niversidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

ADRIANA FERNANDA KUCKARTZ VIZUETE

EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA NO METABOLISMO PERIFÉRICO E NERVOSO DE RATOS *WISTAR*

Porto Alegre
2010

ADRIANA FERNANDA KUCKARTZ VIZUETE

EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA NO METABOLISMO PERIFÉRICO E NERVOSO DE RATOS *WISTAR*

Trabalho apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas – Ênfase Molecular, Celular e Funcional.
Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre
2010

AGRADECIMENTOS

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

À Jô pela nossa grande amizade e por todas nossas conversas que me incentivaram a voltar à pesquisa.

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

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

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

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

Ao laboratório 33, que me acolheu e a cada dia mais me estimula a ser uma melhor pessoa e pesquisadora – em especial Cris, Caren, Márcio, Dani, Fê, Maria, Marina, Rê, Ana, “por me deixarem entrar na pista e me ensinarem a dançar de novo” e também pelo apoio de todos quando me machuquei.

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

Aos amigos, Lê, Jef, Lize, Carol pelo carinho e amizade.

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 4
1.1 Dieta cetogênica..... 4
1.2 Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs)..... 7
2. OBJETIVOS..... 9
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 10
3.1 Animais..... 10
3.2 Tratamento..... 10
3.3 Experimento..... 11
3.4 Análise bioquímica sérica..... 11
3.5 Teste de Viabilidade celular 12
3.6 ELISA S100B……... 12
3.7 Determinação de proteínas…….. 13
3.8 Análise estatística..... 13
4 RESULTADOS..... 14
5 DISCUSSÃO..... 18
6 PERSPECTIVAS..... 20
7REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 21

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dieta Cetogênica

A dieta cetogênica desde 1920 vem sendo empregada em tratamentos anti-epiléticos em casos de crianças resistentes ao uso de medicamentos anti-epiléticos (BAILEY et als., 2005). Alguns estudos também demonstram que esta dieta pode ser empregada para tratamento de outras desordens metabólicas, principalmente em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Autismo, Depressão, Traumas, Isquemias cerebrais Esclerose Amiotrófica lateral, etc (BARAÑO & HARTMAN, 2008).

A dieta cetogênica é constituída por: alta concentração de lipídios, baixa ou ausência de carboidratos e níveis baixos ou normais de proteínas (FREEMAN et als., 2006). Durante a ingestão da dieta ocorre uma adaptação do metabolismo semelhante ao que ocorre no jejum, com o aumento da β-oxidação e da formação e consumo de corpos cetônicos, como acetoacetato e β-hidroxibutirato. A energia para a manutenção da atividade celular é obtida da β-oxidação na mitocôndria a partir dos ácidos graxos provindos da dieta, que quando em elevado nível, gera alta quantidade de acetil-CoA, intermediário que será direcionado para o Ciclo de Krebs e a síntese de adenosina trifosfatada (ATP), e também para a formação de corpos cetônicos, como β-hidroxibutirato, acetoacetato e acetona (figura 1) (HARTMAN et als., 2007).

Os corpos cetônicos formados substituirão parcialmente o papel da glicose na oxidação e síntese de ATP (figura 1). Em geral, células portadoras de mitocôndria e com elevado metabolismo energético serão o destino do consumo dos corpos cetônicos (por exemplo, sistema nervoso central e músculos esquelético e cardíaco) (WESTMAN et als., 2003). O β-hidroxibutirato é o corpo cetônico predominante (78%) e a acetona é volátil, sendo excretada na respiração pulmonar ou metabolizada em outros compostos como acetol, 1,2-propanediol, metilglioxal e ácido pirúvico. Os corpos cetônicos são convertidos à acetil-CoA pela D-β-hidroxibutirato desidrogenase, acetoacetato-succinil-CoA transferase e acetoacetil-CoA tiolase, que é oxidado no Ciclo de Krebs gerando energia para a síntese de ATP (HARTMAN et al., 2007). Além do papel energético, os corpos cetônicos também são capazes de participar de síntese de aminoácidos e neurotransmissores, como o ácido γ-aminobutírico (GABA) (KÜNNECKE et als., 1993, YUDKOFF et als., 2005).

As alterações bioquímicas decorrentes da ingestão da dieta cetogênica também ocorrem no sistema nervoso central, cujo metabolismo energético substitui parcialmente a

glicose por corpos cetônicos como combustível energético em uma resposta adaptativa a fim de manter a atividade neuronal (MELØ et al, 2006). Os corpos cetônicos diferentemente dos ácidos graxos conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e são captados e catabolizados tanto por neurônios quanto por astrócitos através dos transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT), sendo metabolizados devido à presença de sistema enzimático (β-hidroxibutirato desidrogenase, β-cetoácido-Coa-transferase, acetil-CoA transferase) específico para a metabolização do β-hidroxibutirato no cérebro. As mudanças neuroquímicas decorrentes da metabolização dos corpos cetônicos contribuem terapeuticamente de forma similar aos fármacos anti-epiléticos, diminuindo as convulsões e choques epiléticos (HARTMAN et als., 2007, FREEMAN et als., 2006, CURI et al., 2002).

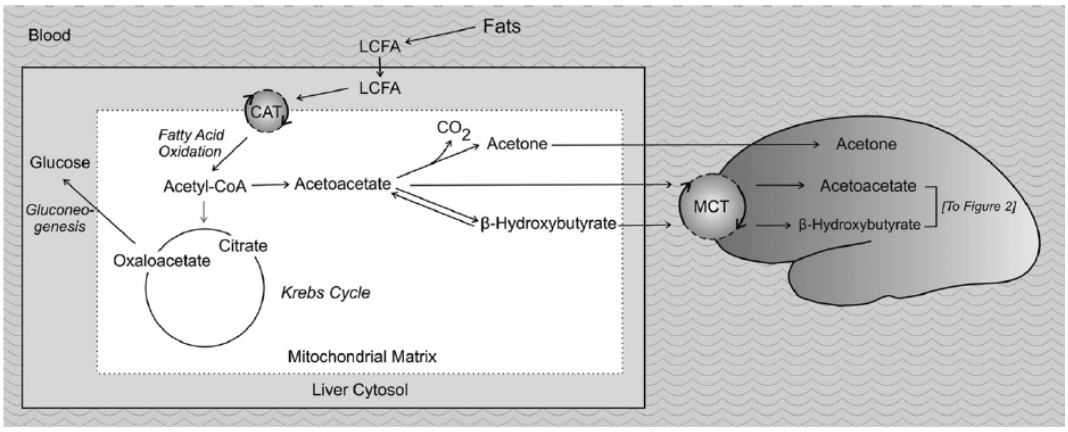

Figura 1: Alterações no metabolismo decorrentes de dieta cetogênica. A alta ingestão de lipídios e baixo nível de carboidrato, aumenta a β-oxidação e gliconeogênese. O intermediário do Ciclo de Krebs, oxaloacetato é desviado para síntese de glicose, diminuindo a eficiência do C. Krebs. O Acetil-CoA gerado pela degradação de ácidos graxos é então utilizado para síntese de corpos cetônicos (acetoacetato, acetona e B-hidroxibutirato). Estes compostos conseguem atravessar a barreira hematoencefálica através dos transportadores MCT ocorrendo uma substituição parcial da glicose como combustível para o sistema nervoso central. (figura retirada de *HARTMAN et als., 2007)*.

Entretanto, sabe-se pouco do mecanismo de ação da cetogênese na diminuição do quadro decorrente da epilepsia e na neuroproteção. Schwartzkroin em 1999, hipotetizou que a cetogênese promovida pela dieta rica em lipídios, alterava o metabolismo energético. A alteração do consumo de substratos energéticos e direcionamento de rotas não usuais para a síntese de ATP promove mudanças na excitabilidade neuronal, como aumento ou diminuição da síntese de neurotransmissores. A dieta cetogênica induz modificações na atividade neurotransmissora e sináptica, alterando o equilíbrio de concentração de

neurotransmissores excitatórios e inibitórios e os níveis de fatores neuromoduladores e neurotróficos. Em trabalho com marcação radioativa, foi comprovada a diminuição da concentração total de glutamato no cérebro em resposta a dieta cetogênica (MELØ et al, 2006).

Estudos mais atuais incluíram diferentes formas de modulação das rotas celulares em resposta aos elevados níveis de corpos cetônicos gerados pela administração de dieta cetogênica. Acetoacetato e β-hidroxibuitrato interferem nas reações energéticas da célula promovendo a elevação do Ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, assim como a diminuição nas reações de transaminação a partir de intermediários do Ciclo do Ácido Cítrico (HARTMAN et als., 2007). O aumento do metabolismo mitocondrial e da concentração intracelular de ATP promove neuroproteção ao fornecer energia, diminuir a produção de EROs e favorecer a síntese de neurotransmissores(BARAÑO & HARTMAN, 2008, HARTMAN et als., 2007).

Em outros trabalhos, demonstrou-se que a dieta cetogênica promove o aumento da fosforilação de proteínas em fatias de rato (ZIEGLER et als., 2004) e da atividade da glutationa peroxidase em hipocampos de rato (ZIEGLER et als., 2003), a diminuição dos níveis de S100B no líquor de ratos (ZIEGLER et als., 2004) e resistência a choques e diminuição de convulsões (BOUGH et als., 1999).

1.2 Ácidos Graxos Poliinsaturados

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

Os mamíferos não são capazes de introduzir ligações duplas entre os C1 e C9 do ácido insaturado devido à ausência de enzimas específicas, tornando o ômega-3 e o ômega-6 ácidos graxos essenciais. Ômega-3 e ômega-6 não podem ser obtidos pela síntese de novo, mas podem ser formados a partir dos ácidos linolênico e linoléico, respectivamente, presentes na dieta (figura 2)(MARZALEK et als., 2005; MARTIN et als., 2006). Os principais derivados originados do precursor ácido linolênico são ácido alfa-linolênico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA). O ácido linoléico produz predominantemente o ácido araquidônico (AA) (CURI et als., 2002).

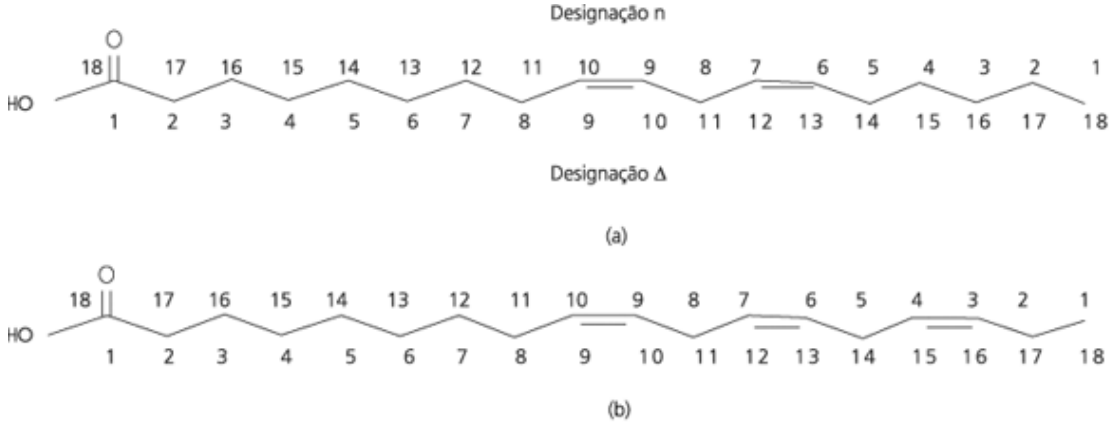

Figura 2: Estrutura dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) enssenciais. A) Ácido linoléico (ômega-6). B) Ácido linolênico (ômega-3). (figura retirada de *MARTIN et als., 2006*)

O ácido linolênico e linoléico são abundantemente encontrados no sistema nervoso central, constituindo as membranas neuronais. Os principais tipos são ácido docosahexanóico (DHA, 22:6n-3) e ácido araquidônico (AA, 20:4n-6), respectivamente (MARZALEK et als., 2005).

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

leucotrienos e tromboxanos, modulando a resposta imunológica no sistema nervoso (SERHAM et als., 2004). As moléculas de ômega-6 atuam de forma pró-inflamatória, enquanto que ômega-3 possui propriedade antiinflamatória (MARZALEK et als., 2005).

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

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

A recomendação ideal para ingestão de PUFAs e a razão ideal de ômega-6/ômega-3 na dieta para sua biodisponibilidade e conversão em AA e DHA é a proporção de 5:1 (MARZALEK, 2005, CURI et als., 2002).

2 OBJETIVOS

A dieta cetogênica modula o metabolismo do sistema nervoso central contribuindo para uma atividade neuroprotetora. Entretanto, sabe-se que uma dieta com alta quantidade de ácidos graxos pode provocar danos nos vasos sanguíneos como o desenvolvimento de placas ateroscleróticas e alterações no sistema cardiovascular. Sabe-se também que a ingestão de dietas em que a proporção de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 é de 5:1 é benéfica para o organismo contribuindo para melhor atividade do sistema nervoso central e cardiovascular. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi padronizar dietas cetogênicas com diferentes composições em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e avaliar seus efeitos no metabolismo periférico e neuronal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos machos *Wistar* de 30 dias foram obtidos do biotério no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos sob condições de ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, temperatura ambiente controlada em torno de 21ºC e constante ventilação. Os animais permaneceram em caixas (5 animais por caixa), com acesso à água e comida *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde.

3.2 Tratamento

Os ratos foram submetidos há 8 semanas de tratamento com diferentes dietas: 1) dieta balanceada (controle), 2) dieta cetogênica usual e 3) dieta cetogênica com aumento na composição de ômega-3 (adição de óleo de peixe) . Para cada grupo de dieta foi usado ao todo 20 animais (tabela 1).

Durante o tratamento, os ratos foram pesados semanalmente e observados quanto a comportamento e pelagem a fim de verificar se a dieta não está contribuindo para uma desnutrição e perda protéica.

Tabela 1: Composição das dietas:

Componentes	Controle (g/100g)	Dieta Cetogênica (g/100g)	Dieta Cetogênica + óleo de peixe (g/100g)
Sal	4	4	4
Vitamina	1	1	1
Fibra	1	1	1
Proteína	33,5	33,5	33,5
DL-Metionina	0,3	0,3	0,3
Amido	55,2	------	-----
Óleo de soja	0,5	0,5	0,5
Óleo de peixe	--------	-----	1,0
Banha	4,5	59,7	58,7
Total Calorias	**405 Kcal**	**681 Kcal**	**681 Kcal**

A dieta balanceada segue recomendação da AIN-93 (REEVES,1993). A constituição da dieta cetogênica é descrita em Ziegler et als (2002) e teve dois grupos com diferentes proporções de PUFAs (ômega-3 e ômega-6), formados pelo acréscimo respectivo de óleo de soja e óleo de peixe. A proporção n-3/n-6 no óleo de soja é 0,15, enquanto no óleo de peixe de 6,73, possuindo maior quantidade de ômega-3 (MARSZALEK,2005; MOREIRA, 2010) (tabela 2).

Tabela 2: Proporção ômega-3/ômega-6 nas diferentes dietas:

Componentes	**Controle (g/100g)**		**Dieta Cetogênica (g/100g)**		**Dieta Cetogênica + óleo de peixe (g/100g)**	
	W-6	**W-3**	**W-6**	**W-3**	**W-6**	**W-3**
Óleo de soja	0,27	0,04	0,27	0,04	0,27	0,04
Óleo de peixe	--------		---------			0,6
Banha	0,459	0,045	6,089	0,597	5,98	0,587
Total						
Ômega-6	0,729		6,359		6,25	
Ômega-3	0,085		0,637		1,227	
Proporção w6/w3	**11:1**		**10:1**		**5:1**	

3.3 Experimento

Após 8 semanas de tratamentos os ratos foram submetidos a jejum de 8h e foram sacrificados para avaliação do sistema nervoso central e do metabolismo periférico. Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina e xilasina (75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente). Após a observação da perda do reflexo álgico na compressão do rabo do animal, os ratos foram submetidos à coleta de líquor na cisterna magna e punção cardíaca para coleta sangue. Em seguida, foram decapitados e os cérebros cortados longitudinalmente a fim da dissecação das estruturas cerebrais hipocampo, córtex temporal e estriado. Foram realizadas fatias transversais de 0,3 mm das respectivas estruturas nervosas no fatiador McIlwain para futura análise. As fatias das estruturas cerebrais foram usadas no dia do experimento para teste de viabilidade celular (Teste de MTT) e o restante foram congeladas à -70ºC.

3.4 Análise bioquímica sérica

Após a coleta de sangue por punção cardíaca, a amostra foi incubada a 37ºC por 10 minutos e centrifugada a 1000g por 10min (Eppendorf 5402; Hamburg, Germany) para fracionamento do sangue e armazenamento do soro a 8ºC por 24h. A partir do soro foram determinados os níveis séricos de glicose, β-hidroxibutirato, colesterol, triacilglicerol (TAG), HDL, uréia, ácido úrico, albumina, creatinina e proteínas totais.

Para a análise bioquímica foram utilizados kits colorimétricos da Human Brasil, empregando-se testes específicos para: glicose (glicose liquicolor, CAT 10261); proteína total (proteína total, CAT 013), albumina (albumina, CAT 001), creatinina (creatinina, CAT 006); uréia (uréia liquicolor, CAT 10505); ácido úrico (uric acid liquicolor, CAT 10687); triglicerídeos (triglicerídeos liquicolor, CAT 10726); colesterol (colesterol liquicolor, CAT 10013) e HDL cholesterol (colesterol HDL precipitação, CAT 004) e β-hidroxibutirado (Kit Ranbut, CAT RB1007).

3.5 Teste de Viabilidade celular

O teste de quimiosensibilidade e colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas é quebrado por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan) quantificado por espectrofotometria. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória e a viabilidade celular.

No presente trabalho foram padronizados os tempos de incubação prévia com HEPES salina cuja composição é (em mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl2;1 MgSO4; 25 HEPES; 1 KH2PO4; 10 glicose e o pH foi ajustado para 7,4, a fim de estabilizar as fatias de estriado e córtex temporal. Os tempos escolhidos foram 15, 120 e 180 minutos, com trocas de meio a cada 15 minutos.

Após a padronização, optou-se pela estabilização de 30 minutos em meio HEPES salina para fatias de hipocampo, estriado e córtex temporal. Após o período de incubação, foi adicionado 30 µl de MTT em 270 µl de HEPES por 30 minutos à 30ºC. O meio com MTT foi retirado e se adicionou 300 µl de DMSO, o final da reação ocorreu em agitação a fim de liberar os cristais de formazan da célula, para leitura em espectrofotômetro à 560nm e

650nm. A diferença de leitura entre estas duas faixa de comprimento de onda é a taxa de conversão do MTT e demonstra a viabilidade celular.

3.6 ELISA S100B

A quantidade de proteínas S100B em fatias de hipocampo, estriado e córtex temporal foi verificada através da imunoquantificação por ELISA sanduíche (Tramontina et al, 2000).

3.7 Determinação de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método colorimétrico de Peterson (modificação do *Lowry*), usando albumina de soro bovino como padrão e leitura em espectrofotômetro 620nm (PETERSON, 1977).

3.8 Análise estatística

Os dados resultantes desta experimentação são paramétricos. Os dados são apresentados com média $\pm$ D.P.. A variação da massa corporal ao longos das 8 semanas de tratamento com as diferentes dietas será analisada por dois testes estatísticos: ANOVA de duas vias seguido de teste *post hoc* de Tukey e análise de medidas repetidas. Os outros resultados serão analisados por ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado será de 5% ($p \leq 0,05$) para todos os testes estatísticos.

4 RESULTADOS

Os animais cresceram no período de 8 semanas de tratamento e não houve desnutrição nos grupos que receberam dieta cetogênica. Pode-se observar que o grupo controle a partir da segunda semana e até o término de tratamento ganhou mais massa corporal ao longo do tratamento (p≤0,001), enquanto que os grupos cetogênicos tiveram uma redução do ganho de massa e não foram diferentes entre si (figura 3).

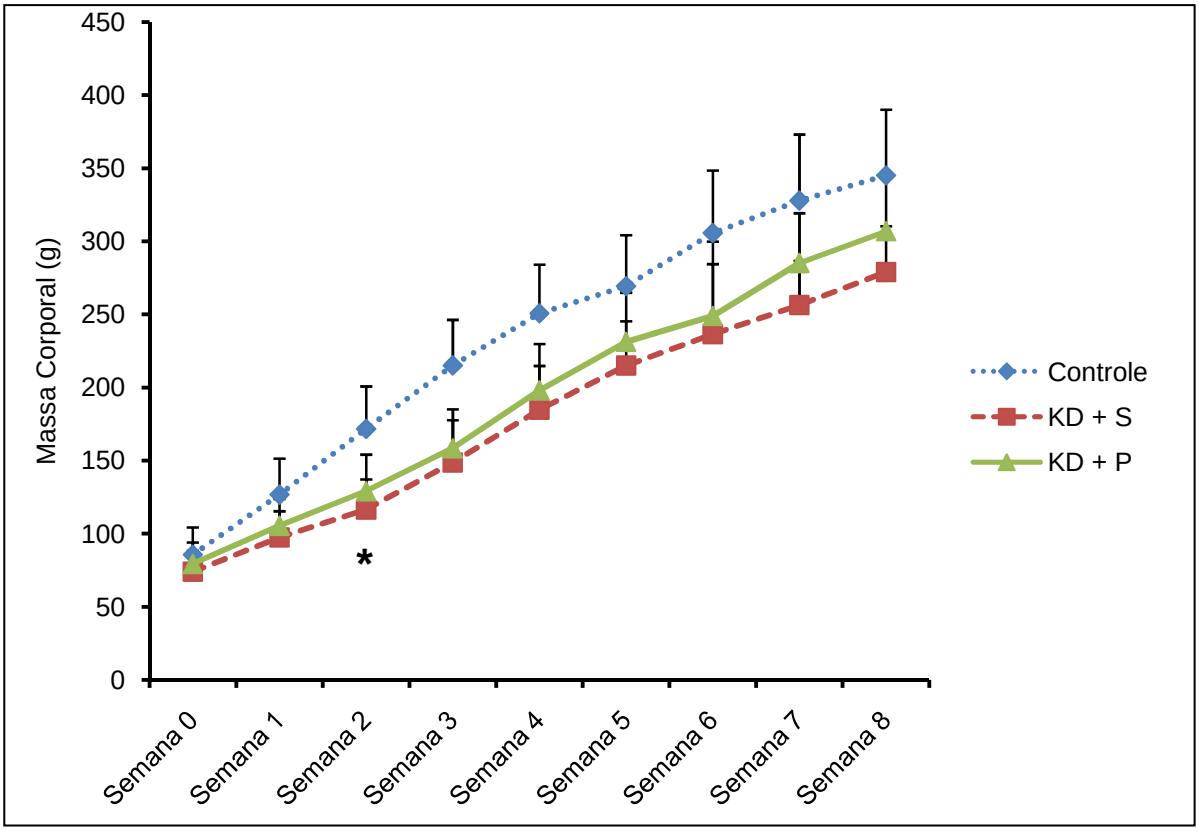

Figura 3: Massa corporal ao longo do tratamento (média ± D.P.). Controle = dieta balanceada; KD + S = dieta cetogênica usual; KD + P = dieta cetogênica com acréscimo de ômega-3. A partir da semana 2 (*), o grupo controle cresceu mais que os grupos cetogênicos (ANOVA de 2 vias, p≤0,001, seguido de *post hoc* Teste de Tukey). Entre as diferentes dietas cetogênicas não houve diferença no crescimento dos animais.

Os efeitos no metabolismo periférico foram verificados por dosagens no soro dos animais. A creatinina apresentou problemas na detecção e provavelmente o Kit não possui sensibilidade para quantificação em soro de ratos (tabela 3).

Os níveis de albumina, proteína total e ácido úrico não estão alterados nos diferentes tratamentos. A concentração de glicose foi significativamente maior no grupo de animais tratados com dieta cetogênica usual (tabela 3).

Os triglicerídeos e a lipoproteína HDL também não demonstraram alterações nas diferentes dietas, entretanto há uma tendência a diminuição da suas concentrações séricas nas dietas cetogênicas em relação a controle. Observa-se que, os níveis séricos de HDL e triglicerídeos são mais altos na dieta cetogênica usual do que na dieta cetogênica com acréscimo de ômega-3. Apenas a dieta cetogênica com óleo de peixe, apresentou concentrações de β-hidroxibutirato significativamente maiores do que a dieta controle. Surpreendentemente, os níveis de colesterol em ambas dietas cetogênicas são menores do que da dieta balanceada, não havendo diferença entre os grupos cetogênicos (tabela 3).

Tabela 3: Análise bioquímica sérica em ratos submetidos a tratamento de 8 semanas com dieta controle, dieta cetogênica usual e dieta cetogênica com ômega-3.

	Controle (n=19)	Dieta Cetogênica (n= 18)	Dieta Cetogênica + óleo de peixe (n=17)
		(mg/dL)	
Proteína total	1,95 ± 0,65	1,91 ± 0,64	1,73 ± 0,74
HDL	0,93 ± 0,49	1,42 ± 0,90	0,94 ± 0,82
		(g/dL)	
Albumina	2,76 ± 0,74	2,67 ± 0,37	2,60 ± 0,81
		(mmol/L)	
Glicose	6,95 ± 1,72	9,18 ± 1,47 *	8,48 ± 2,69
Triglicerídeos	0,43 ± 0,42	0,34 ± 0,27	0,22 ± 0,10
Colesterol	1,47 ± 0,29	1,22 ± 0,19 *	1,08 ± 0,39 *
β-hidroxibutirato	0,15 ± 0,04	0,25 ± 0,09	0,34 ± 0,29 *
Uréia	4,76 ± 1,15	3,87 ± 0,90	3,62 ± 1,32 *
Ácido úrico	0,40 ± 0,16	0,43 ± 0,20	0,41 ± 0,23

Valores: média ± D.P.

ANOVA de 1 via, *post hoc* teste de Tukey p≤0,05

A viabilidade celular de fatias de córtex temporal e estriado foi testada com incubações prévias de 15, 120 e 180 minutos Não houve diferença entre os tempos 15 e 120 minutos de incubação (figura 4). No dia do experimento, foi então padronizado o tempo de 30 minutos de estabilização em meio HEPES e depois se quantificou a atividade das desidrogenases pela técnica de MTT em fatias de hipocampo, estriado e córtex temporal.

Não houve diferença na viabilidade celular entre os diferentes tipos de dietas e nos respectivos tecidos cerebrais, demonstrando que as dietas cetogênicas, quando comparadas com a dieta controle, não interferem na integridade celular (figura 5).

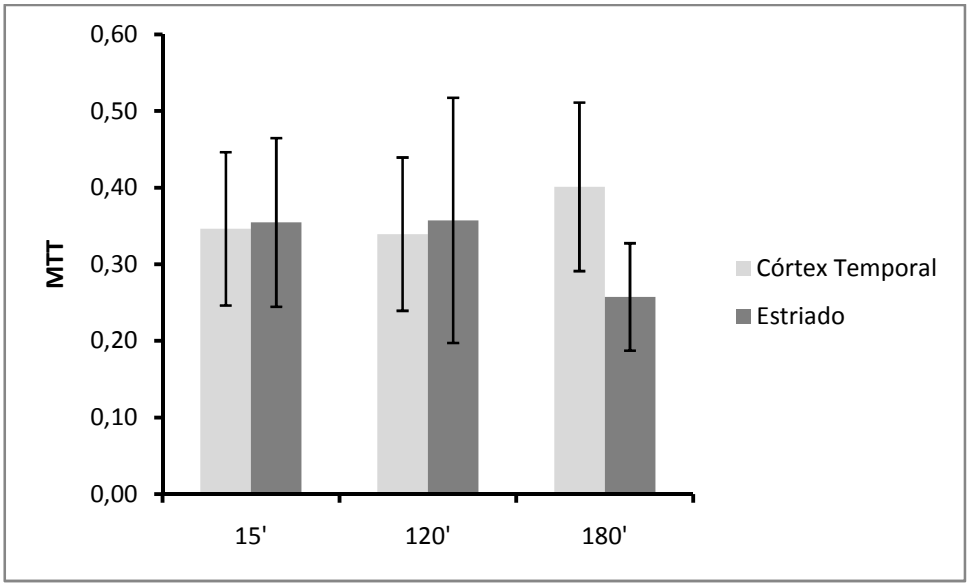

Figura 4: Teste de viabilidade celular em diferentes tempos de estabilização de fatias de estriado e córtex temporal (média ± D.P.). Não há diferença na viabilidade celular entre os tempos 15 e 120 minutos. Em 180 minutos, há alteração da viabilidade celular em fatias de estriado.

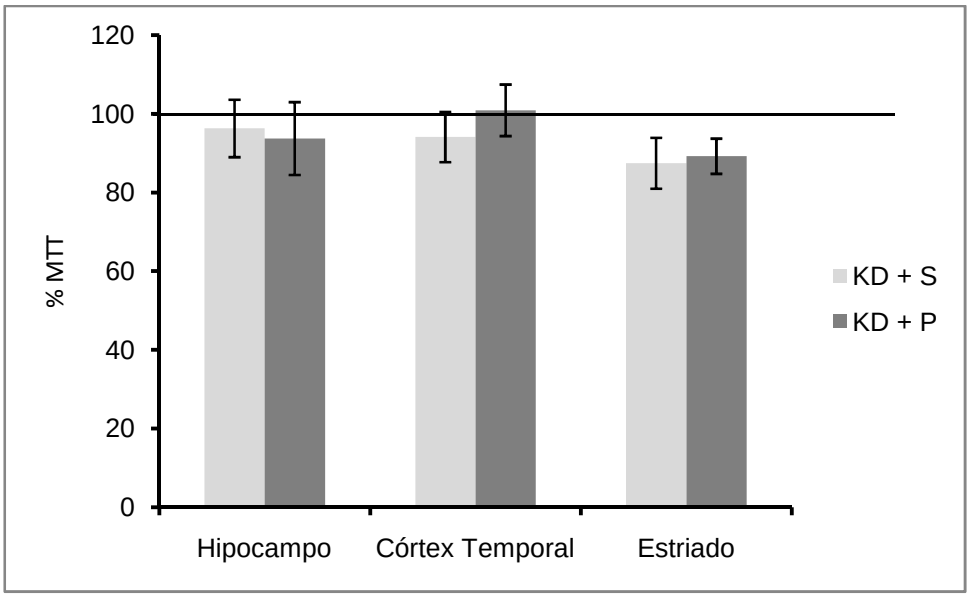

Figura 5: Teste de MTT (média ± E.P.) em diferentes estruturas cerebrais de ratos submetidos a diferentes dietas. Controle = dieta balanceada; KD + S = dieta cetogênica usual; KD + P = dieta cetogênica com acréscimo de ômega-3. As dietas cetogênicas não interferem na viabilidade celular nas fatias de hipocampo, estriado e córtex temporal (ANOVA de 2 vias, $p \leq 0,05$, seguido de *post hoc* Teste de Tukey).

A avaliação do imunoconteúdo de S100B nas diferentes estruturas cerebrais através de ELISA apresentou grande variação no conteúdo total de S100B produzido nos tecidos estriado, hipocampo e córtex temporal nas diferentes dietas (figura 6). Fatias de estriado de ratos submetidos à dieta cetogênica com acréscimo de ômega-3 tiveram uma redução significativa no conteúdo total de S100B.

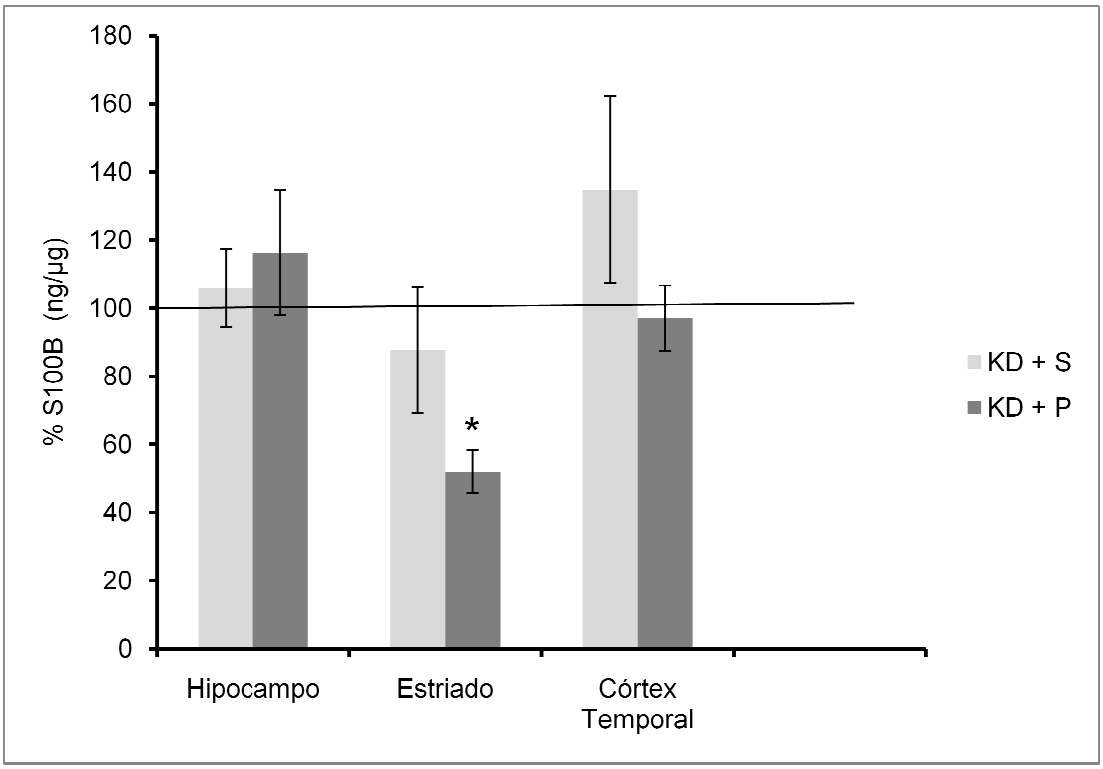

Figura 6: Imunoconteúdo de S100B em diferentes estruturas cerebrais de ratos submetidos a diferentes dietas (média ± E.P.).. Controle = dieta balanceada; KD + S = dieta cetogênica usual; KD + P = dieta cetogênica com acréscimo de ômega-3. O imunoconteúdo de S100B no estriado na dieta KD +P apresentou significativa redução. (ANOVA de 2 vias, $p \leq 0,05$, seguido de *post hoc* Teste de Tukey).

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a dieta cetogênica a partir da segunda semana altera a velocidade de crescimento do animal quando comparada com animais que consumiram dieta balanceada. Entretanto, deve-se ressaltar que os animais não apresentaram desnutrição nem deixaram de ganhar massa corporal ao longo das oito semanas de tratamento. Animais tratados com as diferentes dietas cetogênicas apresentaram a mesma taxa de crescimento.

Todas as dietas apresentaram a mesma quantidade de óleo de soja como fonte de ácidos graxos insaturados. Em umas das dietas cetogênicas foi proposto a melhora da qualidade dos ácidos graxos insaturados, isto é, a composição de PUFAs na proporção recomendada de 5:1 de ômega-6/ômega-3.

Através da análise bioquímica do soro, pode-se observar que os níveis de albumina, proteína total e ácido úrico não se alteraram nos diferentes tratamentos. Já a glicemia dos animais tratados com dieta cetogênica usual é mais elevada. A quantidade de uréia na dieta com acréscimo de ômega-3 diminuiu em relação aos outros grupos.

A glicemia dos ratos submetidos à dieta cetogênica sem nenhuma fonte de carboidrato pode ser controlada pelas reações da gliconeogênese. Sabe-se que a dieta cetogênica não provoca degradação de proteínas (HARTMAN et als., 2007; WESTMAN et als., 2003) e em nosso trabalho demonstramos que os níveis séricos de proteína total, albumina e ácido úrico não possuem diferença entre os grupos, sendo que inclusive nos indivíduos tratados com dieta cetogênica com ômega-3 houve redução da concentração de uréia sérica.

Interessantemente, observou-se que nem todos os animais tratados com dieta rica em lipídios e sem carboidratos ficaram em estado cetogênico. Observamos que apenas no grupo submetido à dieta cetogênica com composição melhorada de ácidos graxos insaturados houve aumento significativo dos níveis de β-hidroxibutirato no soro, corpo cetônico que pode ser usado pelo sistema nervoso central como combustível a fim de manter a atividade neuronal (MELØ et al, 2006).

Os níveis de colesterol em ambas dietas cetogênicas estão reduzidos. Já a concentração de triglicerídeos não é diferente entre os grupos. Entretanto, devemos observar o alto desvio padrão no grupo controle o que contribui para uma baixa significância para os níveis reduzidos nos grupos tratados com dieta cetogênica. O acréscimo de ômega-3 na alimentação pode melhorar a qualidade cardiovascular dos indivíduos conforme visto em estudo de Cunnane em 2009.

Demonstramos que a dieta cetogênica não altera a viabilidade celular das estruturas cerebrais hipocampo, estriado e córtex temporal.

A produção de S100B nos diferentes tecidos cerebrais é variável, sendo que em fatias de estriado provindas de animais submetidos à dieta cetogênica com ômega-3 a S100B está reduzida em relação as outras dietas. Sabe-se que S100B é uma proteína ligante de Ca^{2+} que possui atividade intracelular como regulação da mitose, diferenciação e plasticidade do citoesqueleto (DONATO, 2001). Esta proteína pode ser secretada e seu efeito extracelular é dependente da sua concentração. Em níveis picomolares e nanomolares atua como um fator neurotrófico, enquanto que em concentração micromolar possui efeito tóxico sendo um fator apoptótico (DONATO, 2003).

A redução do conteúdo de S100B pode ser um efeito da imunomodulação do ácido linolênico que através da ação de enzimas produz ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA), ácidos graxos que possuem atividade antiinflamatória, regulando os níveis de citocinas e a resposta inflamatória (CALDER, 2007; MARZALEK et als., 2005).

Não podemos descartar a hipótese dos corpos cetônicos agirem na síntese e liberação de citocinas, visto que não se conhece os mecanismos de neuroproteção em indivíduos tratados com dieta cetogênica. Em estudo anterior do nosso grupo (LEITE et als, 2004), culturas de astrócitos expostas a concentração de 5mM de β-hidroxibutirato por 24h, tiveram a secreção de S100B alterada, aumentando os níveis extracelular da proteína.

Este trabalho ainda está em andamento e pretende analisar melhor a ação neuroprotetora da dieta cetogênica sobre o sistema nervosa central. Para tanto, serão analisados outros paramêtros inflamatórios como as citocinas, IL-1β, IL-6 e TNF-alfa.

6 PERSPECTIVAS

Este trabalho pretende analisar outros parâmetros que auxiliem na melhor compreenssão da ação neuroprotetora da dieta cetogênica sobre o sistema nervoso central e metabolismo periférico.

Para tanto, parâmetros inflamatórios como a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1β, IL-6 e TNF-α, serão quantificadas em estruturas cerebrais, liquor e soro. A proteína S100B será analisada em outras amostras biológicas, como soro, líquor e tecido adiposo.

A atividade da enzima NADPH oxidase também relacionada com a atividade inflamatória será quantificada em estruturas cerebrais.

Outro fator que pretendemos analisar é a regulação da atividade mitocondrial pela dieta cetogênica, deste modo, iremos analisar as proteínas desacopladoras da cadeia transportadora de elétrons (UCPs) nas estruturas cerebrais e tecido adiposo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bailey EE, Pfeifer HH, Thiele EA: The use of diet in the treatment of epilepsy. Epilepsy Behav 2005, 6: 4– 8.

Barañano K.W.,Hartman A.L., The Ketogenic Diet:Uses in Epilepsy and Other Neurologic Illnesses. Current Treatment Options in Neurology 2008, 10: 410– 419

Bough,K.J., Valiyil,R., Han,F.T. Eagles, D.A Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet. Epilepsy Research 35 (1999) 21–28

Calder P.C., Immunomodulation by omega-3 fatty acids. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 77 (2007) 327–335

Cunnane S.C., Plourde M., Pifferi F.,M. Bégin M., C. Féart C., P. Barberger-Gateau P. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. Progress in Lipid Research 48 (2009) 239–256

Curi R., Pompéia C., Miyasaka C.K., Procopio J. Entendendo as gorduras – os ácidos graxos. Ed. Manole.1ª edição. Barueri, BR, 2002.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. Microsc Res Tech 2003;60:540–51.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. Int J Biochem Cell Biol 2001;33:637–68

Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanyé MC, Fifre A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, Pillot T, Oster T. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. J Neurochem. 2006 Jan;96(2):385-95.

Freeman J, Veggiotti P, Lanzi G, Tagliabue A, Perucca E. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. Epilepsy Res 2006;68:145-80.

Hartman AL, Gasior M, Vining EPG, Rogawski MA. The neuropharmacology of the ketogenic diet. Pediatr Neurol. 2007;36:281-292.

Künnecke, B., Cerdan S, Seelig J. Cerebral metabolism of [1,2-13C2]glucose and [U-13C4]3-hydroxybutyrate in rat brain as detected by 13C NMR spectroscopy. NMR Biomed. 1993 Jul-Aug;6(4):264-77.

Leite M., Frizzo JK., Nardin P. , de Almeida LMV,Tramontina F., Gottfried C., Gonçalves CA, β-Hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. Brain Research Bulletin 64 (2004) 139–143

Marszalek JR, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, andneuronal function: breastmilk and fish are good for you. Annu Rev Cell Dev Biol 2005;21:633–57.

Martin C.A.; de Almeida V.V.; Ruiz M.R.; Visentainer J.E.; Matshushita M.; de Souza N.E.; Visentainer J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. Rev. Nutr. vol.19 no.6 Campinas Nov./Dec. 2006

Melø T.M., Nehlig A., Sonnewald U. Neuronal–glial interactions in rats fed a ketogenic diet. Neurochemistry International 48 (2006) 498–507

Moreira, J.D., Knorra, L., Thomazia,A.P.,Simão,F. , Cíntia Battúa, C., Osesa,J.P., Gottfried, C., Wofchuk, S., Salbego, C., Souza, D.O., Perry, M.L.,S Vinadé,L. Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. Journal of Nutritional Biochemistry 21 (2010) 351–356

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83, 346–356.

Rapoport SI. 2001. In vivo fatty acid incorporation into brain phosholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling. J. Mol. Neurosci. 16:243–61

Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C.,AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. J. Nutr. 123: 1939-1951, 1993

Schwartzkroin PA. Mechanisms underlying the anti-epileptic efficacy of the ketogenic diet. Epilepsy Res. 1999 Dec;37(3):171-80.

Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M. 2004. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins,novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. Prostaglandins Other Lipid Mediat.73:155–72

Tramontina, F., Karl, J., Gottfried, C., Mendez, A., Gonc¸alves, D., Portela, L.V., Gonc¸alves, C.A., 2000. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. Brain Res. Protoc. 6, 86–90.

Ziegler, D.R. Emeli Araújo, E., N. Rotta,L.R. Perry, M. , Gonçaves, C.A A Ketogenic Diet Increases Protein Phosphorylation in Brain Slices of Rats1 J. Nutr. 132: 483–487, 2002.

Ziegler, D.R Oliveira, D.L.,Piresa,C., Ribeiro, L., Leite, M. Mendez, A., Gonçalves, D., Tramontina, F., Portela, L.V., Wofchuk, S.T., Perry, M.L. b, Gonçalves, C.A. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. Neuroscience Research 50 (2004) 375–379

Ziegler, D.R., Ribeiro, L. Hagenn,M., Ionara R. Siqueira,I.R, Araújo,E.,Torres, I.L.S., Gottfried,C. Carlos Alexandre Netto,C.A. Gonçalves, C.A. Ketogenic Diet Increases

Glutathione Peroxidase Activityin Rat Hippocampus. Neurochemical Research, 28 (2003) 1793–1797

Westman E.C., Mavropoulos J.,S. Yancy W.S., Volek J.S., A Review of Low-carbohydrate Ketogenic Diets. Current Atherosclerosis Reports 2003, 5:476–4

Yudkoff M., Daikhin Y. , Nissim I., Horyn O., Lazarow A. , Luhovyy B., Wehrli S., Nissim I. Response of brain amino acid metabolism to ketosis. Neurochemistry International 47 (2005) 119–128