosina pode ser um agente neuroprotetor endógeno no SNC, uma vez que ela impede o dano causado pela isquemia, excitotoxicidade ou crises epiléticas (De Mendonça et al, 2000; Ongini & Schubert, 1998; Rudolphi et al, 1992; Von Lubitz, 1999). Uma baixa concentração (nanomolar) de adenosina normalmente está presente no fluido extracelular no SNC, mas aumenta

consideravelmente após hipóxia ou isquemia (níveis micromolares). Assim, agentes que elevem os níveis endógenos de adenosina por inibir sua degradação ou impedir seu transporte podem fornecer proteção contra dano isquêmico ou excitotoxicidade neuronal (Figura 3) (De Mendonça et al, 2000; Ongini & Schubert, 1998; Rudolphi et al, 1992).

Através da evolução dos estudos sobre o papel da adenosina no sistema nervoso central, evidências levaram à hipótese de seu envolvimento na epilepsia, sendo apontada como anticonvulsivante endógeno (Dragunow, 1988; During & Spencer, 1992). Entretanto, os mecanismos pelos quais a adenosina é liberada e as conseqüências bioquímicas e fisiológicas da ação modulatória desse nucleosídeo necessitam ser melhor elucidadas. Diversos estudos relacionam a adenosina e seus receptores com a epilepsia. Foi demonstrado que em pacientes com epilepsia de lobo temporal, os níveis de adenosina mostraram-se 30 vezes maiores do que em pacientes do grupo controle (During & Spencer, 1992). Além disso, também foi observado um aumento no número de receptores A₁ em neocórtex de pacientes com epilepsia de lobo temporal (Angelatou et al., 1993). Estudos mostraram que, em preparações de fatias hipocâmpais, análogos de adenosina possuem efeito anticonvulsivante e que esses efeitos são mediados pelo receptor A₁ (Young & Dragunow, 1994). Outros estudos evidenciaram um aumento significativo do número de receptores A₁ em córtex, hipocampo e cerebelo de ratos com crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol (Angelatou et al, 1990). Evidências sugerem que uma diminuição significativa nos níveis de adenosina ou alterações no sistema adenosinérgico pode desempenhar um papel fundamental na etiologia do estado epiléptico (Young & Dragunow, 1994).

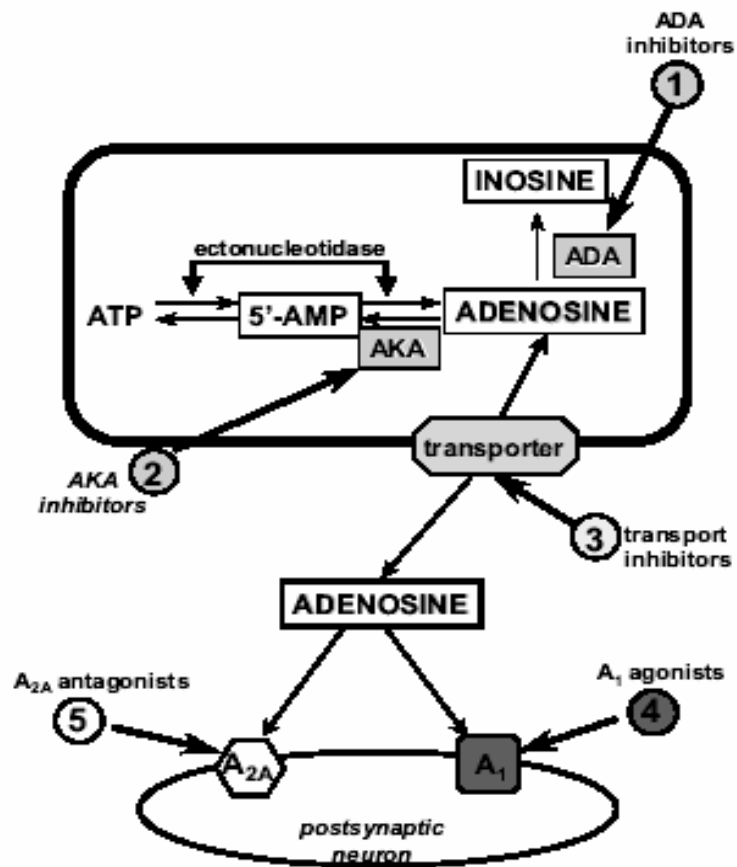


Figura 3. Principais mecanismos pelos quais os componentes podem fornecer neuroproteção por modulação da transmissão de adenosina. A₁ – receptor de adenosina do tipo A₁; A_{2A} – receptor de adenosina do tipo A_{2A}; ADA – adenosina deaminase; AKA – adenosina cinase; 5'-AMP – adenosina monofosfato.

Retirado de Wardas (2002).

Sabe-se pouco sobre o papel dos receptores A_{2A} na neuroproteção e alguns estudos mostram efeitos contraditórios. No entanto, alguns dados indicam que a estimulação dos receptores A_{2A} pelo agonista seletivo CGS21680 reduz o dano isquêmico ou o dano hipocampal excitotóxico (Jones et al, 1998; Sheardown & Knutsen, 1996). Além disso, tem sido sugerido que essas propriedades podem ser devido aos efeitos na periferia ao invés de diretamente nos sítios neuronais (De Mendonça et al, 2000; Ongini et al, 1997; Ongini & Schubert, 1998).

Evidência funcional indica que receptores A_1 e A_{2A} podem coexistir nos mesmos terminais nervosos (De Mendonça et al, 2000; Sebastião e Ribeiro, 2000). Tem sido mostrado que a estimulação de receptores A_{2A} diminui a ligação aos receptores A_1 em sinaptossomas hipocampal e estriatal, bem como atenua a capacidade dos agonistas do receptores A_1 em inibir a excitabilidade e a transmissão sináptica no hipocampo (De Mendonça et al, 2000; Sebastião e Ribeiro, 2000). Assim, em geral, a ativação dos receptores A_{2A} leva a uma diminuição dos efeitos mediados pelos receptores A_1 . Essa interação funcional entre estes dois subtipos de receptores de adenosina parece sugerir que a ação da adenosina endógena, mediada por receptores A_1 , pode ser atenuada se ocorrer a ativação concomitante dos receptores A_{2A} . Portanto, tem sido sugerido que o efeito benéfico dos antagonistas seletivos dos receptores A_{2A} poderia ser, ao menos em parte, devido à atenuação na inibição tônica sobre receptores A_1 (De Mendonça et al, 2000; Ongini & Schubert, 1998).

Recentemente, diversos novos compostos agindo seletivamente em receptores A_3 estão tornando-se disponíveis. Entretanto, os resultados dos poucos estudos sobre o papel dos receptores A_3 na neuroproteção são bastante contraditórios (Abbracchio et al, 1998). Parece que, dependendo das condições experimentais, que não foram bem definidas ainda, a estimulação dos receptores A_3 exerce efeitos protetores e

neurotóxicos. Entretanto, é notável que agonistas de receptores A₃ possam também ativar receptores A₁ (De Mendonça et al, 2000). De acordo com essa suposição, alguns efeitos da estimulação dos receptores A₃ por CI-IB-MECA podem ser bloqueados pelo antagonista seletivo do receptor A₁, DPCPX (Mendonça et al, 2000). Além disso, a estimulação dos receptores A₃ por CI-IB-MECA atenua a inibição da transmissão sináptica em fatias hipocâmpais, mediada pelo receptor A₁ (Dunwiddie, et al, 1997). Portanto, especula-se que os efeitos deletérios dos agonistas de receptores A₃ podem ser devidos, ao menos em parte, à atenuação dos efeitos benéficos da ativação do receptor A₁ em situações de hipóxia ou isquemia (Wardas, 2002).

1.5 Enzimas séricas e doenças hepáticas

Idade e sexo são os maiores fatores da variação fisiológica sérica da 5'-NT em ratos. A atividade sérica da 5'-NT em fêmeas é maior quando comparada com a atividade sérica em ratos machos e começa a aumentar em torno da quinta e sexta semanas de vida (Carakostas et al. 1990). A atividade específica da 5'-NT no soro sanguíneo de ratos velhos é menor que em ratos jovens, embora o valor do Km permaneça estável (Egutkin et al. 1990). Entretanto, Pappo e colaboradores (1969) mostraram que, em humanos, a atividade sérica da 5'-NT não varia com a idade, icterícia, ou sexo. Por outro lado, alguns trabalhos mostram que um aumento na atividade da 5'-NT foi específico para distúrbios no fígado e árvore biliar (Hill & Sammons 1967, Song & Kappas 1969), exceto em casos de tumores ou metastases (Sunderman 1990, Lal et al. 1989, Chatterjee et al. 1981, Dao et al. 1980, Reddi 1980, Ip & Dao 1978).

Dixon e Purdom (1954) foram os primeiros a observar que a 5'-NT sérica pode ser clinicamente usada para diferenciar entre o diagnóstico de doenças hepatobiliares e ósseas. No diagnóstico de doença hepática, a fosfatase alcalina (FAL) e a γ -glutamil transferase (GGT) possuem uma boa sensibilidade, mas não são específicas (Reichling & Kaplan 1988). Nos casos de aumento isolado nas atividades de FAL e GGT, a medida da 5'-NT pode ajudar no diagnóstico de doença hepática (Reichling & Kaplan 1988).

Em pacientes com aumento sérico na atividade da 5'-NT e com FAL hepática normal existe uma alta probabilidade de presença de doença hepática, confirmando que um aumento na atividade da 5'-NT é bastante específico no diagnóstico de patologias hepatobiliares (Pagani & Panteghini 2001). O motivo para esta especificidade não é bem conhecido, mas pode estar relacionado com a localização da 5'-NT nas membranas intracelulares. Detergentes como ácidos biliares podem ser necessários para a solubilização da enzima e concentrações necessárias para que isso aconteça podem ocorrer somente na doença hepática (Reichling & Kaplan 1988). Entretanto, esta explicação não é válida nos casos de elevação da 5'-NT em pacientes com câncer sem envolvimento hepático.

Uma análise da variação sérica, em ratos normais, das atividades da 5'-NT, FAL e GGT sugerem várias vantagens para 5'-NT no prognóstico de lesões biliares em ratos (Carakostas et al. 1990). Nesses animais com obstrução experimental do ducto biliar, concentrações de ácidos biliares rapidamente chegam a níveis que podem romper as membranas plasmáticas e solubilizar FAL e 5'-NT. Entretanto, a resposta à ligação do ducto biliar em ratos, da 5'-NT no soro e fígado difere da FAL. Em contraposição à FAL, a 5'-NT hepática não aumenta em algumas horas após a obstrução biliar, mas somente vários dias de colestase. Além disso, a prévia inibição da síntese protéica não

inibe a elevação da 5'-NT sérica causada pela ligação do ducto biliar. Para a elevação da FAL hepática é necessário que ocorra nova síntese protéica (Reichling & Kaplan 1988).

Além disso, há diversos trabalhos envolvendo as aminotransferases em lesões hepáticas. Estudos têm sugerido que o grau de aumento das aminotransferases, bem como a razão entre alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), pode ser usado para diagnosticar hepatite alcoólica (Neuschwander-Tetri et al, 1996; Pinto et al, 1996; Bird, 1993; Zhou et al, 1998). Pacientes com hepatite alcoólica freqüentemente apresentam uma razão de AST para ALT > 2 , com valores de aminotransferase absoluta < 300 U/L. De acordo com Nathwani e colaboradores (2005), pacientes em exercício, polimiositose ou crises convulsivas exibiram níveis aumentados de creatina quinase e lactato desidrogenase, de acordo com a injúria muscular. Em casos agudos, os nívei de AST e ALT também estavam aumentados, e a razão AST/ALT era maior do que 3.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito da dieta cetogênica sobre as nucleotidasas de cérebro e soro sanguíneo de ratos em modelo de epilepsia. Para tanto, almejamos atingir os seguintes objetivos específicos:

1. Padronização da dieta cetogênica;
2. Determinação da captação de [U-¹⁴C]-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo de ratos;
3. Determinação da relação tecido adiposo retroperitoneal / peso corporal total
4. Investigar o efeito da dieta cetogênica sobre a hidrólise de nucleotídeos ATP, ADP e AMP em sinaptossoma de hipocampo de ratos;
5. Avaliar a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em sinaptossomas de hipocampo de ratos submetidos ao modelo de indução de *status epilepticus* com litio-pilocarpina;
6. Investigar o efeito da dieta cetogênica sobre a hidrólise de nucleotídeos ATP, ADP e AMP em sinaptossoma de hipocampo de ratos submetidos ao modelo de indução de *status epilepticus* com litio-pilocarpina;
7. Investigar o efeito da dieta cetogênica sobre a hidrólise de nucleotídeos e as enzimas marcadoras de dano hepático, em soro sanguíneo de ratos submetidos ao modelo de indução de *status epilepticus* com litio-pilocarpina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

- Fibras (microcelulose cristalina) obtidas da Blanver Farmoquímica.
- Mistura vitamínica, produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.
- Proteína isolada de soja p.a. 92% de pureza, obtida da BUNGE Alimentos.
- DL-metionina, obtida da Distribuidora Delaware, Porto Alegre, Brasil
- Comassie Blue e verde de malaquita obtidos da Sigma Chemical Co.
- [U-¹⁴C]-Deoxiglicose, da Amersham.
- ATP, ADP, AMP, HEPES, trizma base, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)
- Percoll obtido da Pharmacia, sendo, rotineiramente, filtrado através de pré-filtros Millipore AP15 para remover agregados.
- Cloreto de cálcio e cloreto de magnésio foram obtidos da Merck.
- Cloreto de potássio, sacarose, molibdato de amônio e glicose obtidos da Reagen.
- Ácido clorídrico, ácido tricloroacético (TCA) e etanol, obtidos da Synth.
- Álcool polivinílico da Vetec.
- Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

3.2. Equipamentos

Centrífuga Sorvall RC 5B plus (rotor SS-34), Sorvall RMC 14, balanças analíticas Kern 430-21 e Marte AS 2000, homogeneizador Potter Elvehjem, espectrofotômetros Beckman DU 640 UV/VIS e Genesys 20, banho-térmico Biopar

HM A02, pipetas automáticas Finnpiquette-Labsystems, vidrarias volumétricas adequadas. Contador de cintilação líquida Wallac.

3.3. Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com vinte e um dias de idade. Os animais foram mantidos em suas caixas confeccionadas em plexiglass, medindo 42 x 34 x 16cm, tendo o assoalho recoberto por maravalha, e acondicionados em grupos de no máximo 4 ratos por caixa. Os ratos foram submetidos a um ciclo de claro-escuro de 12 horas, a uma temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os procedimentos para cuidado e manuseio dos animais foram adaptados de acordo com os regulamentos publicados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

3.4. Desenho Experimental

3.4.1 Modelo do lítio-pilocarpina

O SE foi induzido usando o modelo lítio-pilocarpina. Aos 21 dias, os ratos receberam uma injeção i.p. de cloreto de lítio (127 mg/kg); 18-19 horas após, foi administrada uma dose i.p. de pilocarpina (60mg/kg), para indução do SE; os controles receberam injeção de salina no mesmo volume. Após injeção de pilocarpina, todos os ratos progrediram ao SE, tendo seu início caracterizado por imobilidade inicial e movimentos mastigatórios seguido por repetitiva atividade clônica de tronco e

membros. Os ratos, então, desenvolveram repetidos levantamentos das patas dianteiras (*rearings*) com clonus dos membros dianteiros e queda intercalada com imobilidade, movimentos mastigatórios e tremores ocorrendo singularmente ou em séries (Zhao et al., 2004). Um sexto dos animais (6,25%) em SE morreram e nenhum dos animais controle morreu.

3.4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Controle salina: receberam injeção i.p. de salina e foram alimentados com dieta controle.

Cetogênico salina: receberam injeção i.p. de salina, foram deixados 24 horas em jejum e, então, alimentados com dieta cetogênica.

Controle lítio-pilocarpina: tiveram indução do SE com o modelo lítio-pilocarpina e foram alimentados com dieta controle.

Cetogênico lítio-pilocarpina: tiveram indução do SE com o modelo lítio-pilocarpina, foram deixados 24 horas em jejum e, então, alimentados com dieta cetogênica.

Todos os ratos consumiram ração e água *ad libitum* durante 6 semanas. As respectivas dietas estão detalhadas na Tabela 4.

Tabela 4. Composição das dietas Controle e Cetogênica

Controle	g/100 g	Cetogênica	g/100 g
Proteína de soja	25	Proteína de soja	25
Mistura salina ¹	4,0	Mistura salina ¹	4,0
Mistura vitamínica ²	1,0	Mistura vitamínica ²	1,0
Fibras	1,0	Fibras	1,0
Óleo de soja	0,5	Óleo de soja	2,0
Banha de porco	4,5	Banha de porco	65,5
DL-metionina	0,3	DL-metionina	0,3
Amido de milho	63,7	Amido de milho	1,2

1. Composição (mg/100g de ração): 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; CoCl . 6H₂O, 0,009; KI, 3,2.

2. Mistura vitamínica (mg ou UI/100 g de ração): vitamina A, 2000 UI; vitamina D, 2000 UI; vitamina E, 10 UI; menadiona, 0,5 mg; colina, 200 mg; ácido p-aminobenzóico (PABA), 10 mg; inositol, 10 mg; niacina, 4 mg; Ca-D-pantotenato, 4 mg; riboflavina, 0,8 mg; tiamina, 0,5 mg; piridoxina, 0,5 mg; ácido fólico, 0,2 mg; biotina, 0,04 mg; vitamina B-12, 0,003 mg.

1 e 2. Segundo métodos oficiais de análises da Associação de Química Analítica (AOAC); Horwitz, 1980.

3.5 Frações biológicas

Foram utilizadas diferentes frações biológicas de ratos dos quatro grupos de tratamento especificados:

- a) Fração sinaptossomal de hipocampo.
- b) Soro sangüíneo.
- c) Tecido adiposo retroperitoneal.
- d) Músculo sóleo.

3.5.1 Obtenção da fração sinaptossomal

Os sinaptossomas foram isolados como previamente descrito (Nagy e Delgado-Escueta, 1984). Os ratos foram mortos por decapitação, os hipocampos removidos e homogeneizados em homogeneizador motor drive Teflon-glass, numa diluição de 1:5 (p:v), em um meio denominado "meio I" contendo: 320mM sacarose, 0,1mM EDTA e 5,0mM HEPES, pH 7.5. O homogeneizado total foi submetido a centrifugações diferenciais para obtenção da fração mitocondrial (P2) a qual (0,5 mL) foi misturada com 4mL de solução de Percoll 8,5% e aplicada num gradiente isoosmótico descontínuo de Percoll/sacarose (10/16%). A banda de sinaptossomas entre a interface do Percoll 10/16% foi coletada e lavada duas vezes a 15,000 x g por 20min com mesmo "meio I" para remover o Percoll residual. O "pellet" da fração sinaptossomal foi suspenso em "meio I" para uma concentração final da proteína de 0,5mg/mL. O material foi preparado diariamente e todos os procedimentos desde a retirada dos tecidos foram realizados à temperatura de 0-4°C.

3.5.2 Isolamento da fração sangüínea e obtenção do soro

No momento da decapitação dos ratos (controles e tratados) para obtenção da fração sinaptossomal, o sangue foi coletado em um tubo sem adição de anticoagulantes. O sangue foi centrifugado em tubos plásticos por 5 min a 5.000 x g, a temperatura ambiente, em centrífuga clínica. O soro foi separado e uma porção foi utilizada para determinação de corpos cetônicos e outra, congelada a -20°C por até uma semana para realização dos ensaios enzimáticos.

3.6 Ensaios enzimáticos da fração sinaptossomal

O meio de reação usado para medir a *hidrólise do ATP e do ADP* foi, essencialmente o mesmo como descrito previamente (Battastini *et al.*, 1991), contendo (concentração final): KCl 5,0mM, CaCl_2 1,5mM, EDTA 0,1mM, glicose 10mM, sacarose 225mM e tampão Tris-HCl 45mM, pH 8,0, em um volume final de 200 μL .

O meio de reação usado para dosar a atividade da *ecto-5'-nucleotidase* continha MgCl_2 10mM e Tris-HCl 100mM, pH 7,5 e sacarose 150mM em um volume final de 200 μL (Heymann *et al.*, 1984).

Foi realizada uma pré-incubação de 10 min, com a adição de 20 μL da fração sinaptossomal e a reação foi iniciada pela adição de ATP, ADP ou AMP para uma concentração final de 1,0 mM. O tempo de incubação e concentração de proteína foram escolhidos com a finalidade de garantir a linearidade da reação. A reação foi interrompida pela adição de 200 μL de TCA 10%. As amostras foram transferidas e mantidas no gelo por 10min, e alíquotas de 100 μL (para ATPase e ADPase) ou 200 μL (para AMPase) foram retiradas para a dosagem do fosfato inorgânico liberado

(Pi) pelo método colorimétrico do verde de malaquita (Chan *et al.*, 1986). Todas as amostras foram feitas em triplicatas sendo a hidrólise não enzimática dos substratos corrigida através de controles feitos nas mesmas condições da amostra, exceto que a fração sinaptossomal foi adicionada após a interrupção da reação pelo TCA. A atividade enzimática foi expressa como nmoles de Pi liberado por minuto por mg de proteína (nmolPi/min/mg).

3.7 Determinação de proteínas

A quantificação proteína foi determinada pelo método de Comassie Blue (Bradford, 1976), usando albumina bovina sérica como padrão.

3.8 Modelo experimental de captação de [U-¹⁴C]-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo

O músculo da perna (sóleo) foi retirado e molhado com solução Krebs-Ringer bicarbonato (KRb). Após, foram cortadas fatias do músculo, pesando entre 50-60 mg, e colocadas sobre placas de Petry com papel filtro embebido com a solução de KRb. As fatias foram incubadas a fim de medir a captação de [U-¹⁴C]-Deoxiglicose. Para isso, utilizou-se um meio de incubação contendo 1,0 ml de Tampão KRb em pH 7,4, 5 mM de glicose e [U-¹⁴C]-Deoxiglicose. O experimento foi realizado em atmosfera de carbogênio (95% O₂ / 5% CO₂), sob agitação e temperatura de 37° (Dubnoff). Após 30 minutos, a reação foi interrompida, colocando-se os béqueres no gelo. Retirou-se o meio de incubação e as fatias foram lavadas com 1,0 mL de solução KRb gelada, por 3 vezes. As fatias foram transferidas para tubos *ependorfs* específicos, centrifugados a 2.000

rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, adicionado 2,0 mL de NaOH 2N e, após homogeneização do tecido, o líquido de cintilação foi acrescentado. A radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação líquida (Wallac).

3.9 Determinação da relação tecido adiposo retroperitoneal / peso corporal total

O tecido adiposo retroperitoneal dos ratos foi retirado e pesado. Posteriormente, fez-se uma relação entre o peso deste tecido adiposo sobre o peso corporal total do animal, em gramas.

3.10 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ou média e desvio padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas ou ANOVA de duas vias, utilizando o programa estatístico SPSS 10.0 para Windows.

4. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na forma dos seguintes capítulos:

CAPÍTULO I:

Efeito da dieta cetogênica sobre a hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas de ratos submetidos ao modelo de indução de *status epilepticus* com lítio-pilocarpina.

CAPÍTULO II:

Effect of ketogenic diet on alkaline phosphatase, aminotransferases and nucleotidase activities on rat blood serum in a lithium-pilocarpine-induced *status epilepticus* (manuscrito a ser submetido à revista Life Sciences).

4.1 CAPÍTULO I

4.1.1 Padronização da dieta cetogênica

Experimentos preliminares usando a KD com 20% de proteína ao invés de 25%, concentração utilizada no tratamento de crianças com epilepsia, causou subnutrição dos ratos. Com esta dieta, foi observada uma perda de peso e de pêlos (dados não mostrados). Este dado pode estar relacionado aos ratos Wistar usados neste trabalho, uma vez que ratos Sprague-Dawley não apresentaram sinais de subnutrição quando alimentados com KD com 10% de proteína e iniciando o tratamento aos 22 dias de idade (Bough & Eagles, 1999). Com o tratamento usado neste estudo os animais permaneceram aparentemente saudáveis e um teste semi-quantitativo mostrou que os níveis de corpos cetônicos no soro sanguíneo dos ratos controle estavam abaixo de 0,5 mmol/L, enquanto os animais alimentados com a KD desenvolveram um maior nível de cetose (1-5 mmol/L).

4.1.2 Efeito da KD e do SE sobre o peso dos ratos

Os animais receberam a dieta controle ou cetogênica conforme descrito nos Materiais e Métodos durante 6 semanas. A fim de verificarmos uma possível interação entre a KD e o SE, realizamos uma análise dos resultados por uma Análise de Variância com Medidas Repetidas. Dessa forma, pudemos observar que houve efeitos do tempo ($F(1,29)=635,38$; $P<0,001$) e da dieta ($F(1,29) = 4,44$; $P <0,05$) sobre o peso dos ratos, mas não do SE (Figura 4). Em uma análise mais detalhada, vimos que após a primeira semana deste tratamento os grupos cetogênicos, tanto salina quanto lítio-pilocarpina,

ganharam 25% menos peso em relação ao grupo controle + salina, e 21% em relação ao controle + lítio-pilocarpina ($p < 0,005$). Na segunda semana, a diferença de ganho de peso do grupo que recebeu KD + salina para os grupos controle + salina e controle + lítio-pilocarpina foi de 25% e 22%, respectivamente ($p < 0,001$), semelhante ao grupo KD + lítio-pilocarpina, (26% e 23%, respectivamente; $p < 0,001$). Na terceira semana, o menor ganho de peso dos ratos cetogênicos em relação aos grupos controle + salina e controle + lítio-pilocarpina foi de 20% e 16%, respectivamente, para os cetogênicos + salina ($p < 0,005$) e de 21% e 17%, respectivamente, para os cetogênicos + lítio-pilocarpina ($p < 0,005$). Essa diferença, apesar de menos acentuada, continuou ainda na quarta semana de tratamento. O menor ganho de peso do grupo que recebeu KD + salina em relação aos grupos controle + salina e controle + lítio-pilocarpina foi de 14% e 9%, respectivamente ($p < 0,05$), semelhante ao grupo KD + lítio-pilocarpina, (15% e 10%, respectivamente; $p < 0,05$). A partir de então, os pesos dos animais se igualaram, permanecendo assim até o final do tratamento (Figura 4).

4.1.3 Efeito da KD sobre a relação tecido adiposo retroperitoneal / peso corporal total

A fim de avaliarmos a quantidade de tecido adiposo dos animais alimentados com KD em comparação aos animais controle, determinamos a relação entre o peso do tecido adiposo retroperitoneal e o peso corporal total, em gramas. A partir da análise dos resultados por uma ANOVA de duas vias, observamos houve efeitos da KD ($F(1,21)=9,14$; $p < 0,01$), do SE ($F(1,21)=84,08$; $p < 0,001$), bem como uma interação entre estes dois fatores ($F(1,21)=27,08$; $p < 0,001$), causando uma diminuição do tecido adiposo retroperitoneal em relação aos ratos controle salina (Figura 5).

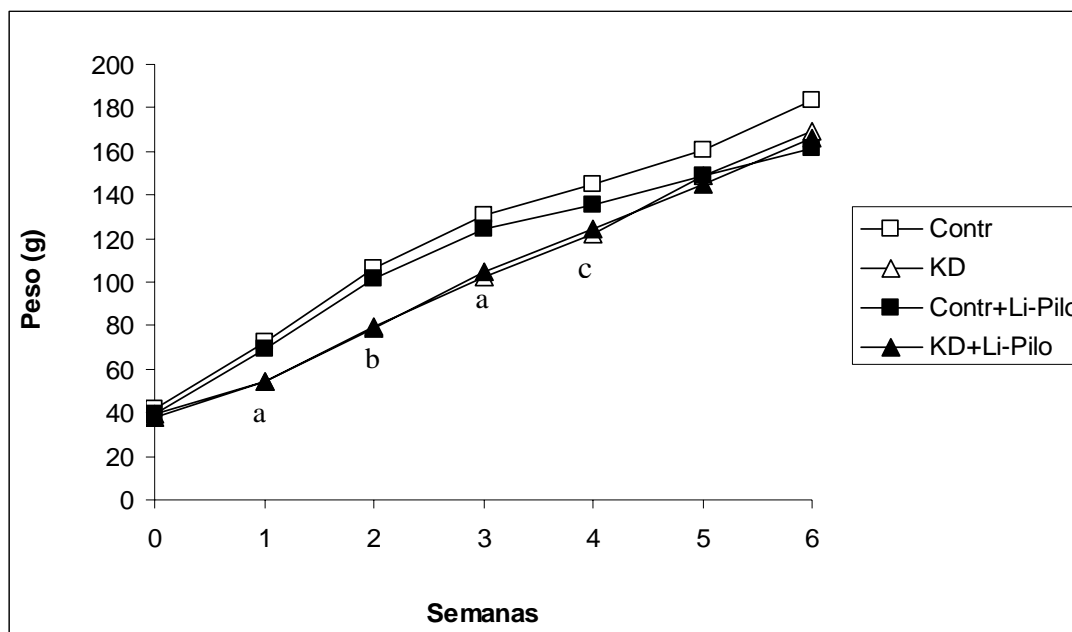


Figura 4. Peso total dos ratos ao longo de 45 dias de tratamento com as dietas controle e cetogênica. Os animais receberam a dieta controle ou cetogênica conforme descrito nos Materiais e Métodos durante 6 semanas e estavam divididos em quatro grupos: Ctrl (receberam injeção de salina e dieta controle), KD (receberam injeção de salina e dieta cetogênica), Li-Pilo (submetidos ao modelo do lítio-pilocarpina e receberam dieta controle) e Li-Pilo+KD (submetidos ao modelo do lítio-pilocarpina e receberam dieta cetogênica). Os resultados representam as médias de pelo menos cinco animais. Os dados foram analisados por Análise de Variância com Medidas Repetidas. (a) Significativamente diferente do grupo Ctrl e Ctrl + Li-Pilo ($p < 0,005$). (b) Significativamente diferente dos grupos Ctrl e Ctrl + Li-Pilo ($p < 0,001$). (c) Significativamente diferente dos grupos Ctrl e Ctrl + Li-Pilo ($p < 0,05$).

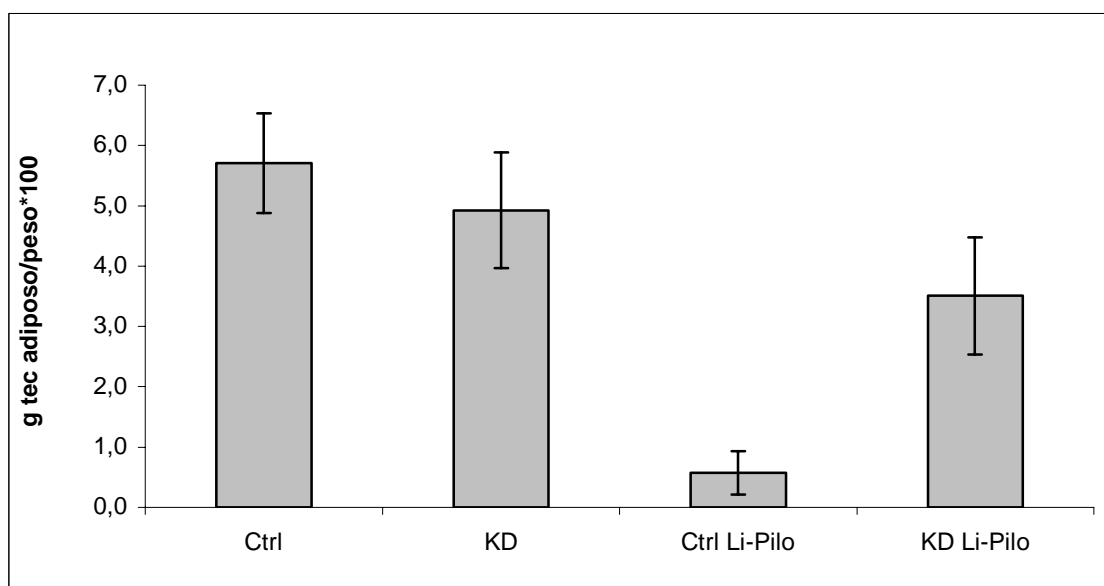


Figura 5. Concentração de tecido adiposo retroperitoneal de ratos. Os animais receberam a dieta controle ou cetogênica conforme descrito nos Materiais e Métodos durante 6 semanas e estavam divididos em quatro grupos: Ctrl (receberam injeção de salina e dieta controle), KD (receberam injeção de salina e dieta cetogênica), Ctrl Li-Pilo (submetidos ao modelo do lítio-pilocarpina e receberam dieta controle) e KD Li-Pilo (submetidos ao modelo do lítio-pilocarpina e receberam dieta cetogênica). Os resultados representam as médias \pm desvio padrão de pelo menos cinco animais. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias.

4.1.4 Efeito da KD sobre a captação de [U-¹⁴C]-Deoxiglicose em músculo sóleo de ratos controle e cetogênicos

Com a finalidade de determinar a utilização de glicose pelo músculo de ratos alimentados com dieta cetogênica em relação aos seus controles, analisamos a captação de [U-¹⁴C]-Deoxiglicose em músculo sóleo destes animais, que receberam injeção prévia de solução de salina ou indução do SE pelo modelo do lítio-pilocarpina. Observamos que a captação de [U-¹⁴C]-Deoxiglicose em músculo sóleo foi semelhante nos grupos de animais estudados (Figura 6). Burcelin et al. (2002) mostrou que, *in vitro*, também não houve variação na razão de utilização da glicose em músculo isolado de camundongos controle e camundongos magros não diabéticos (LnD).

4.1.5 Efeito da KD sobre as ectonucleotidases em sinaptossomas de hipocampo de ratos controle e cetogênicos

Uma vez padronizada a dieta cetogênica em ratos, estudamos o efeito desta dieta sobre as ectonucleotidases de sinaptossoma de hipocampo de ratos que receberam injeção prévia de solução de salina ou indução do SE pelo modelo do lítio-pilocarpina, e posteriormente alimentados com dietas controle ou cetogênica.

Inicialmente, nossos objetivos eram avaliar o efeito da KD sobre as ectonucleotidases em sinaptossoma de ratos. De acordo com este propósito, verificamos, através da análise por ANOVA de duas vias, que a KD *per se* não foi capaz de alterar a atividade dessas enzimas em sinaptossoma hipocampal de ratos que receberam injeção prévia de salina (Figura 7).

A partir destes dados, resolvemos analisar o efeito da KD associado a um modelo de indução de SE. Sendo assim, vimos que a indução do SE pelo modelo do lítio-pilocarpina foi capaz de promover uma diminuição na hidrólise do ATP ($F(1,29)=6,06$; $P<0,05$) e um aumento da hidrólise do ADP ($F(1,27)=7,38$; $P<0,05$), não havendo interação entre estes dois fatores analisados (Figura 7). A KD nem o SE provocaram alteração na hidrólise do AMP.

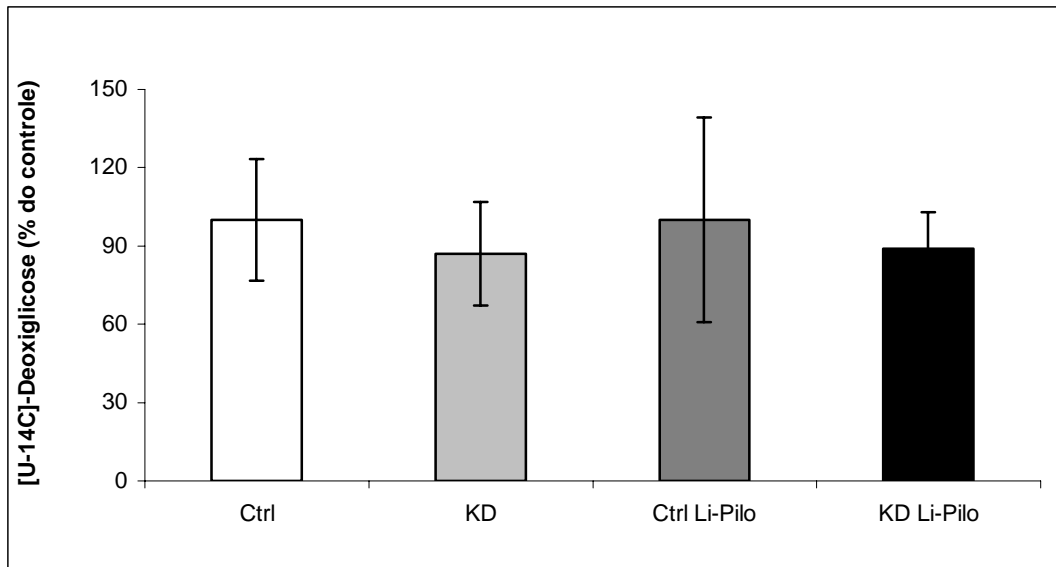
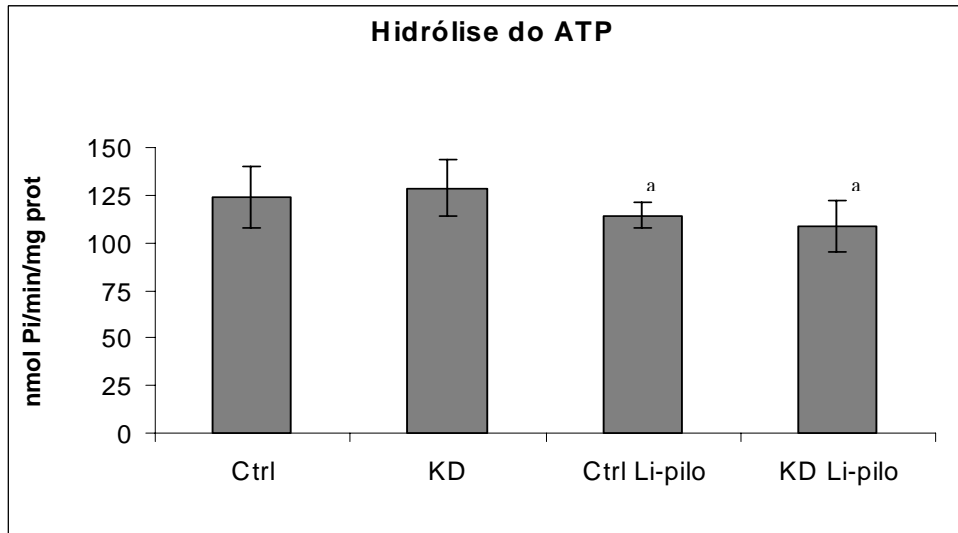
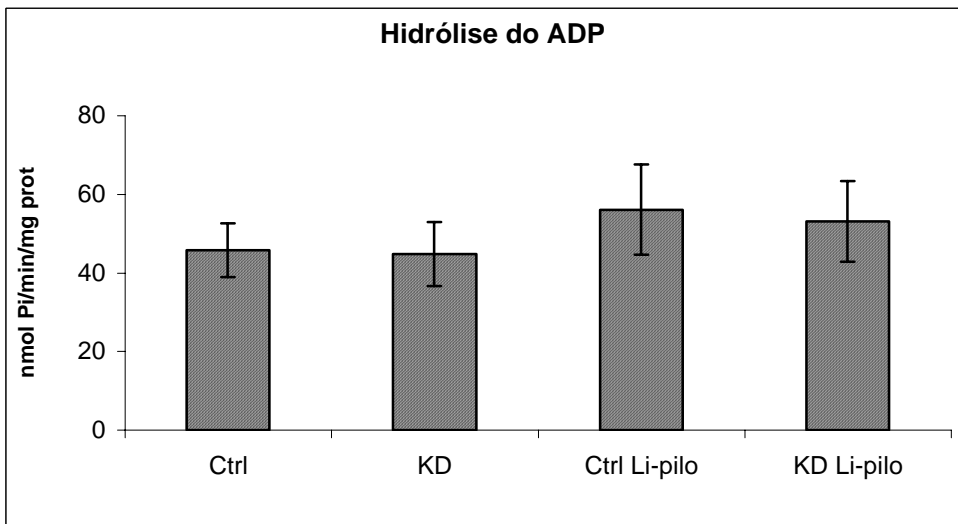


Figura 6. Captação de [U-¹⁴C]-Deoxiglicose em músculo sóleo de ratos. Os animais receberam a dieta controle ou cetogênica conforme descrito nos Materiais e Métodos durante 6 semanas e estavam divididos em quatro grupos: Ctrl (receberam injeção de salina e dieta controle), KD (receberam injeção de salina e dieta cetogênica), Li-Pilo (submetidos ao modelo do lítio-pilocarpina e receberam dieta controle) e Li-Pilo+KD (submetidos ao modelo do lítio-pilocarpina e receberam dieta cetogênica). Os resultados representam as médias \pm desvio padrão de pelo menos cinco animais. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias.

A



B



C

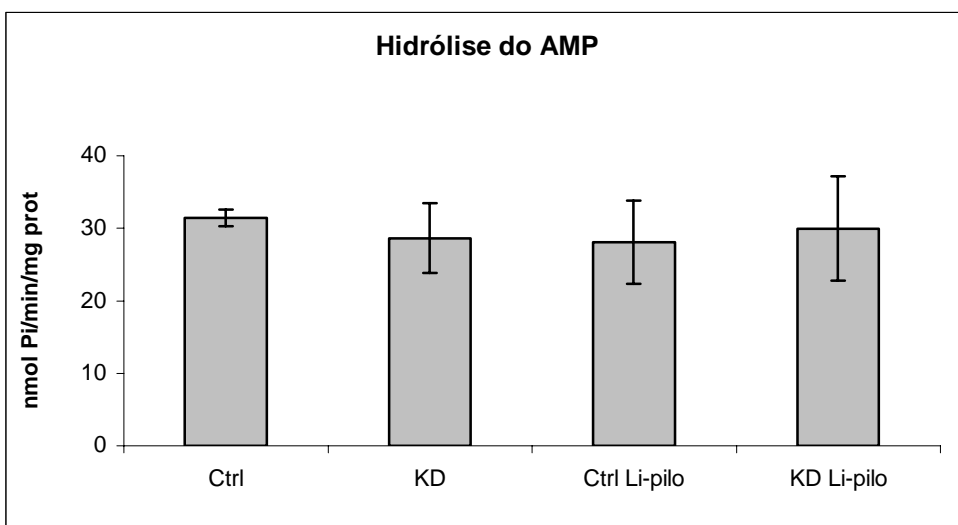


Figura 7. Hidrólise do ATP (A), ADP (B) e AMP (C) em sinaptossoma de hipocampo de ratos. Os animais receberam a dieta controle ou cetogênica conforme descrito nos Materiais e Métodos durante 6 semanas e estavam divididos em quatro grupos: Ctrl (receberam injeção de salina e dieta controle), KD (receberam injeção de salina e dieta cetogênica), Li-Pilo (submetidos ao modelo do lítio-pilocarpina e receberam dieta controle) e Li-Pilo+KD (submetidos ao modelo do lítio-pilocarpina e receberam dieta cetogênica). Os resultados representam as médias \pm desvio padrão de pelo menos cinco animais. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias.

4.2 CAPÍTULO II – SILVEIRA, VG; COGNATO, GP; MÜLLER, AP; BONAN, CD; PERRY, ML; BATTASTINI, AM. Effect of ketogenic diet on alkaline phosphatase, aminotransferases and nucleotidase activities on rat blood serum in a lithium-pilocarpine-induced *status epilepticus* (artigo a ser submetido à Life Sciences).

Effect of Ketogenic Diet on Alkaline Phosphatase, Aminotransferases and Nucleotidase Activities on Rat Blood Serum in a Lithium-Pilocarpine-Induced Status Epilepticus.

Vanessa Gass da Silveira^a; Giana de Paula Cognato^a; Alexandre Pastoris Müller^a; Carla Denise Bonan^b; Marcos L. Santos Perry^a; Ana Maria Oliveira Battastini^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Ana Maria Oliveira Battastini

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone number: 55 (51) 3308-5554

FAX number: 55 (51) 3308-5535

e-mail: abattastini@terra.com

ABSTRACT

The ketogenic diet (KD) is a high-fat and low-carbohydrate diet, used for treating refractory epilepsy in children. We have previously shown alterations in nucleotidase activities from central nervous system and blood serum of rats submitted to different models of epilepsy. In this study we have investigated the effect of KD on nucleotidase activities on blood serum, as well as the relationship between KD and alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) activities of female Wistar rats submitted to the lithium-pilocarpine model of epilepsy. At 21 days-old, rats received an injection of lithium chloride and 18–19 h later, they received an injection of pilocarpine hydrochloride for status epilepticus (SE) induction. The results reported here show that seizures induced by lithium-pilocarpine elicit a significant increase in ATP hydrolysis and ALP activity, as well as a decrease in ADP hydrolysis and AST activity. Furthermore, the KD is a useful and effective agent in management of refractory epilepsies of childhood. However, it is a rigorous regimen that can be associated with hepatic damage, showed in our results through the elevated activities of ALP, ALT, AST and 5'-nucleotidase, in blood serum. Further studies are necessary to investigate the mechanism of inhibition of the lithium on nucleotidases in blood serum.

Keywords: nucleotidases; aminotransferases, alkaline phosphatase, status epilepticus, ketogenic diet, pilocarpine model.

1. INTRODUCTION

The prospect that epilepsy might be controlled, at least partially, by nutritional modification is radical but highly appealing. The ketogenic diet (KD) is certainly the best-known dietary approach to epilepsy treatment, but it is not the only one (Stafstrom, 2004). The KD was initially devised in 1921 to mimic the anticonvulsant effects of fasting, which were known to suppress seizures (Wilder, 1921). Despite its long history of clinical use, it is still not entirely clear how the KD affects the brain and what mechanism(s) underlies its seizure-suppressive action. Because both the KD and fasting have beneficial effects on epilepsy, it has been assumed that they share a common mechanism in alleviating seizures. Besides, both the KD and fasting produce elevated blood levels of β -hydroxybutyrate (β -OHB) and acetoacetate, it has been speculated that ketosis may have a beneficial effect upon brain seizure resistance. In addition to ketosis, other changes associated with the ketogenic diet might affect seizure activity. For example, changes in energy metabolism, in lipid composition of cell membranes, in the level of brain water content, and in brain pH have all been suggested to play a role in seizure suppression (Schwartzkroin, 1999; Janigro, 1999).

Cholinomimetic agents are capable of inducing epileptic phenomena when applied either systemically or directly to central nervous system (CNS). Convulsions induced by cholinergic stimulation produce a distinctive pattern of electroencephalographic (EEG), behavioral and pathological changes mimicking human epilepsy (Turski et al., 1989). Thus, seizures induced by cholinomimetic agents have been widely used as valuable models of experimental epilepsy (Leite et al., 2002; Turski, 2000; Turski et al., 1989). Interestingly, lithium pretreatment has been shown to potentiate the convulsant effect of cholinomimetics (Honchar et al., 1983; Morrisett et al., 1987b). This model reproduces most clinical, temporal and neuropathologic features

of human temporal lobe epilepsy (TLE) (Turski et al., 1989; Cavalheiro, 1995; Dube et al., 2001a,b; Rigoulot et al., 2004), and neuronal damage occurs mainly in the hippocampus, dentate gyrus, piriform and entorhinal cortices, septum, thalamus, amygdala, and neocortex. Previous studies have demonstrated that lithium-pilocarpine does not produce substantial hippocampal damage during the first 2 weeks of life (Cilio et al., 2003; Sankar et al., 1998).

Within the past decade, ectonucleotidases belonging to several enzyme families have been discovered, cloned and functionally characterized by pharmacological means. Specifically, we refer here to members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPDase) family (EC 3.6.1.5) as ectoenzymes that hydrolyze extracellular nucleoside tri- and diphosphates and have a defined pharmacological profile. Most notably, in many tissues and cells, NTPDases comprise dominant parts of a complex cell surfacelocated nucleotide hydrolyzing and interconverting machinery. This ensemble includes the ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterases (E-NPPs), NADglycohydrolases, CD38/NADase, alkaline phosphatases, dinucleoside polyphosphate hydrolases, adenylate kinase, nucleoside diphosphate kinase, and potentially ecto-F₁-F_o ATP synthases (Goding, 2000; Stefan et al., 2005) that may interact in various tissues and cellular systems.

The ectonucleotidase chain or cascade, as initiated by NTPDases can be terminated by ecto-5'-nucleotidase (CD73; EC 3.1.3.5) with hydrolysis of nucleoside monophosphates (Zimmermann, 1992). Together, ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4), another ectoenzyme that is involved in purine salvage pathways and converts adenosine to inosine, closely regulate local and pericellular extracellular and plasma concentrations of adenosine (Goding and Howard, 1998; Resta et al., 1998).

The level of exogenous ATP may be increased in various inflammatory and shock conditions, mainly as a consequence of nucleotide release from platelets, endothelial and blood vessel cells (Dubyak, 2000). This rise in exogenous ATP concentration is usually accompanied by concurrent secretion of various enzymes into the intercellular space (Yegutkin and Burnstock, 2000). Thus, the measurement of the rate of nucleotide hydrolysis in blood may serve as an auxiliary tool in the diagnosis of cellular damage in various pathophysiological conditions (Yegutkin, 1997). Bruno et al. (2002) demonstrated that acute seizures induced by PTZ elicit a significant increase in ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in serum of rats and these results suggest an effect promoted by the seizures. For instance, serum 5'-NT activity was increased mainly in obstructive hepatobiliary disorders (Dixon and Purdom 1954, Hill and Sammons, 1967a, Song and Kappas, 1969, Reichling and Kaplan, 1988, Pagani and Panteghini, 2001) and serum ALP was first reported to be elevated in patients with hepatobiliary disorders in 1930 (Roberts, 1930).

Several reports have suggested that the degree of aminotransferase elevation as well as the AST to alanine aminotransferase (ALT) ratio may be used to diagnose alcoholic hepatitis (Neuschwander-Tetri et al., 1996; Pinto et al., 1996; Bird, 1993; Zhou et al., 1998). Patients with alcoholic hepatitis often demonstrate an AST to ALT ratio of > 2 , with absolute aminotransferase values of < 300 U/L. Although some authors have stated that no consistent relationship exists between the AST and ALT levels in nonalcoholic steatohepatitis (Ludwig et al., 1980), others have implied that the ALT level is generally greater than the AST level (Sheth et al., 1997; Neuschwander-Tetri et al., 1996; Pinto et al., 1996).

Considering the influence of KD and adenine nucleotides on central and peripheral nervous system, the aim of this investigation was to study the effect of KD in

ATP, ADP and AMP hidrolysis on blood serum of Wistar rats, as well as its relationship with ALP and aminotransferases in a lithium-pilocarpine–induced SE.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Nucleotides (ATP, ADP, AMP), Hepes, Trizma base, EDTA, levamisole and pilocarpine were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Diagnostic kits, manufactured by Labtest Diagnostic. All others reagents were of analytical grade.

2.2. Animals

Female 21 days-old Wistar rats came from the local breeding colony. They were maintained on a 12-h light/dark cycle in a ventilated room at 21°C with free access to food and water. All animal procedures were in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.3. Lithium-pilocarpine–induced SE

At 21 days old, 24 rats received an i.p. injection of lithium chloride (127 mg/kg); 18–19 h later, rats received an i.p. injection of pilocarpine hydrochloride (60 mg/kg), for induction of SE. The control groups received an injection of the same amount of normal saline (n = 11). After pilocarpine injection, all rats progressed to SE. The onset of SE was characterized by initial immobility and chewing followed by repetitive clonic activity of the trunk and limbs. The rats then developed repeated rearing with forelimb clonus and falling interspersed with immobility, chewing, and myoclonic jerks occurring singularly or in series (Zhao et al., 2004). Two (8,33%) of the SE rats died.

2.4. Diets

The animals were divided into four groups: Ctrl group (received an injection of saline and control diet; n = 5); KD group (received an injection of saline and KD; n = 6); Li-Pilo group (submitted to lithium-pilocarpine model and received control diet; n = 11); and Li-Pilo+KD group (submitted to lithium-pilocarpine model and received KD; n = 11). The ketogenic rats are fasted for 24h prior to initiation of KD (Table 1). All rats consumed food and water ad libitum for 6 weeks. Ketonemia was determined by a semiquantitative kit (Keto-Diabur-Test[®] 5000) from Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha).

2.5. Isolation of blood serum fraction

Blood samples were drawn after decapitation of rats and were immediately centrifuged at 5000 x g for 5 minutes at room temperature. The serum samples obtained were stored at -20°C for until analysis.

2.6. Measurement of ATP, ADP and AMP hydrolysis

ATP, ADP and AMP hydrolysis were performed using the method described previously by Oses et al. 2004. The reaction mixture containing ATP or ADP as substrate (3 mM), 112.5 mM Tris-HCl, pH 8.0, was incubated with 1.0 mg protein of serum protein at 37°C for 40 min in a final volume of 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL of 10% TCA. All samples were chilled on ice, centrifuged at 5,000 x g for 5 minutes and the amount of inorganic phosphate (Pi) liberated was measured by the malachite green method (Chan et al., 1986). AMP hydrolysis was determined in the same conditions for ATP and ADP, except that the substrate was AMP (3 mM) and at pH 7.5. To exclude a possible interference of non-specific

phosphatases on nucleotide hydrolysis, we incubated the blood serum with levamisole, a specific inhibitor of alkaline phosphatase. For all enzyme assays incubation times and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the reaction. In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were assayed in duplicate. Enzyme activities were expressed as nmol of Pi released per minute per milligram of protein.

2.7. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as standard.

2.8. Determinations of ALT, AST and ALP

Levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) (Reitman and Frankel, 1957) and alkaline phosphatase (ALP) (Roy, 1970) in the serum were determined using commercial diagnostic kits, manufactured by Labtest Diagnostic, Brazil. Enzyme activities were expressed as U/L.

2.9. Statistical analysis

The data obtained are expressed as means \pm standard deviation of at least five animals. The results were analyzed statistically by two-way ANOVA (SPSS 10.0 Windows).

3. RESULTS

Preliminary experiments using a KD with 20% protein instead 25% protein, as used in the treatment of children with epilepsy, caused an important undernutrition in rats. With this diet, it was observed a significant loss of weight and hair (data not shown). This result may be related to the Wistar rats used in this study, because Sprague-Dawley rats did not show signs of undernutrition when fed a KD containing 10% protein, even when the diet was started at 22 d postnatal (Bough and Eagles, 1999).

With the treatment used here, the animals remained apparently healthy and semi quantitative test showed that the blood levels of ketone bodies on serum of control rats were lower than 0.5 mmol/L, while animals fed the ketogenic diet developed an increased level of ketosis (1-5 mmol/L).

In the present study we analyzed the changes in the hydrolysis of nucleotides in the blood serum of female rats submitted to KD and to a lithium-pilocarpine-induced SE. The statistical analyze by two-way ANOVA showed that KD increased ATP ($F(1.15)=98.39$; $P<0.001$), ADP ($F(1.17)=59.3$; $P<0.001$) and AMP ($F(1.20)=64.47$; $P<0.001$) hydrolysis. Moreover, we observed that lithium-pilocarpine-induced SE increased ATP hydrolyze ($F(1.15)=5.84$; $P<0.05$) and decreased ADP hydrolyze ($F(1.17)=7.33$; $P<0.05$) (Fig. 1). In addition, this study demonstrated an interaction between KD and SE, occurred a decreased on AMP hydrolyze ($F(1.20)=6.07$; $P<0.05$) (Fig. 1).

It is well known that some of the enzymes studied here can be increased in the presence of other pathological events, particularly hepatic disorders (Pagani and Panteghini, 2001; Reichling and Kaplan, 1988). Thus, to evaluate the possible liver damage in the rats studied we measured the levels of hepatic enzymes: alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransaminase (ALT) and aspartate aminotransaminase (AST) in rat blood serum. The statistical analyze showed that the KD increased ALP

($F(1.22)=84.88$; $P<0.001$) (Fig. 2), ALT ($F(1.20)=48.73$; $P<0.001$) and AST ($F(1.21)=9.11$; $P<0.01$) (Fig. 3) activities. The SE increased ALP activity ($F(1.22)=12.48$; $P<0.005$) (Fig. 2) and decreased AST activity ($F(1.21)=12.72$; $P<0.005$) (Fig 3). In addition, the AST/ALT ratio was greater than 2, or 3 in case of epileptic rats.

4. DISCUSSION

Previous studies from our group have analyzed the interaction between epilepsy and ecto-nucleotidases. Bonan et al. (2000) have shown an increase in NTPDases and 5'-NT activities by synaptosomal preparations at different periods after induction of SE by pilocarpine or kainate treatment. In addition, it was observed an increase in nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol (Bruno et al., 2002). Moreover, in previous studies, we showed the presence of NTPDases activities in peripheral (Sarkis and Salto, 1991) and CNS (Battastini et al., 1995), platelets (Pilla et al., 1996) and rat blood serum (Oses et al., 2004; Torres et al., 2007).

In the present study, we have used the lithium-pilocarpine model of epilepsy to SE induction to investigate the nucleotide hydrolysis in the blood serum of rats treated with KD. Systemic administration of a large dose of pilocarpine leads to excessive cholinergic stimulation in the brain, which is manifested as alteration in electroencephalographic activity, cell damage and convulsions (Cavalheiro et al., 1987; Tursky et al., 1989). Pre-treatment with lithium has been found to potentiate the seizure activity induced by pilocarpine (Honchar et al., 1983), which may be prevented by either cholinergic antagonists or anticonvulsive drugs (Morrisett et al., 1987a,b).

Bruno et al. (2002) demonstrated a significant increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis by serum of rats and these results suggest an effect promoted by the seizures, since that in vitro there were not significant changes in ATP and ADP hydrolysis in the presence of PTZ. Because the protective actions of KD against epilepsy are not entirely clearly identified and nucleotidases have been associated with the plastic changes induced by SE, it became important to study the correlation between these two parameters. Our results have demonstrated that lithium-pilocarpine-induced SE was able to increase ATP hydrolyze and decrease ADP hydrolyze from blood serum of rats.

According to results from our laboratory (data not published) presented for De Paula Cognato (2005), pilocarpine has caused an increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis in blood serum of rats. Already, our laboratory Wilot (2004) observed (data not published) that the chronic treatment with lithium decreased the nucleotide hydrolysis in blood serum of rats. In this work, in spite of we use the lithium in a single dose, we can propose that lithium was able to inhibit the effect of pilocarpine on ADP hydrolyze, but was not sufficient to inhibit the increase of ATP hydrolyze caused by pilocarpine. However, further studies are necessary to investigate the mechanism of inhibition of the lithium on nucleotidases in blood serum.

Studies have demonstrated that NTPDase and E-NPP, with different kinetic parameters, may be present in the organism as a double system for the maintenance of homeostasis. Although NTPDase and E-NPP share common features, distinct characteristics exist between them. These differences suggest that the two enzymes are differently regulated and that they may function in different signaling contexts (Oses et al., 2004).

Our results showed a higher ALP activity in epileptic rats. Thompson et al. (2006) presented a report about a rare syndrome known as hyperphosphatasia with

neurologic deficit. Various disorders of alkaline phosphatase metabolism are well described in the literature, but most studies have focused on genetic defects resulting in low enzyme levels - the hypophosphatasias (Cole, 2003).

Several key aspects of the KD might ultimately result in seizure protection. Ketone bodies, free fatty acids, or glucose restriction might each lead directly or indirectly to seizure control. While it is possible that any one of these KD-induced changes is responsible for the anticonvulsant action of the KD, available evidence suggests that improved seizure control, at a minimum, likely requires all three (Bough and Rho, 2007). However, the KD that could involve some metabolic change induced by high circulating levels of ketone bodies or perhaps by a lipid component of this diet. Thus, we evaluated classic enzyme markers for hepatic damage (ALP, AST and ALT) in this work.

The serum ALP is a sensitive detector for early intrahepatic and extrahepatic bile obstruction and the presence of infiltrative diseases of the liver. The origin of the elevated serum ALP that occurs in obstructive hepatobiliary disease and the mechanism of its elevation have been subject of discussion and controversy for several decades. The opinion is divided between the proponents of the retention theory and supporters of the hepatogenic theory. The former propose that failure of the liver to excrete bone alkaline phosphatase in hepatobiliary obstruction is the major factor in the elevation of the serum level of the enzyme (Gutman, 1959; Wilkinson, 1962). The hepatogenic theory postulates that in extrahepatic or intrahepatic obstruction the ALP produced by the liver is unable to pass down the biliary tract and is forced back with the bilirubin into the serum (Hill and Sammons, 1967b).

A method that combines availability and reliability is the measurement of the other enzymes that are elevated in liver disease but not bone disease. These include

gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and 5'-NT. Elevation of either of these enzymes in a nonpregnant patient usually indicates that a high serum ALP is a liver origin. However, a normal 5'-NT in the presence of an elevated ALP does not exclude liver disease (Connel and Dinwoodie, 1970).

In the diagnosis of liver disease, ALP and GGT activities are sensitive but not specific (Reichling and Kaplan, 1988). 5'-NT is an ALP found primarily in the liver as well as in other tissues (Goldberg, 1973), but an increase in serum activity has been shown to be specific for the liver and biliary tree (Hill and Sammons, 1967a; Song and Kappas, 1969). In cases of dissociated increases in ALP and GGT activities, 5'-NT could be of diagnostic value in determining liver disease (Reichling and Kaplan, 1988).

Similarly, aminotransferases are sensitive indicators of liver cell damage for both acute and chronic hepatocellular injury (Barth et al., 1979). Several reports have suggested that the degree of aminotransferase elevation as well as the AST to ALT ratio may be used to diagnose alcoholic hepatitis (Neuschwander-Tetri et al., 1996; Pinto et al., 1996; Bird, 1993; Zhou et al., 1998). Moreover, Giannini et al. (2003) suggest that the AST/ALT ratio determination could be useful in well-defined clinical situations due to its relationships with stage of hepatic disease (both histological and clinical) and its correlation with liver function. Additionally, the AST/ALT ratio seems to be a useful tool even in patients with cirrhosis, since it helps grade the disease and is correlated with 1-year prognosis. Nathwani et al. (2005) showed that patients in extreme exercise, polymyositis or seizures exhibited markedly elevated creatine kinase and lactate dehydrogenase levels consistent with muscle injury. In acute cases, AST and ALT were both elevated, and the AST/ALT ratio was greater than 3.

In summary, the results reported here show that seizures induced by lithium-pilocarpine elicit a significant increase in ATP hydrolyze and an decrease in ADP

hydrolyze. However, further studies are necessary to investigate the mechanism of inhibition of the lithium on nucleotidases in blood serum. Furthermore, the ketogenic diet is a useful and effective agent in management of refractory epilepsies of childhood. However, it is a rigorous regimen that can be associated with hepatic damage, showed in our results through the elevated activities of ALP, aminotransferases and nucleotidases, especially 5'-NT, on blood serum.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Vanessa Gass da Silveira was recipient of CNPq fellowship. We thanks to Jean Pierre Oses for the critical reading of the manuscript.

5. REFERENCES

- Barth, R.C., Steven, A.S., Robert, W.S., 1979. Clinical Internal Medicine. Little Brown, England pp.211–214.
- Battastini, A.M., Oliveira, E.M., Moreira, C.M., Bonan, C.D., Sarkis, J.J., Dias, R.D., 1995. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochemistry and Molecular Biology International* 37(2), 209–219.
- Bonan C.D., Walz R., Pereira G.S., Worm P.V., Battastini A.M., Cavalheiro E.A., Izquierdo I., Sarkis J.J., 2000. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 39(3), 229-238.
- Bough, K.J., Eagles, D.A., 1999. A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Epilepsia* 40, 138–143.
- Bough, K.J., Rho, J.M., 2007. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia*, 48(1), 43–58,
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 218–254.
- Bruno, A.N., Oses, J.P., Bonan, C.D., Walz, R., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., 2002. Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol. *Neuroscience Research* 43(3), 283-288.

Cavalheiro, E.A., 1995. The pilocarpine model of epilepsy. *Italian Journal of Neurological Sciences* 16, 33-37.

Cavalheiro, E.A., Delrio, F.S., Tursky, W.A., Calderazzo-Filho, L.S., Bortolotto, Z.A., Tursky, L., 1987. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Brain Research* 26, 32-47.

Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157, 375–380.

Cilio, M.R., Sogawa, Y., Cha, B.H., Liu, Z., Huang, L-T., Holmes, G.L., 2003. Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are age-and model-specific. *Epilepsia* 44:518–528.

Clark, L.C.Jr., Beck, E. Plasma alkaline phosphatase activity; normative data for growing children. *The Journal of Pediatrics* 36, 335.

Cole, D.E.C. Hypophosphatasia. In: F.H. Glorieux, J. Pettifor and H. Juppner, Editors, *Pediatric bone*, Academic Press, Amsterdam. 651–678, 2003.

Connell, M.D., Dinwoodie, A.J., 1970. Diagnostic use of serum alkaline phosphatase isoenzymes and 5'-nucleotidase. *Clinica Chimica Acta* 30, 236-241.

De Paula Cognato, G. Ectonucleotidases e epilepsia: efeito de fármacos anticonvulsivantes e perfil ontogenético. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DeVivo, D.C., Leckie, M.P., Ferrendelli, J.S., McDougal, D.B., 1978. Chronic ketosis and cerebral metabolism. *Annals of Neurology* 3(4), 331-337.

Dixon, T.F., Purdom, M., 1954. Serum 5'-nucleotidase. *Journal of Clinical Pathology* 7, 341-343.

Dubé, C., Boyet, S., Marescaux, C., Nehlig, A., 2001b. Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Experimental Neurology* 167, 227-241.

Dubé, C., da Silva Fernandes, M.J., Nehlig, A., 2001a. Age-dependent consequences of seizures and the development of temporal lobe epilepsy in the rat. *Developmental Neuroscience* 23, 219-223.

Dubyak, G.R., 2000. Purinergic signaling at immunological synapses. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81(1-3), 64-68.

Giannini, E., Risso, D., Botta, F., Chiarbonello, B., Fasoli, A., Malfatti, F., Romagnoli, P., Testa, E., Ceppa, P., Testa, R., 2003. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Archives of Internal Medicine* 163(2), 218-24.

Goding, J.W., 2000. Ecto-enzymes: Physiology meets pathology. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 285-311.

Goding, J.W., Howard, M.C., 1998. Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunological Reviews* 161, 5-10.

Goldberg, D.M., 1973. 5'nucleotidase: recent advances in cell biology, methodology and clinical significance. *Digestion* 8, 87-99.

Goldman, L., Ausiello, D., 2004. *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia, Pennsylvania 22nd ed, single vol, pp 902.

Gutman, A.B., 1959. Serum alkaline phosphatase activity in diseases of the skeletal and hepatobiliary systems. A consideration of the current status. *The American Journal of Medicine* 27, 875-901.

Hill, P.G., Sammons, H.G., 1967a. An assessment of 5'nucleotidase as a liver function test. *The Quarterly Journal of Medicine* 36, 457-468.

Hill, P.G., Sammons, H.G., 1967b. An interpretation of the elevation of serum alkaline phosphatase in disease. *Journal of Clinical Pathology* 20, 654-659.

Hodson, A.W., Latner, A.L., Raine, L., 1962. Iso-enzymes of alkaline phosphatase. *Clinica Chimica Acta* 7, 255-261.

Honchar, M.P., Olney, J.W., Sherman, W.R., 1983. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 220, 323-325.

Janigro, D., 1999. Blood-brain barrier, ion homeostasis and epilepsy: possible implications towards the understanding of ketogenic diet mechanisms. *Epilepsy Research* 37, 223-232.

Jones, D.M., Esmaeil, N., Maren, S., Macdonald, R.L., 2002. Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Research* 50, 301-312.

Jope, R.S., Morrisett, R.A., Snead, O.C., 1986. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Experimental Neurology* 91, 471–480.

Leite, J.P., Garcia-Cairasco, N., Cavalheiro, E.A., 2002. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Research* 50, 93–103.

Morrisett, R.A., Jope, R.S., Snead, O.C., 1987a. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Experimental Neurology* 97, 193–200.

Morrisett, R.A., Jope, R.S., Snead, O.C., 1987b. Status epilepticus is produced by administration of cholinergic agonists to lithium-treated rats: comparison with kainic acid. *Experimental Neurology* 98, 594–605.

Nathwani, R.A., Pais, S., Reynolds, T.B., Kaplowitz, N., 2005. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* 41(2), 380-382.

Oses, J.P., Cardoso, C.M., Germano, R.A., Kirst, I.B., Rücker, B., Fürstenau, C.R., Wink, M.R., Bonan, C.D., Battastini, A.M., Sarkis, J.J.F., 2004. Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sciences* 74(26), 3275–3284.

Pagani, F., Panteghini, M., 2001. 5'-nucleotidase in the detection of increased activity of the liver form of alkaline phosphatase in serum. *Clinical Chemistry* 47(11), 2046-2048.

Pilla, C., Emanuelli, T., Frassetto, S.S., Battastini, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F., 1996. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7, 225–230.

Reichling, J., Kaplan, M., 1988. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Digestive Diseases and Sciences* 33, 1601-1614.

Reitman, S., Frankel, S.A., 1957. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology* 28, 56–63.

Resta, R., Yamashita, Y., Thompson, L.F., 1998. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunological Reviews* 161, 95-109.

Rigoulot, M.A., Koning, E., Ferrandon, A., Nehlig, A., 2004. Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308, 787-795.

Roberts, W.M., 1930. Variations in the phosphatase activity in the blood in disease. *British Journal of Experimental Pathology* 11, 90-95.

Roy, A.V., 1970. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clinical Chemistry* 16(5), 431-436.

Sakura, H., Nagashima, S., Nakashima, A., Maeda, M., 1998. Characterization of fetal serum 5'- nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thrombosis Research* 91, 83–89.

Sankar, R., Shin, D.H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A., Wasterlain, C.G., 1998. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *The Journal of Neuroscience* 18, 8382–8393.

Sarkis, J.J.F., Salto, C., 1991. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Research Bulletin* 129,47–55.

Schwartzkroin, P.A., 1999. Mechanisms underlying the anti-epileptic efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Research* 37, 171–180.

Song, C.S., Kappas, A., 1969. 5' nucleotidase of plasma membranes of the rat liver: studies and subcellular distribution. *Annals of the New York Academy of Sciences* 166, 565-73.

Stafstrom, C.E., 2004. Dietary approaches to epilepsy treatment: old and new options on the menu. *Epilepsy Currents* 4(6), 215-222.

Stefan, C., Jansen, S., Bollen, M., 2005. NPP-type ectophosphodiesterases: Unity in diversity. *Trends in biochemical sciences* 30, 542-550.

Taswell, H.F., Jeffers, D.M., 1963. Isoenzymes of serum alkaline phosphatase in hepatobiliary and skeletal disease. *American Journal of Clinical Pathology* 40, 349-356.

Thompson, M.D., Killoran, A., Percy, M.E., Nezarati, M., David E.C. Cole, D.E.C., Hwang, P.A. Hyperphosphatasia With Neurologic Deficit: A Pyridoxine-Responsive Seizure Disorder? *Pediatr Neurol.* 34(4):303-307, 2006.

Torres, I.L., Furstenuau, C.R., Dallegrave, E., Dallegreve, G., Stenzel, B., Dantas, G., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., Ferreira, M.B., 2007. Methylprednisolone administration alters adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *European Journal of Pharmacology* 60(2-3), 212-215.

Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W.A., Bortolotto, Z.A., Cavalheiro, E.A., 1989. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* 3, 154-171.

Turski, W.A., 2000. Pilocarpine-induced seizures in rodents-17 years on. *Polish Journal of Pharmacology* 52, 63–65.

Wachstein, M., Meisel, E., 1958. Substrate specific phosphatases at pH 7.2 in biliary obstruction and liver cell damage; special reference to the bile canaliculi in obstructive jaundice and liver-cell necrosis. *Archives of Pathology* 65, 449-459.

Wilder, R.M., 1921. The effects of ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clinic proceedings* 2, 307-308.

Wilot, L.C. O efeito do tratamento crônico com lítio sobre as nucleotidases em sinaptossomas e soro de ratos e na morte celular induzida por ATP. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

Yegutkin, G.G., 1997. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry-Moscow* 62, 724-728.

Yegutkin, G.G., Bodin, P., Burnstock, G., 2000. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* 129(5), 921-926.

Zhao, Q., Stafstrom, C.E., Fu, D.D., Hu, Y., Holmes, G.L., 2004. Detrimental effects of the ketogenic diet on cognitive function in rats. *Pediatric Research* 5(3), 498-506.

Zimmermann, H., 1992. 5'-nucleotidase-molecular structure and functional aspects. *The Biochemical Journal* 285, 345-365.

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. *Drug Development Research* 52, 44-56.

Tabela 1. Composition of control and ketogenic diets

Control	g/100 g	Ketogenic	g/100 g
Lard	4,5	Lard	65,5
Soy oil	0,5	Soy oil	2,0
Soy protein ¹	25	Soy Protein ¹	25
Fiber	1,0	Fiber	1,0
Salt Mix ²	4,0	Salt Mix ²	4,0
Vitamin Mix ³	1,0	Vitamin Mix ³	1,0
DL-methionine ⁴	0,3	DL-methionine ⁴	0,3
Carbohydrates	63,7	Carbohydrates	1,2

¹ Soy protein purity 92% (BUNGE).

² Mineral mixture (Roche, São Paulo, Brazil), mg/100 g of ration: NaCl, 557; KI, 3.2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄ · 7H₂O, 108; MnSO₄ · H₂O, 16; ZnSO₄ · 7H₂O, 2.2; CuSO₄ · 5H₂O, 1.9; and CoCl₂ · 6H₂O, 0.09.

³ Vitamin mixture (Roche, São Paulo, Brazil), mg/100 g of ration: vitamin A, 4; vitamin D, 0.5; vitamin E, 10; menadione, 0.5; choline, 200; PABA 10; inositol 10 mg; niacin, 4; pantothenic acid, 4; riboflavin, 0.8; thiamin, 0.5; pyridoxine, 0.5; folic acid, 0.2; biotin, 0.04; and vitamin B-12, 0.003.

⁴ DL-methionine (Delaware, Porto Alegre, Brazil)

Figure 1

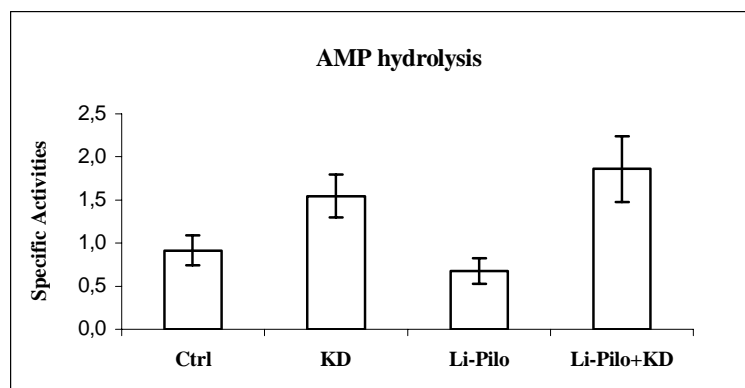
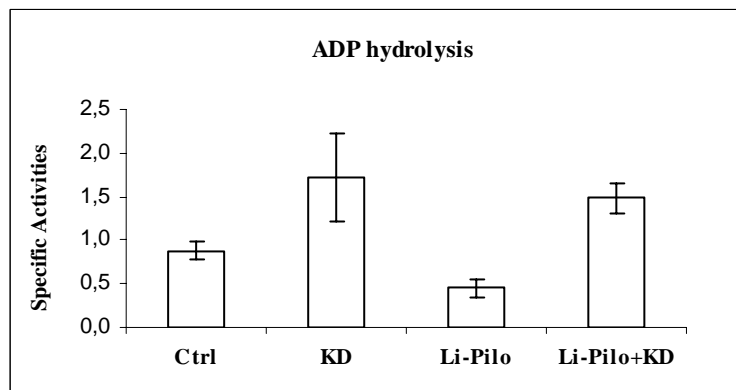
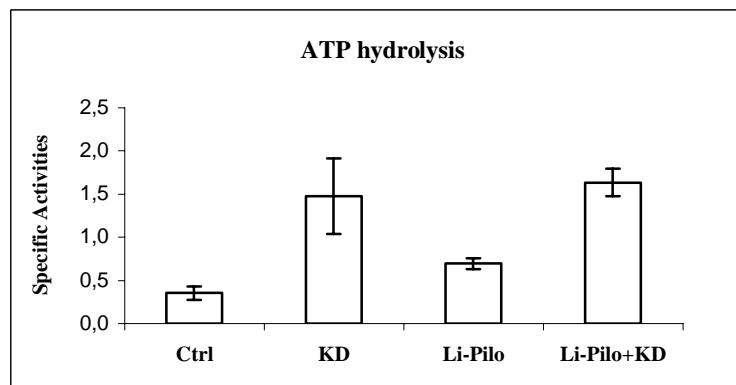


Figure 2

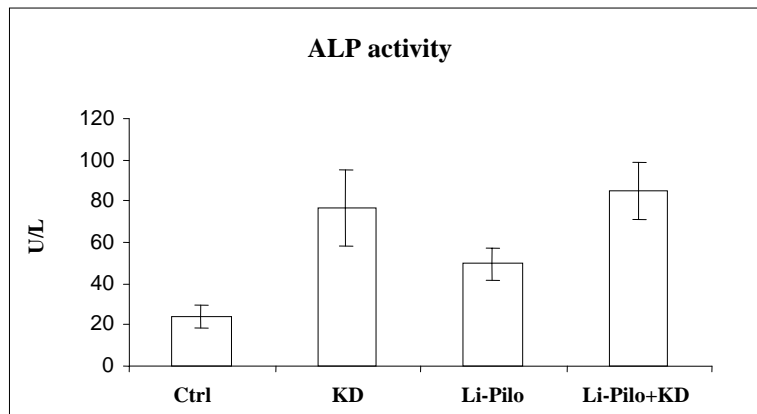
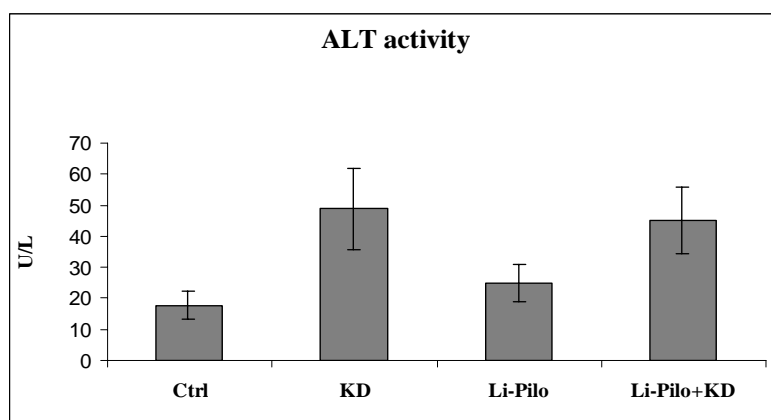
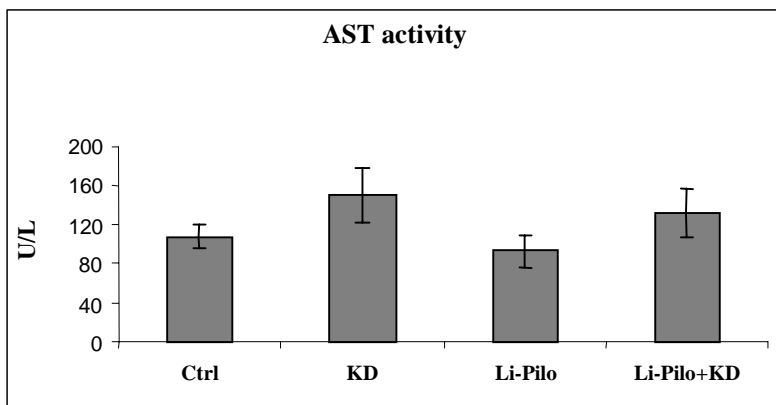


Figure 3



6. LEGENDS

Figure 1. ATP, ADP and AMP hydrolysis from rat blood serum. The animals were divided in four groups: Ctrl (received control diet); KD (received ketogenic diet); Li-Pilo (submitted to lithium-pilocarpine model and received control diet); and Li-Pilo+KD (submitted to lithium-pilocarpine model and received ketogenic diet). Bars represent means \pm S.D. of at least five animals. The results were analyzed by two-way ANOVA.

Figure 2. Alkaline phosphatase (ALP) activity from rat blood serum. The animals were divided in four groups: Ctrl (received control diet); KD (received ketogenic diet); Li-Pilo (submitted to lithium-pilocarpine model and received control diet); and Li-Pilo+KD (submitted to lithium-pilocarpine model and received ketogenic diet). Bars represent means \pm S.D. of at least five animals. The results were analyzed by two-way ANOVA.

Figure 3. Aspartate aminotranferase (AST) and alanine aminotranferase (ALT) activities from blood serum of rats. The animals were divided in four groups: Ctrl (received control diet); KD (received ketogenic diet); Li-Pilo (submitted to lithium-pilocarpine model and received control diet); and Li-Pilo+KD (submitted to lithium-pilocarpine model and received ketogenic diet). Bars represent means \pm S.D. of at least five animals. The results were analyzed by two-way ANOVA.

5. DISCUSSÃO

A dieta cetogênica vem sendo utilizada clinicamente por quase um século, mas ainda não se conhece exatamente seu mecanismo de ação. Entretanto, muitos progressos a este respeito foram realizados na década passada. O fato de que uma modificação fundamental na dieta possa ter efeitos terapêuticos nas doenças neurológicas reforça a importância da elucidação dos mecanismos de ação da dieta cetogênica.

No presente estudo nós utilizamos o modelo do lítio-pilocarpina para indução do SE em ratos. A administração sistêmica de uma alta dose de pilocarpina leva a uma excessiva estimulação colinérgica no cérebro, a qual se manifesta como uma alteração na atividade eletroencefalográfica, dano celular e convulsões (Cavalheiro et al., 1987; Tursky et al., 1989). O pré-tratamento com lítio tem sido mostrado por potencializar a atividade epilética induzida pela pilocarpina (Honchar et al., 1983). Estudos prévios demonstraram que o modelo do lítio-pilocarpina não produz um dano hipocampal substancial durante as duas primeiras semanas de vida (Cilio et al., 2003; Sankar et al., 1998).

No capítulo I, foi avaliado o ganho de peso dos ratos alimentados com as dietas controle e cetogênica. Os resultados mostraram um ganho de peso durante o tratamento em todos os grupos estudados, mas um menor ganho foi observado nos grupos cetogênicos entre a primeira e a quarta semanas após o início do tratamento. Esta diferença desapareceu após este período, permanecendo assim até o final do tratamento. Ziegler e colaboradores (2002) mostraram que ratos alimentados com KD tiveram um ganho de peso menor entre a sétima e a oitava semanas após o início do tratamento, igualando-se aos controles após dezesseis semanas. Em outros estudos usando ratos adultos, grupos cetogênicos e controle não diferiram quanto ao ganho de peso (Hori et

al., 1997). Possivelmente, tanto o ganho de peso bem como as modificações no limiar das crises convulsivas em ratos alimentados com KD dependem da idade (Bough & Eagles, 1999).

Embora diversas mudanças metabólicas e fisiológicas durante e após crises epiléticas em humanos e em animais experimentais têm sido demonstradas, pouca informação existe nas modificações do metabolismo periférico durante as crises epiléticas generalizadas. Experimentos *in vivo* mostram que ratos audiogênicos Wistar (WARs) machos tiveram uma significativa redução do metabolismo lipídico global, mostrado pela diminuição da concentração de triacilglicerol plasmático, bem como as atividades lipolítica e lipogênica do tecido adiposo (Botion & Doretto, 2003). Em nossos experimentos, os ratos que desenvolveram SE apresentaram uma diminuição do tecido adiposo retroperitoneal, sendo menos acentuada quando os ratos foram alimentados com KD.

A adenosina é uma substância antilipolítica, liberada do tecido adiposo e acumula-se no tampão de incubação quando células adiposas isoladas são incubadas *in vitro* (Fain & Wieser, 1975; Arch & Newsholme, 1978). A liberação de adenosina pelos adipócitos pode inibir a lipólise através da interação com receptores específicos de adenosina nas células adiposas. Estudos em tecido adiposo, *in vitro*, têm sugerido o envolvimento de receptores de adenosina do tipo A₁ (A₁AR) na regulação da deposição de gordura e de ácidos graxos plasmáticos e níveis de glicose (Smith et al., 1984; Schwabe et al., 1974; Green, 1983). Em adipócitos isolados, via A₁AR, a adenosina mimetiza a ação da insulina no metabolismo da glicose e dos lipídeos, inibe a lipólise, estimula a lipogênese e aumenta a ação antilipolítica da insulina (Schwabe et al., 1974), sendo esperado um aumento da gordura e do peso corporal. A adenosina também aumenta o transporte da glicose e facilita a regulação da insulina em adipócitos,

prevenindo a inibição da ação da insulina pelas catecolaminas (Smith et al., 1984; Green, 1983).

De acordo com estes dados, podemos propor que a indução das crises convulsivas pelo modelo do lítio-pilocarpina, bem como a KD podem estar promovendo uma inibição dos receptores de adenosina no tecido adiposo. Em nossos experimentos, os animais alimentados com KD apresentaram uma diminuição na quantidade de tecido adiposo retroperitoneal, sendo ainda mais acentuada nos grupos com indução do SE. Maiores estudos serão realizados para investigar esta possível relação entre KD, crises convulsivas e receptores de adenosina.

Segundo Burcelin et al. (2002), a utilização de glicose *in vitro*, na presença ou ausência de insulina, foi semelhante nos músculos isolados nos diferentes grupos de camundongos estudados (controle, obesos diabéticos, magros diabéticos e magros não diabéticos), alimentados com dieta hiperlipídica. Por outro lado, a glicose tecidual avaliada pelo acúmulo de 2-[¹⁴C] deoxiglicose, *in vivo*, estava reduzida na maioria dos músculos avaliados nos camundongos obesos diabéticos e aumentada nos magros não diabéticos, em relação aos valores dos camundongos controles. Nos camundongos magros diabéticos, a captação de glicose estava aumentada no diafragma, no coração e no músculo sóleo. *In vivo*, a elevada razão de liberação de glicose estava associada a uma maior utilização de glicose por todos os músculos analisados, indicando que esta liberação pode ser controlada por fator(es) distinto(s) da insulina. Portanto, estes dados estão de acordo com nossos resultados referentes à captação de U-[¹⁴C] deoxiglicose em músculo sóleo, os quais mostraram-se semelhantes tanto em ratos controle quanto cetogênicos, independente da indução de convulsão pelo modelo do lítio-pilocarpina.

Diversos estudos têm sugerido que o cérebro imaturo é menos vulnerável às alterações morfológicas e fisiológicas após a indução do SE (Sperber et al., 1991;

Stafstrom et al., 1993; Haas et al., 2001). Em comparação ao cérebro adulto, o cérebro em desenvolvimento é relativamente resistente ao dano morfológico causado pelo SE (Haut et al., 2004). Foi demonstrado que a indução de SE em ratos com 12 dias de idade não resulta em mudanças estruturais e funcionais detectáveis na vida adulta (Cílio et al., 2003).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que as atividades ectonucleotídicas de sinaptossomas de hipocampo e de córtex cerebral de ratos jovens de ambos os sexos (7-30 dias de idade) submetidos ao modelo da pilocarpina não apresentaram alteração quando comparadas a seus respectivos controles. Esse fato indica que essas atividades enzimáticas não são alteradas pelos fenômenos plásticos relacionados a epileptogênese em ratos jovens, pelo menos 7 dias após a indução do modelo de epilepsia (de Paula Cognato et al., 2005a). Tem sido reportado que ratos com idade superior a 17 dias e que foram tratados com pilocarpina desenvolveram crises espontâneas recorrentes, que caracterizam o período crônico desse modelo (Priel et al., 1996). Além disso, as atividades ectonucleotídicas de ratos adultos estão aumentadas no período crônico do modelo da pilocarpina (Bonan et al., 2000a). Neste trabalho, onde utilizamos o modelo do lítio-pilocarpina para indução do SE em fêmeas de 21 dias de idade, pudemos observar alterações nas ectonucleotidase em sinaptossoma de hipocampo, 45 dias após a indução do SE.

No presente trabalho, a atividade de hidrólise do ATP em sinaptossomas de hipocampo de ratos submetidos ao modelo lítio-pilocarpina e tratados com KD por 45 dias apresentou-se diminuída. Por outro lado, a atividade de hidrólise do ADP nos grupos de ratos controle e cetogênico, ambos submetidos ao modelo de convulsão utilizado, apresentou-se aumentada. Uma importante observação foi que estas alterações na atividade das ectonucleotidasas ocorreram devido ao modelo de convulsão do lítio-

pilocarpina e não à KD *per se*. Em relação a esses dados, possivelmente está ocorrendo a participação de diferentes NTPDases na fração sinaptossomal estudada.

O hipocampo tem sido bastante utilizado como um modelo para o estudo de mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica, tais como potenciação de longa duração (LTP), que ocorre após breve estimulação de alta frequência (100Hz) (Bliss & Collingridge, 1993). Estudos têm mostrado que o ATP exógeno, em baixas concentrações, é capaz de induzir potenciação sináptica em fatias hipocampais (Wieraszko & Seyfried, 1989; Fujii et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que a liberação de ATP é maior após estímulo de alta frequência (100Hz) utilizado para induzir LTP, e que, nesta condição, a via das ectonucleotidases contribui para a formação de adenosina extracelular (Cunha et al., 1996). O mecanismo através do qual o ATP extracelular induz uma LTP estável ainda não foi bem esclarecido. O envolvimento do sistema purinérgico na potenciação de longa-duração foi investigado através do uso de análogos rígidos do ATP (Wieraszko & Ehrlich, 1994). O ATP extracelular e seu análogo ATP- γ -S amplificaram permanentemente a magnitude das respostas analisadas, mas outros análogos rígidos do ATP não exerceram a mesma ação agonista. Portanto, estes autores sugerem que o mecanismo em questão poderia envolver um novo tipo de receptor purinérgico ainda não descrito ou que a hidrólise do fosfato-gama de ATP ou ATP- γ -S poderia ser uma condição necessária para a ocorrência deste efeito (Wieraszko & Ehrlich, 1994).

Estudos demonstram que o ATP extracelular atua como substrato para que as ecto-proteínas quinases possam induzir a LTP através da fosforilação de domínios extracelulares de proteínas de membrana na região CA1 do hipocampo (Fujii et al., 1995). Recentemente, foi demonstrado que um efeito cooperativo entre o ATP extracelular e os receptores NMDA é necessário para desencadear os processos

envolvidos na indução da LTP, possivelmente através do uso do ATP extracelular na fosforilação dos domínios extracelulares dos receptores NMDA (Fujii et al., 1999).

Levando-se em conta essas considerações, nossos resultados sugerem que a inibição significativa observada sobre a atividade do ATP em sinaptossoma de ratos epiléticos tratados com KD, aumentaria a disponibilidade deste ATP na fenda sináptica. O aumento dos níveis de ATP extracelular pode desempenhar um importante papel na modulação da eficiência sináptica através de diversos mecanismos. Apesar dos diversos efeitos dos agonistas de ATP sobre a LTP (Wierasko & Ehrlich, 1994), é possível especularmos que o aumento na disponibilidade de ATP permite a ativação de receptores P2 (P2X e P2Y). Cunha e Ribeiro (2000) sugerem que os receptores P2 agem em uma via modulatória, principalmente nos terminais pré-sinápticos do cérebro. A identificação de diversas subunidades de receptores P2X e P2Y em terminais nervosos do cérebro e a modulação da liberação de diversos tipos de neurotransmissores em diferentes regiões do cérebro e mesencéfalo suportam esses dados (Deuchars et al., 2001; Diaz-Hernandez et al., 2001; Schäfer & Reiser, 1997; Simon et al., 1997). Além disso, a ativação dos receptores P2X estimula a liberação de glutamato nas sinapses sensoriais, um evento associado a situações fisiológicas e patológicas (Gu & MacDermott, 1997). A co-liberação de ATP com diversos neurotransmissores (Zimmermann, 1994), incluindo glutamato (Wieraszko et al., 1989), dos terminais nervosos, levanta a possibilidade de interação entre os componentes purinérgicos e glutamatérgicos da transmissão sináptica.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram um aumento na atividade das nucleotidases em soro sangüíneo de ratos que receberam uma única injeção de pentilenotetrazol (Bruno et al., 2002). É importante considerar que sob estimulação elétrica, os nervos simpáticos liberam não somente ATP, mas também

enzimas solúveis que podem agir em conjunto com ectonucleotidases de membrana na degradação do ATP até adenosina (Todorov et al., 1997).

A presença de nucleotidases no plasma humano foi primeiramente sugerida por Jorgensen (1956). Uma preparação parcialmente purificada de plasma humano foi desenvolvida para hidrolisar ATP e ADP, sugerindo a presença de uma apirase no plasma que poderia hidrolisar seqüencialmente ATP a ADP e, então, a AMP (Holmsen & Holmsen, 1971; Coade & Pearson, 1989). Entretanto, Mills (1966) mostrou que a incubação de γ -[³²P]ATP no plasma produz pirofosfato, sugerindo que o ATP também pode ser hidrolisado diretamente a AMP por uma pirofosfatase/fosfodiesterase (PDEase) plasmática. A NTPDase e a PDEase, com diferentes parâmetros cinéticos, podem estar presentes no organismo como um duplo sistema para manutenção da homeostase. Embora a NTPDase e a PDEase compartilhem traços comuns, características distintas existem entre elas. Estas diferenças sugerem que as duas enzimas são distintamente reguladas e que podem agir em diferentes contextos de sinalização (Oses et al., 2004).

Devido às ações protetoras da KD na epilepsia não estarem claramente identificadas e as nucleotidases estarem associadas a mudanças plásticas induzidas pelo SE, tem sido importante estudarmos a correlação entre estes dois parâmetros. Nossos resultados mostraram que, no soro sangüíneo de ratos Wistar fêmeas, a indução do SE pelo modelo do lítio-pilocarpina causou um aumento da hidrólise do ATP e uma diminuição da hidrólise do ADP. A KD por sua vez, foi capaz de aumentar a hidrólise destes três nucleotídeos e a interação entre esta dieta e o SE causou aumento da hidrólise do AMP.

De acordo com De Paula Cognato (2005b), o SE induzido pelo modelo da pilocarpina causou um aumento da hidrólise do ATP, ADP e AMP em soro sangüíneo

de ratos. Já Wilot (2004) mostrou que o tratamento crônico com lítio diminuiu a hidrólise destes nucleotídeos em soro de ratos. Neste trabalho, apesar de utilizarmos o lítio em uma única dose, podemos propor que sua ação foi capaz de contrapor o efeito da pilocarpina na hidrólise do ADP, mas não foi suficiente para inibir o aumento da hidrólise do ATP causado pela pilocarpina. Entretanto, maiores estudos devem ser realizados para que seja investigado o mecanismo de inibição do lítio sobre as nucleotidasas do soro.

Dixon e Purdom (1954) foram os primeiros a observar que 5'-NT sérica pode ser clinicamente usada para diferenciar entre o diagnóstico de doenças hepatobiliares e ósseas. No diagnóstico de doença hepática, a FAL e a GGT possuem uma boa sensibilidade, mas não são específicas (Reichling & Kaplan 1988). Um aumento na atividade da 5'-NT foi mostrado como específico para distúrbios no fígado e árvore biliar (Hill & Sammons 1967, Song & Kappas 1969), exceto em casos de tumores ou metástases (Sunderman 1990, Lal et al. 1989, Chatterjee et al. 1981, Dao et al. 1980, Reddi 1980, Ip & Dao 1978). Nos casos de aumento isolado nas atividades de FAL e GGT, a medida da 5'-NT pode ajudar no diagnóstico de doença hepática (Reichling & Kaplan 1988).

Em pacientes com aumento sérico na atividade da 5'-NT e com FAL hepática normal existe uma alta probabilidade de presença de doença hepática, confirmando que um aumento na atividade da 5'-NT é bastante específico no diagnóstico de patologias hepatobiliares (Pagani & Panteghini 2001). O motivo para esta especificidade não é bem conhecido, mas pode estar relacionado com a sua localização nas membranas intracelulares. Detergentes como ácidos biliares podem ser necessários para a solubilização da enzima e, concentrações necessárias para que isso aconteça podem ocorrer somente na doença hepática (Reichling & Kaplan 1988).

A razão entre AST/ALT tem sido avaliada em estudos prévios realizados em pacientes com doenças hepáticas agudas e crônicas de várias origens. Nestes pacientes, a razão AST/ALT forneceu informações clínicas úteis a respeito da causa e severidade da doença hepática (Cohen & Kaplan, 1979; Gitlin, 1982; Himmelstein et al., 1984; Williams & Hoofnagle, 1988; Sheth et al., 1998; Sorbi et al., 1999). Giannini e colaboradores (2003) sugerem que a determinação desta razão AST/ALT seja utilizada em situações clínicas bem definidas, devido à relação destas enzimas com o estágio da doença (tanto histológico quanto clínico) e com a função hepática. Além disso, a razão AST/ALT parece ser uma ferramenta útil para pacientes com cirrose, uma vez que é capaz de graduar a doença, o que seria interessante para avaliar o prognóstico da modificação na razão AST/ALT ao longo do tempo.

De uma forma geral, os resultados apresentados neste trabalho nos permitem observar que as ectonucleotidases apresentam suas atividades diferentemente alteradas na epilepsia. Em sinaptossoma hipocampal, a indução do SE pelo modelo do lítio-pilocarpina, mas não a KD, promoveu uma alteração nas ectonucleotidases que hidrolisam ATP e ADP. Já no soro, a indução do SE por este modelo causou um aumento da hidrólise do ATP e uma diminuição da hidrólise do ADP. Além disso, a KD provocou um aumento da hidrólise de ATP, ADP e AMP, bem como da atividade das enzimas FAL, ALT e AST, levando-nos a propor o desenvolvimento de lesões hepáticas durante o tratamento com KD.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e apresentados no presente estudo nos permitem concluir que:

- Os animais mostraram um ganho de peso durante o tratamento em todos os grupos estudados, mas um menor ganho foi visto nos grupos cetogênicos, tanto salina quanto lítio-pilocarpina, nas semanas 1-3 após o início do tratamento. Esta diferença desapareceu após a quarta semana, permanecendo assim até o final do tratamento.
- Os animais que desenvolveram SE apresentaram uma diminuição do tecido adiposo retroperitoneal, independente da dieta oferecida.
- A captação de U-[¹⁴C] deoxiglicose em músculo sóleo foi semelhante tanto em ratos controle quanto cetogênicos, independente da indução de convulsão pelo modelo do lítio-pilocarpina.
- Ratos fêmeas, que tiveram indução do SE pelo modelo do lítio-pilocarpina aos 21 dias de idade, apresentaram diminuição na atividade de hidrólise do ATP e aumento na atividade de hidrólise do ADP em sinaptossoma de hipocampo após 45 dias da indução do SE.

- A dieta cetogênica *per se* não alterou as atividades das ectonucleotidases em sinaptossoma de hipocampo de ratos fêmeas tratadas com esta dieta durante 45 dias, iniciando- a aos 22 dias de idade.
- Não observamos interação entre a KD e a indução do SE na hidrólise dos nucleotídeos em sinaptossoma de hipocampo de ratos.
- Em soro de ratos, a indução do SE pelo modelo do lítio-pilocarpina aumentou a hidrólise do ATP e diminuiu a hidrólise do ADP.
- O tratamento com KD foi capaz de aumentar a hidrólise de ATP, ADP e AMP no soro sanguíneo de ratos Wistar fêmeas, bem como a atividade das enzimas ALP, AST e ALT, consideradas marcadoras de lesão hepática.

Portanto, nosso trabalho contribui para um melhor entendimento a respeito das implicações da dieta cetogênica sobre as NTPDases, enzimas envolvidas no mecanismo da epileptogênese. Além disso, o efeito da dieta cetogênica sobre parâmetros metabólicos, tais como as aminotransferases, a fosfatase alcalina e a 5'-nucleotidase, demonstra que a terapia crônica com esta dieta pode levar a danos hepáticos.

7. PERSPECTIVAS

Com base nos conhecimentos adquiridos com o presente trabalho, ficam como perspectivas:

- 1) Investigar se existe uma relação entre a KD, crises convulsivas e os receptores de adenosina, uma vez que em nosso estudo, os ratos que desenvolveram SE apresentaram uma diminuição do tecido adiposo retroperiotoneal, o qual foi parcialmente revertido com a KD.
- 2) Estudar as vias de sinalização envolvidas no modelo do lítio-pilocarpina para indução do SE.
- 3) Investigar quais NTPDases estão envolvidas na alteração da hidrólise de ATP e ADP em sinaptossoma de hipocampo de ratos com indução de convulsão pelo modelo do lítio-pilocarpina.
- 4) Estudar o efeito da KD em ratos adultos com indução de SE pelo modelo da pilocarpina, uma vez que este modelo já foi padronizado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório.
- 5) Estudar os possíveis efeitos da KD sobre os receptores de adenosina em hipocampo de ratos epiléticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO, M.P.; SAFFREY, M.J.; PÓQUER, V.; BURNSTOCK, G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience* 59:67-76, 1994.
- ABBRACCHIO, M.P.; BOEYNAEMS, J.M.; BARNARD, E.A.; BOYER, J.L.; KENNEDY, C.; MIRAS-PORTUGAL, M.T.; KING, B.F.; GACHET, C.; JACOBSON, K.A.; GARY, A.; WEISMAN, G.A.; BURNSTOCK, G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in Pharmacol Sci.* 24(2):52-55, 2003.
- ABBRACCHIO, M.P.; CERUTI, S.; BRAMBILLA, R.; BARBIERI, D.; CAMURRI, A.; FRANCESCHI, C.; GIAMMARIOLI, A.M.; JACOBSON, K.A.; CATTABENI, F.; MALORNI, W. Adenosine A₃ receptors and viability of astrocytes. *Drug Dev Res.* 45:379-386, 1998.
- AIRAS, L.; HELLMAN, J.; SALMI, M.; BONO, P.; PUURUNEN, T.; SMITH, D.J.; JALKANEN, S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med.* 182(5):1603-1608, 1995.
- AL-MUDALLAL, A.S.; LaMANNA, J.C.; LUST, W.D.; HARIK, S.I. Diet-induced ketosis does not cause cerebral acidosis. *Epilepsia.* 37:258-261, 1996.
- ANGELATOU, F.; PAGONOPOULOU, O.; KOSTOPOULOS, G. Alterations of A₁ adenosine receptors in different mouse brain areas after pentylentetrazol-induced seizures, but not in the epileptic mutant mouse 'tottering'. *Brain Res.* 534(1-2):251-256, 1990.
- ANGELATOU, F.; PAGONOPOULOU, O.; MARAZIOTIS, T.; OLIVIER, A.; VILLEMEURE, J.G.; AVOLI, M.; KOSTOPOULOS, G. Upregulation of A₁ adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy: a quantitative autoradiographic study. *Neurosci Lett.* 163:11-14, 1993.

- APPLETON, D.B.; DeVIVO, D.C. An animal model for the ketogenic diet. *Epilepsia*. 15:211-227, 1974.
- ARCH, J.R.S.; NEWSHOLME, E.A. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem.* 14:82-121, 1978.
- BALASSE, E.O.; FERY F.; NEEF, M.A. Changes induced by exercise in rates of turnover and oxidation of ketone bodies in fasting man. *J Appl Physiol.* 44(1):5-11, 1978.
- BALASSE, E.O.; FERY F. Ketone body production and disposal in diabetic ketosis. a comparison with fasting ketosis. *Diabetes*. 34:326-332, 1985.
- BANJAC, A.; NEDELJKOVIC, N.; HORVAT, A.; KANAZIR, D.; NIKEZIC, G. Ontogenetic profile of ecto-ATPase activity in rat hippocampal and caudate nucleus synaptic plasma membrane fractions. *Physiol Res.* 50(4):411-417, 2001.
- BATTASTINI, A.M.O., OLIVEIRA, E.M., MOREIRA, C.M., BONAN, C.D., SARKIS, J.J.F., DIAS, R.D. Solubilization and Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Int.*, 37:209-219, 1991.
- BIANCHI, V.; SPYCHALA, J. Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem.* 278(47): 46195-46198, 2003.
- BIRD, G.L.A. Investigation of alcoholic liver disease. *Bailliere's Clin Gastroenterol.* 7:663-682, 1993.
- BLISS, T.V.P. and COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term-potentiation in the hippocampus. *Nature (London)*. 361:31-39, 1993.
- BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res.* 26(8-9):959-969, 2001.
- BONAN, C.D.; WALZ, R.; PEREIRA, G.S.; WORM, P.V.; BATTASTINI, A.M.; CAVALHEIRO, E.A.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J. Changes in synaptosomal

- ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 39 :229-238, 2000a.
- BONAN, C.D.; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I.C.; WALZ, R.; BATTASTINI, A.M.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J. Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 25(6):775-9, 2000b.
- BOTION, L.M.; DORETTO, M.C. Changes in peripheral energy metabolism during audiogenic seizures in rats. *Physiol Behav.* 78:535-541, 2003.
- BOUGH, K.J.; EAGLES, D.A. A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Epilepsia.* 40:138-143, 1999.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54, 1976.
- BRAUN, N.; BRENDEL, P.; ZIMMERMANN, H. Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 88(1):79-86, 1995.
- BRAUN, N.; LENZ, C.; GILLARDON, F.; ZIMMERMANN, M.; ZIMMERMANN, H. Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res.* 766(1-2):213-226, 1997.
- BRUNDEGE, J.M.; DUNWIDDIE, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol.* 39:353-391, 1997.
- BRUNO, A.N.; OSES, J.P.; AMARAL, O.; COITINHO, A.; BONAN, C.D.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J. Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylenetetrazol-kindling. *Mol Brain Res.* 114(2):140-145, 2003.
- BRUNO, A.N.; OSES, J.P.; BONAN, C.D.; WALZ, R.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J. Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentilenetetrazol. *Neurosci Res.* 43(3):283-288, 2002.

- BURCELIN, R.; CRIVELLI, V.; DACOSTA, A.; ROY-TIRELLI, A.; THORENS, B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E834–E842, 2002.
- BURNSTOCK G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*, pp. 107-118. Eds L. Bolis and R. W. Straub. Raven, New York 1978.
- BURNSTOCK, G. P2 purinoreceptors: historical perspective and classification. *Ciba Found. Symp.* 198:1-28, 1996.
- BURNSTOCK, G. Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull.* 50(5-6):355-357, 1999.
- BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24:509-581, 1972.
- BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. *J. Theor. Biol.* 62:491-503, 1976.
- CARAKOSTAS, M.C.; POWER, R.J.; BANERJEE, A.K. Serum 5'nucleotidase activity in rats: a method for automated analysis and criteria for interpretation. *Vet Clin Pathol.* 19(4):109-113, 1990.
- CARVEY, P.M.; KAO, L.G.; ZHANG, T.J.; AMDUR, R.L.; LIN, D.H.; SINGH, R.; KLAWANS, H.L. Dopaminergic alterations in treatment attenuating haloperidol-induced hypersensitivity. *Pharmacol Biochem Behaviour.* 35:291-3000, 1990.
- CASEBOLT, T.I.; JOPE, R.S. Long-term lithium treatment selectively reduces receptor-coupled inositol phospholipid hydrolysis in rat brain. *Biol Psychiatry.* 25:329-340, 1989.
- CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 16:33-37, 1995.
- CAVALHEIRO, E.A.; SILVA, D.F.; TURSKI, W.A.; CALDERAZZO-FIHLO, L.S.; BORTOLOTTI, A.; TURSKI, L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Dev Brain Res.* 37:43-58, 1987.

- CHAN, K., DELFERT, D., JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.*, 157:375-380, 1986.
- CHATTERJEE, S.K.; BHATTACHARYA, M.; BARLOW, J.J. Evaluation of 5'-nucleotidase as an enzyme marker in ovarian carcinoma. *Cancer*. 47(11):2648-2653, 1981.
- CILIO, M.R.; SOGAWA, Y.; CHA, B.H.; LIU, Z.; HUANG, L-T.; HOLMES, G.L. Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are age-and model-specific. *Epilepsia*. 44:518-528, 2003.
- CLIFFORD, D.B.; OLNEY, J.W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R.C.; ZORUMSKI, C.F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*. 23:953-968, 1987.
- COADE, S.B.; PEARSON, J.D. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res*. 65(3):531-37, 1989.
- COHEN, J.A.; KAPLAN, M.M. The SGOT/SGPT ratio - an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci*. 24(11):835-838, 1979.
- CULLINGFORD, T.E. The ketogenic diet; fatty acids, fatty acid-activated receptors and neurological disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 70(3):253-264, 2004.
- CUNHA, R.A.; VIZI, E.S.; RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M. Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J Neuroch*. 67:2180-2187, 1996.
- CUNHA, R.A.; RIBEIRO, J.A. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci*. 68:119-137, 2000.
- DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev Neurosci*. 20:358-364, 1998.

- DAO,T.L.; IP, C.; PATEL, J. Serum sialyltransferase and 5'-nucleotidase as reliable biomarkers in women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 65(3):529-34, 1980.
- DE PAULA COGNATO, G.; BRUNO, A.N.; VUADEN, F.C.; SARKIS, J.J.; BONAN, C.D. Ontogenetic profile of ectonucleotidase activities from brain synaptosomes of pilocarpine-treated rats. *Int J Dev Neurosci.* 23(8):703-9, 2005a.
- DE PAULA COGNATO, G. Ectonucleotidasas e epilepsia: efeito de fármacos anticonvulsivantes e perfil ontogenético. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- DEUCHARS, S.A.; ATKINSON, L.; BROOKE, R.E.; MUSA, H.; MILLIGAN, C.J.; BATTEN, T.F.; BUCKLEY, N.J.; PARSON, S.H.; DEUCHARS, J. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 21:7143–7152, 2001.
- DeVIVO, D.C.; LECKIE, M.P.; FERRENDELLI, J.S.; McDOUGAL, D.B.Jr. Chronic ketosis and cerebral metabolism. *Ann Neurol.* 3:331-337, 1978.
- DIAZ-HERNANDEZ, M.; GOMEZ-VILLAFUERTES, R.; HERNANDO, F.; PINTOR, J.; MIRAS-PORTUGAL, M.T. Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X3 subunits. *Neurosci Lett.* 301:159–162, 2001.
- DiMARIO, F.J.Jr.; HOLLAND, J. The ketogenic diet: A review of the experience at Connecticut Children's Medical Center. *Pediatr Neurol.* 26(4):288-292, 2002.
- DIXON, T.F.; PURDOM, M. Serum 5'-nucleotidase. *J Clin Pathol.* 7:341-343, 1954.
- DRAGUNOW, M. Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog Neurobiol.* 31:85-108, 1988.
- DUBÉ, C.; MARESCAUX, C.; NEHLIG, A. A metabolic and neuropathological approach to the understanding of plastic changes occurring in the immature and adult rat brain during lithium-pilocarpine induced epileptogenesis. *Epilepsia.* 41(Suppl. 6):S36-S43, 2000.

- DUBÉ, C., DA SILVA FERNANDES, M.J., NEHLIG, A. Age-dependent consequences of seizures and the development of temporal lobe epilepsy in the rat. *Dev Neurosci.* 23, 219-223, 2001a.
- DUBÉ, C., BOYET, S., MARESCAUX, C., NEHLIG, A. Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Exp Neurol.* 167:227-241, 2001b.
- DUNWIDDIE, T.V.; DIAO, L.; KIM, H.O.; JIANG, J.-L.; JACOBSON, K.A. Activation of hippocampal adenosine A₃ receptors produces a desensitization of A₁ receptor mediated responses in rat hippocampus. *J Neurosci.* 17:607–614, 1997.
- DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 24:31-55, 2001.
- DURING, M.J.; SPENCER, D.D. Adenosine: a mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol.* 32:618-624, 1992.
- ERECINSKA, M.; NELDON, D.; DIAKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes: fluxes through enzymes of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium, and ketone bodies. *J Neurochem.* 67:2325-2334, 1996.
- FAIN, J. N.; WIESER, P.B. Effects of adenosine deaminase on cyclic adenosine monophosphate accumulation, lipolysis and glucose metabolism of fat cells. *J Biol Chem.* 250:1027-1034, 1975.
- FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 53(4):527-552, 2001.
- FREEMAN, J.M.; KELLY, J.B. The epilepsy diet treatment: An introduction to the ketogenic diet. *New York: Demos Press*, 1994.

- FREEMAN, J.M.; VINING, E.P.G.; PILLAS, D.J.; PYZIK, P.L., CASEY, J.C.; KELLY, M.T. A prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics*. 102:1358-1363, 1998.
- FUCHS, J.L. 5'-Nucleotidase activity increases in aging rat brain. *Neurobiol Aging*. 12:523-530, 1991.
- FUJII, S.; KATO, H.; FURUSE, H.; ITO, K.-I.; OSADA, H.; HAMAGUCH, T.; KURODA, Y. The mechanisms of ATP-induced long-term potentiation involves extracellular phosphorylation of membrane proteins in guinea pig hippocampal CA1 neurons. *Neurosc Lett*. 187:130-132, 1995.
- FUJII, S.; KATO, H.; KURODA, Y. Extracellular adenosine 5'-triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Neurosc Lett*. 276:21-24, 1999.
- GE, S.; NIESEN, C.E. Beta-hydroxybutyrate potentiates GABA-A mediated inhibitory postsynaptic potentials in immature hippocampal CA1 neurons. *Epilepsia*. 39(suppl. 6):135, 1998.
- GIANNINI, E.; RISSO, D.; BOTTA, F.; CHIARBONELLO, B.; FASOLI, A.; MALFATTI, F.; ROMAGNOLI, P.; TESTA, E.; CEPPA, P.; TESTA, R. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Arch Intern Med*. 163(2):218-24, 2003.
- GITLIN M. The serum glutamic oxaloacetic transaminase/serum glutamic pyruvic transaminase ratio as a prognostic index in severe acute viral hepatitis. *Am J Gastroenterol*. 77:2-4, 1982.
- GOTTBERG, E.; DIOP, L.; MONTREVIL, B.; READER, T.A. Effects of sodium, lithium and magnesium on in vitro binding of [³H]SCH 23390 in rat neo striatum and cerebral cortex. *Neurochem Res*. 14(5):419-426, 1989a.

- GOTTBERG, E.; GRONDIN, L.; READER, T.A. Acute effects of lithium on catecholamines, serotonin and their major metabolites in discrete brain regions. *J Neurosci Res.* 22:338-345, 1989b.
- GREEN, A. Catecholamines inhibit insulin-stimulated glucose transport in adipocytes, in the presence of adenosine deaminase. *FEBS Lett.* 152:261-264, 1983.
- GROBBEN, B.; ANCIAUX, K.; ROYMANS, D.; STEFAN, C.; BOLLEN, M.; ESMANS, E.L.; SLEGERS, H. An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. *J Neurochem.* 72(2):826-834, 1999.
- GROBBEN, B.; CLAES, P.; ROYMANS, D.; ESMANS, E.L.; HARRY VAN ONCKELEN, H.V.; SLEGERS, H. Ecto-nucleotide pyrophosphatase modulates the urinoceptor-mediated signal transduction and is inhibited by purinoceptor antagonists. *Br J Pharmacol.* 130:139-145, 2000.
- GU, J.G.; MACDERMOTT, A.B. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature.* 389:749-753, 1997.
- GUZMÁN, M.; BLÁZQUEZ, C. Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrin Metab.* 12:169-173, 2001.
- HAAS, K.Z.; SPERBER, E.F.; OPANASHUK, L.A.; STANTON, P.K.; MOSHÉ, S.L. Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus.* 11:615-625, 2001.
- HAUT, S.R.; VELISKÓVA, J.; MOSHÉ, S.L. Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *The Lancet Neurobiology.* 3(10):608-617, 2004.
- HAWKINS, R.A.; MANS, A.M.; DAVIS, D.W. Regional ketone body utilization by rat brain in starvation and diabetes. *Am J Physiol.* 250:E169-E178, 1986.
- HEILBRON, A.; MAIENSCHIN, V.; CARSTENSEN, K.; GANN, W.; ZIMMERMANN, H. Crucial role of ecto-5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells. *Neuroreport.* 7(1):257-261, 1995.

- HEILBRONN, A.; ZIMMERMANN, H. 5'-nucleotidase actives and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells. *Eur J Neurosci.* 7:1172-1179, 1995.
- HEYMANN, D., REDDINGTON, M., KREUTZBERG, G.W. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.*, 43(4):971-8, 1984.
- HILL, P.G.; SAMMONS, H.G. An assessment of 5' nucleotidase as a liver function test. *Q J Med.* 36:457-468, 1967.
- HIMMELSTEIN, D.U.; WOOLHANDLER, S.J.; ADLER, R.D. Elevated SGOT/SGPT ratio in alcoholic patients with acetaminophen hepatotoxicity. *Am J Gastroenterol.* 79(9):718-720, 1984.
- HOLMSEN, I.; HOLMSEN, H. Partial purification and characterization of an ADP phosphohydrolase from human plasma. *ThrombDiath Haemorrh.* 26:177-91, 1971.
- HOLTON, F.A.; HOLTON, P. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol.* 126(1):124-140, 1954.
- HOLTON, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol.* 145(3):494-504, 1959.
- HONCHAR, M.P.; OLNEY, J.W.; SHERMAN, W.R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science.* 220:323-325, 1983.
- HONCHAR, M.P.; OLNEY, J.W.; SHERMAN, W.R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science.* 238:323-325, 1983.
- HORI, A.; TANDON, P.; HOLMES, G.L.; STAFSTROM, C.E. Ketogenic diet: effects on expression of kindled seizures and behavior in adult rats. *Epilepsia.* 38:750-758, 1997.

- HRUSKA, R.E.; LUDMER, L.M.; PERT, A.; BUNNEY, W.E.Jr. Effects of lithium on [³H] quinuclidinyl benzilate binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors. *J Neurosci Res.* 11:171, 1984.
- IMPAGNATIELLO, F.; BASTIA, E.; ONGINI, E.; MONOPOLI, A. Adenosine receptors in neurological disorders. *Emerg Ther Targets.* 4:635-664, 2000.
- IP, C.; DAO, T. Alterations in serum glycosyltransferases and 5'-nucleotidase in breast cancer patients. *Cancer Res.* 38(3):723-8, 1978.
- JONES, P.A.; SMITH, R.A.; STONE, T.W. Protection against kainate-induced excitotoxicity by adenosine A_{2A} receptor agonists and antagonists. *Neuroscience.* 85:229-237, 1998.
- JOPE, R.S. Effects of lithium treatment in vitro and in vivo on acetylcholine metabolism in rat brain. *J Neurochem.* 22:376-384, 1979.
- JORGENSEN, S. Breakdown of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides in human plasma. *Acta Pharmacol Toxicol.* 12(3):294-302, 1956.
- KASHIWAYA, Y.; TAKESHIMA, T.; MORI, N.; NAKASHIMA, K.; CLARKE, K.; VEECH, R.L. D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci.* 97:5440-5444, 2000.
- KOZLOWSKI, M.R.; NEVE, K.A.; GRISHAM, J.E.; MARSHALL, J.F. Chronic lithium administration alters behavioural recovery from nigrostriatal injury: effects on neostriatal [³H]spiroperidol binding sites. *Brain Res.* 156:290-200, 1983.
- KRISMAN, R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem.* 4:17-23, 1962.
- KUBOVA, H.; DRUGA, R.; LUKASIAK, K.; SUCHOMELOVA, L.; HAUGVICOVA, R.; JIRMANOVA, I.; PITKANEN, A. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J Neurosci.* 21:3593-3599, 2001.

- KULKARNI, S.K.; GEORGE, B. Lithium-pilocarpine neurotoxicity: a potential model of status epilepticus. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 17(8):551-567, 1995.
- LAL, H.; KUMAR, L.; KOHLI, G.S.; SHARMA, A.; GOEL, H. Serum enzymes in head and neck cancer. IV: 5-nucleotidase. *J Laryngol Otol*. 103(2):200-202, 1989.
- LEFEVRE, F.; ARONSON, N. Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy in children: A systematic review of efficacy. *Pediatrics*. 105(4):E46, 2000.
- LUDWIG, J.; VIGGIANO, T.R.; MCGILL, D.B.; et al. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980;55:434-8, 1980.
- MAHONEY, A.W.; HENDRICKS, D.G.; BERNARD, N.; SISSON, D.V. Fasting and ketogenic diet effects on audiogenic seizure susceptibility of magnesium deficient rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 18:683-687, 1983.
- MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.; ISLAM, N.; ALYONYCHEVA, T.N.; SAFIER, L.B.; HAJJAR, K.A.; POSNETT, D.N.; SCHOENBORN, M.A.; SCHOOLEY, K.A.; GAYLE, R.B.; MALISZEWSKI, C.R. The endothelial cell ecto-ATPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest*. 99(6):1351-1360, 1997.
- MASUDA R, MONAHAN JW, KASHIWAYA Y. D-beta-hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *J Neurosci Res*. 80:501-509, 2005.
- MENDONÇA, A.; SEBASTIÃO, A.M.; RIBEIRO, J.A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res. Rev*. 33:258-274, 2000.
- MERRIT, H.H.; PUTNAM, T.J. Sodium diphenylhydantoinate in the treatment of convulsive disorders. *J Am Med Assoc*. 111:1068-1073, 1938.
- MILLICHAP, J.G.; JONES, J.D.; RUDIS, B.P. Mechanism of anticonvulsant action of ketogenic diet. *Am J Diseases Child*. 107:593-604, 1964.

- MILLS, D.C.B. The breakdown of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate in plasma. *Biochem J.* 98:32p-33p, 1966.
- MINAMI T, SHIMIZU N, DUAN S, OOMURA Y. Hypothalamic neuronal activity responses to 3-hydroxybutyric acid, an endogenous organic acid. *Brain Res.* 509:351–354, 1990.
- MORRIS, A.A. Cerebral ketone body metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 28:109–121, 2005.
- MORRISON, J.M.; PRITCHARD, J.R.; H.D.; BRANDE, M.C.; DÁGUANNO, W. Plasma and brain lithium levels after lithium carbonate and lithium chloride administration by different routes in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 137:889-892, 1971.
- MÜLLER, J.; ROCHA, J.B.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J.; DIAS, R.D. Ontogeny of ATP and ADP hydrolysis by cerebral cortex synaptosomes from rats. *Braz J Med Biol Res.* 23:935-939, 1990.
- MULLER-SCHWARZE, A.B.; TANDON, P.; LIU, Z.; YANG, Y.; HOLMES, G.L.; STAFSTROM, C.E. Ketogenic diet reduces spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the kainic acid model. *Neuroreport.* 10:1517-1522, 1999.
- NAGY, A.K.; HOUSER, C.R.; DELGADO-ESCUETA, A.V. Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. *Brain Res.* 529(1-2):192-201, 1990.
- NAKAZAWA, M.; KODAMA, S.; MATSUO, T. Effects of ketogenic diet on electroconvulsive threshold and brain contents of adenosine nucleotides. *Brain Dev.* 5:375-380, 1983.
- NATHWANI, R.A., PAIS, S., REYNOLDS, T.B., KAPLOWITZ, N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology.* 41(2):380-382, 2005.
- NEUSCHWANDER-TETRI, B.A.; BACON, B.R. Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am.* 80:1147– 1166, 1996.

- NIESEN, C.E.; GE, S. The effect of ketone bodies, beta-hydroxybutyrate and acetoacetate on acute seizure activity in hippocampal CA1 neurons. *Epilepsia*. 39(suppl. 6):35, 1998.
- OLAH, M.; STILES, G.L. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Ther*. 85:55–75, 2000.
- ONGINI, E.; ADAMI, M.; FERRI, C.; BERTORELLI, R. Adenosine A_{2A} receptors and neuroprotection. *Ann NY Acad Sci*. 825:30–48, 1997.
- ONGINI, E.; SCHUBERT, P. Neuroprotection induced by stimulating A₁ or blocking A_{2A} adenosine receptors: an apparent paradox. *Drug Dev Res*. 45:387-393, 1998.
- OSÉS, J.P.; CARDOSO, C.M.; GERMANO, R.A.; KIRST, I.B.; RUCKER, B.; FURSTENAU, C.R.; WINK, M.R.; BONAN, C.D.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci*. 74(26):3275-84, 2004.
- OTANI, K.; YAMATODANI, A.; WADA, H.; MIMAKI, T.; YABUUCHI, H. Effect of ketogenic diet on convulsive threshold and brain monoamine levels in young mice. *No To Hattatsu*. 16:196-204, 1984.
- OTERO LOSADA, M.E.; RUBIO, M.C. Striatal dopamine and motor activity changes shortly after lithium administration. *Naunyn-Sch-miedeb Arch Pharmacol*. 330:169, 1985.
- OTTMAN, R.; RISCH, N.; HAUSER, W.A.; PEDLEY, T.A.; LEE, J.H.; BARKER-CUMMINGS, C.; LUSTENBERGER, A.; NAGLE, K.J.; LEE, K.S.; SCHEUER, M.L.; et al. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet*. 10(1):56-60, 1995.
- PAGANI, F.; PANTEGHINI, M. 5'-Nucleotidase in the Detection of Increased Activity of the Liver Form of Alkaline Phosphatase in Serum. *Clin Chem*. 47(11):2046-2048, 2001.

- PAN, J.W.; ROTHMAN, D.L.; BEHAR, K.L.; STEIN, D.T.; HETHERINGTON, H.P. Human brain b-hydroxybutyrate and lactate increase in fasting induced ketosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20:1502-1507, 2000.
- PAN, J.W.; TELANG, F.W.; LEE, J.H.; DE GRAAF, R.A.; ROTHMAN, D.L.; STEIN, D.T.; HETHERINGTON, H.P. Measurement of β -hydroxybutyrate in acute hyperketonemia in human brain. *J Neurochem.* 79:539-544, 2001.
- PAPPO, E.; CHRISTOFOROV, B.; PETITE, J.P.; BOULU, R.; ETIENNE, J.P. Intérêt clinique du dosage de la 5'-nucléotidase sérique. *Pathol Biol.* 17:479-86, 1969.
- PATEL, B.T.; TUDBALL, N. Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase and adenosine deaminase immunoreactivities in rat brain. *Brain Res.* 370:250-264, 1986.
- PERSINGER, M.A.; MAKAREC, K.; BRADLEY, J.C. Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav.* 44:27-37, 1988.
- PHELPS, S.J.; HOVINGA, C.A.; ROSE, D.F.; VAUGHN, C.; OLSEN-CREASY, K. The ketogenic diet in pediatric epilepsy. *Nutr Clin Pract.* 13:267-282, 1998.
- PINTO, H.C.; BAPTISTA, A.; CAMILO, M.E.; et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci.* 41:172-179, 1996.
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol.* 158:141-214, 1995.
- PRASAD, A.N.; STAFSTROM, G.L.; HOLMES, G.L. Alternative epilepsy therapies the ketogenic diet, immunoglobulins, and steroids. *Epilepsia.* 37(suppl. 1):S81-S95, 1996.
- PRIEL, M.R.; FERREIRA DOS SANTOS, N.; CAVALHEIRO, E.A. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.* 26:115-121, 1996.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines., *Pharmacol Rev.* 50(3):413-492, 1998.

- REDDI, K.K. Serum 5'-nucleotidase of a breast cancer patient. *Clin Biochem.* 13(1):51-54, 1980.
- REICHLING, J.; KAPLAN, M. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Dig Dis Sci.* 33:1601-1614, 1988.
- RHO, J.M.; KIM, D.W.; ROBBINS, C.A.; ANDERSON, G.D.; SCHWARTZKROIN, P.A. Age-dependent differences in flurothyl seizure sensitivity in mice treated with a ketogenic diet. *Epilepsy Res.* 37:233-240, 1999.
- RIGOULOT, M.A.; KONING, E.; FERRANDON, A.; NEHLIG, A. Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther.* 308:787-795, 2004.
- ROBINSON, A.M.; WILLIAMSON, D.H. Physiological role of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.* 60:143-187,1980.
- RUDOLPHI, K.; SCHUBERT, P.; PARKINSON, F.E.; FREDHOLM, B.B. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci.* 13:439-445, 1992.
- SANKAR, R.; SHIN, D.H.; LIU, H.; MAZARATI, A.; PEREIRA DE VASCONCELOS, A.; WASTERLAIN, C.G. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci.* 18:8382-8393, 1998.
- SCHÄFER, R.; REISER, G. Characterization of [35S]-ATP alpha S and [3H]-alpha, beta-MeATP binding sites in rat brain cortical synaptosomes: regulation of ligand binding by divalent cations. *Br J Pharmacol.* 121:913-922, 1997.
- SCHETINGER, M.R.C.; BONAN, C.D.; SCHIERHOLT, R.C.; WEBBER, A.; ARTENI, N.; EMANUELLI, T.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.; NETO, C.A. Nucleotide Hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: A possible link between preconditioning and adenosine production. *J Stroke Cerebr Dis.* 7:1-3, 1998.

- SCHOEN, S.W.; KREUTZBERG, G.W. Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat dentate gyrus. *Exp Neurol.* 127(1):106-118; 1994.
- SCHWABE, U.; SCHONHOFER, P.S.; EBERT, R. Facilitation by adenosine of the action of insulin on the accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate, lipolysis, and glucose oxidation in isolated fat cells. *Eur J Biochem.*46:537-545, 1974.
- SCHWARTZ, R.H.; EATON, J.; BOWER, B.D.; AYNSLEY-GREEN, A. Ketogenic diets in the treatment of epilepsy: short-term clinical effects. *Dev Med Child Neurol.* 31:152-160, 1989.
- SEBASTIAO, A.M.; RIBEIRO, J.A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci.* 21:341-346, 2000.
- SHEARDOWN, M.J.; KNUTSEN, L.J.S. Unexpected neuroprotection observed with the adenosine A_{2A} receptor agonist CGS 21680. *Drug Dev Res.* 39:108-114, 1996.
- SHERMAN, W.R.; GISH, B.G.; HONCHAR, M.P.; MUNSELL, L.Y. Effects of lithium on phosphoinositide metabolism in vivo. *Fed Proceed.* 45:2639-2646, 1986
- SHETH, S.; FLAMM, S.L.; GORDON, F.D.; CHOPRA, S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol.* 93(1):44-48, 1998.
- SIMON, J.; WEBB, T.E.; BARNARD, E.A. Distribution of [35S] dATP alpha S binding sites in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacology.* 36:1243-1251, 1997.
- SMITH, U.; KURODA, M.; SIMPSON, I.A. Counter-regulation of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes, in the presence of adenosine deaminase. *J Biol Chem.* 259:8758-8763, 1984.
- SONG, C.S.; KAPPAS, A. 5'-nucleotidase of plasma membranes of the rat liver: studies and subcellular distribution. *Ann N Y Acad Sci.* 166:565-573, 1969.
- SORBI, D.; BOYNTON, J.; LINDOR, K.D. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic

- steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol.* 94(4):1018-1022, 1999.
- SPERBER, E.F.; HAAS, K.Z.; STANTON, P.K.; MOSHE, S.L. Resistance of the immature hippocampus to seizure-induced synaptic reorganization. *Brain Res Dev Brain Res.* 60(1):88-93, 1991.
- STAFSTROM, C.E.; CHRONOPOULOS, A.; THURBER, S.; THOMPSON, J.L.; HOLMES, G.L. Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia.* 34(3):420-432, 1993.
- SUNDERMAN, F.W. Jr. The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase. *Ann Clin Lab Sci.* 20(2):123-39, 1990.
- SWINK, T.D.; VINING, E.P.; FREEMAN, J.M. The ketogenic diet. *Adv Pediatr.* 44:297-329, 1997.
- THIO LL, WONG M, YAMADA KA. Ketone bodies do not directly alter excitatory or inhibitory hippocampal synaptic transmission. *Neurology.* 54:325–331, 2000.
- THORN, J.A.; JARVIS, S.M. Adenosine transporters. *Gen Pharmacol.* 27:613–620, 1996.
- TIEU, K.; PERIER, C.; CASPERSEN, C.; TEISMANN, P.; WU, D.C.; YAN, S.D.; et al. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J Clin Invest.* 112:892–901, 2003.
- TODOROV, L.D.; MIHAYLOVA-TODOROVA, S.; WESTFALL, T.D.; SNEDDON, P.; KENNEDY, C.; BJUR, R.A.; WESTFALL, D.P. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature.* 387(6628):76-79, 1997.
- TORRES, I.L.; BUFFON, A.; DANTAS, G.; FURSTENAU, C.R.; BOHMER, A.E.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J.; DALMAZ, C.; FERREIRA, M.B. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(1):181-6, 2002.

- TURSKI, L., IKONOMIDOU, C., TURSKI, W.A., BORTOLOTTI, Z.A., CAVALHEIRO, E.A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*. 3:154-171, 1989.
- TURSKY, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKY, W.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: A novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*. 3:154-171, 1989.
- UHLEMANN, E.R.; NEIMS, A.N. Anticonvulsant properties of the ketogenic diet in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 180:231-238, 1972.
- VINING, E.P.G.; FREEMAN, J.M.; BALLABAN-GIL, K.; CAMFIELD, C.S.; CAMFIELD, P.R.; HOLMES, G.L.; SHINNAR, S.; SHUMAN, R.; TREVATHAN, E.; WHELESS, J.W. A multicenter study of efficacy of the ketogenic diet. *Arch Neurol*. 55:1433-1437, 1998.
- VON LUBITZ, D.K.J.E. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept. *Eur J Pharmacol*. 365:9–25, 1999.
- WAJDA, I.J.; BANAY-SCHWARTZ, M.; MANIGAULT, I.; LAJTHA, A. Effect of lithium and sodium ions on opiate-and-dopamine-receptor binding. *Neurochem Res*. 6:321-331, 1981.
- WANG T.F.; GUIDOTTI, G. Golgi Localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J Biol Chem*. 273(18):11392-11399, 1998.
- WANG, T.F.; ROSENBERG, P.A.; GUIDOTTI, G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Brain Res Mol Brain Res*. 47(1-2):295-302, 1997.
- WARDAS, J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol*. 54:313–326, 2002.
- WHELESS, J.W. The ketogenic diet: fact or fiction. *J Child Neurol*. 10:419-423, 1995.

- WHITWORTH, P.; HEAL, D.J.; KENDALL, D.A. Chronic lithium treatment enhances inositol polyphosphate formation in mouse brain in vivo. *Br J Pharmacol.* 98:536-541, 1989.
- WIERASZKO, A.; GOLDSMITH, G.; SEYFRIED, T.N. Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. *Brain Res.* 485:244–250, 1989.
- WIERASZKO, A.; SEYFRIED, T.N. ATP-induced synaptic potentiation in hippocampal slices. *Brain Res.* 491:356-359, 1989.
- WIERASZKO, A.; EHRLICH, Y.H. On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J Neuroch.* 63:1731-1738, 1994.
- WILDER, R.M. The effect of ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Bull.* 2:307-308, 1921.
- WILLIAMS, A.L.; HOOFNAGLE, J.H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis: relationship to cirrhosis. *Gastroenterology.* 95(3):734-739, 1988.
- WILOT, L.C. O efeito do tratamento crônico com lítio sobre as nucleotidases em sinaptossomas e soro de ratos e na morte celular induzida por ATP. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- YEGUTKIN, G.G.; IAKUBOVSKII, S.M.; GATSKO, G.G. Kinetic properties of 5'-nucleotidase in the adipose tissue, liver and blood of rats of different ages. *Ukr Biokhim Zh.* 62(3):95-8, 1990.
- YEGUTKIN, G.G. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry (Mosc).* 62(6):619-22, 1997.
- YEGUTKIN, G.G.; SAMBURSKI, S.S.; JALKANEN, S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J.* 17(10):1328-30, 2003.

- YOUNG, D.; DRAGUNOW, M. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience*. 58(2):245-261, 1994.
- YUDKOFF, M.; DAIKHIN, Y.; NISSIM, I.; LAZAROW, A.; NISSIM, I. Brain amino acid metabolism and ketosis. *J Neurosci Res*. 66:272-281, 2001.
- ZHOU, S.L.; GORDON, R.E.; BRADBURY, M.; et al. Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of aspartate aminotransferase in HepG2 cells. *Hepatology*. 27:1064 –1074, 1998.
- ZIEGLER, D.R.; ARAÚJO, E.; ROTTA, L.N.; PERRY, M.L.; GONÇALVES, C.A. A Ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. *J Nutr*. 132(3):483-487, 2002.
- ZIMMERMANN, H. 5'- Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*. 285:345-65, 1992.
- ZIMMERMANN, H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci*. 17:420-426, 1994.
- ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; NOCKEN, F. Extracellular hydrolysis of ATP and formation of adenosine in the nervous system. In: Adenosine and Adenine Nucleotides: from Molecular Biology to Integrative Physiology. Eds. Belardinelli L., Pelleg A., Kluwer Acad. Publ., Boston. 179-187, 1995.
- ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 49(6):589-618, 1996.
- ZIMMERMANN, H.; BRAUM, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int*. 32:421-25, 1998.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res*. 52:44-56, 2001.