

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PPG-NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DE PARÂMETROS ASTROCITÁRIOS (GFAP, S100B E
GLUTAMINA SINTETASE) NO HIPOCAMPO EM RATOS ALIMENTADOS
COM A DIETA CETOGÊNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIANE CASTRO DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. CARLOS ALBERTO GONÇALVES

PORTO ALEGRE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PPG-NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DE PARÂMETROS ASTROCITÁRIOS (GFAP, S100B E
GLUTAMINA SINTETASE) NO HIPOCAMPO EM RATOS ALIMENTADOS
COM A DIETA CETOGÊNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIANE CASTRO DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. CARLOS ALBERTO GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

PORTO ALEGRE

2005

“A verdadeira viagem
do descobrimento não
consiste em buscar
novas paisagens, mas
em ter novos olhos”.

Marcel Proust

Agradecimentos

Agradeço a minha família, pelo apoio, paciência, amor... enfim, por tudo;

Agradeço ao Amâncio, amor de minha vida, grande incentivador do meu trabalho, por todo o carinho e compreensão de que durante a confecção desta dissertação o melhor apoio poderia ser o silêncio;

Agradeço ao orientador, mas acima de tudo amigo Prof. Carlos Alberto Gonçalves, pela orientação e confiança, mesmo nos momentos mais difíceis. Muito obrigada! Você é um anjo!

Agradeço às colegas do laboratório, afinal sem vocês este trabalho não teria saído: Fran, Lúcia, Jú Rocha, Carol, Lê, Évelin, Marina, Jô. Obrigada!

Também agradeço ao demais amigos e colegas do Lab 33. O clima neste laboratório é fantástico!

Agradeço a esta Universidade, que continua tendo um ensino público, gratuito e de qualidade, e a este Programa de Pós Graduação pelos conhecimentos;

Agradeço também à Profa. Carla Dalmaz pela orientação nos experimentos de comportamento e pela ajuda na estatística;

Ao pessoal do ratário do Departamento de Bioquímica e à Dona Zelma, do ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação do Departamento de Biofísica;

À Maria e Andréa do PPG-Neurociências pela atenção;

À UFRGS, CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro;

E um agradecimento especial a todos os ratos com os quais tanto aprendi.

Resumo

A dieta cetogênica (DC) é uma dieta com baixos níveis de carboidratos e proteínas e altos níveis de gordura, incluída como prática médica contra desordens convulsivas, particularmente em crianças refratárias a tratamentos com drogas antiepilépticas convencionais. Contudo, a base molecular do efeito terapêutico permanece incerta. Considerando as evidências da importância das células gliais para o desenvolvimento neuronal, sobrevivência e plasticidade, investigou-se marcadores astrocitários protéicos de ratos alimentados com a DC, em diferentes regiões do hipocampo, estrutura comumente envolvida em desordens convulsivas. Encontrou-se um aumento transitório na GFAP na região CA3 do hipocampo, mas não nas regiões CA1 e giro denteado. Esta mudança não foi acompanhada por mudanças no conteúdo de S100B ou na atividade da glutamina sintetase. Com o intuito de avaliar um possível comprometimento hipocampal foi investigado o comportamento cognitivo espacial com a tarefa do labirinto aquático. Nenhuma mudança foi observada. Esta gliose transitória na região CA3 pode estar relacionada a ou preceder outras mudanças na vizinhança talvez envolvidas na atenuação das desordens convulsivas. Os dados reforçam a importância dos astrócitos hipocampais como alvos durante a ingestão da DC.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
1. Introdução – A Dieta Cetogênica.....	1
1.1 Modelos Animais com Dieta Cetogênica.....	2
1.2 O hipocampo e seus astrócitos.....	4
1.3 A Proteína S100B.....	7
1.4 A proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP).....	8
1.5 Glutamina sintetase (GS).....	9
2. Objetivos.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. Publicação.....	12
4. Discussão.....	19
5. Referências Bibliográficas.....	22

Índice de Tabela

Tabela 1 - Vantagens de um modelo animal.....	3
---	---

Índice de Figuras

Figura 1- A rede hipocampal.....	5
Figura 2- Estrutura da S100B.....	7
Figura 3- Modulação da glutamina sintetase pelos receptores NMDA e o óxido nítrico.....	10

1. Introdução – A Dieta Cetogênica

A dieta cetogênica tem sido usada no tratamento de distúrbios convulsivos, particularmente em crianças refratárias ao tratamento farmacológico. De fato, manipulações dietéticas para tratar convulsões têm sido usadas desde o quinto século antes de Cristo, quando Hipócrates descreveu um homem cujas convulsões foram completamente curadas pela total abstinência de água e comida. Galeno sugeriu um papel na etiologia da epilepsia, e recomendava uma “dieta atenuada” para muitos pacientes. Descrições bíblicas consideravam o valor do jejum para controlar as crises. No século oitavo, o renomado médico Avicena recomendava um tratamento que consistia em evitar determinados alimentos. Resumindo, as primeiras tentativas de induzir cetose para o tratamento das crises não eram precisamente estabelecidas, mas o estímulo parece vir da observação que as crises tinham remissões temporárias durante o jejum (Prasad & Stafstrom, 1998; Nordli, 2002).

Porém, a cetose poderia ser perigosa: seria a ante-sala da potencialmente fatal cetoacidose diabética, em que os corpos cetônicos alcançavam cerca de 25 mM no sangue, causando depleção de bicarbonato até próximo a zero. Isto acompanhado de hipovolemia devido à perda urinária de água da hiperglicemia e glicosúria, mais a perda de Na^+ e K^+ da cetonúria, tornavam a condição fatal se não tratada (Veech *et al*, 2001).

Mas a cetose é uma resposta fisiológica ao jejum na espécie humana. Uma leve cetose pode ser terapêutica em uma série de doenças. Um nível de corpos cetônicos de 5 a 7mM em homens em jejum é essencial para preservar a massa muscular da conversão à glicose para o consumo encefálico. Além disso, inanição ocasional foi um estado normal durante nossa evolução como caçadores-coletores. A cetose suave de 2 a 7mM persiste hoje tanto no homem como nas outras espécies (exceto alguns ruminantes). A espécie humana é diferenciada dos outros animais por sua grande taxa peso encefálico/peso corporal e o cérebro requer um grande aporte energético. De fato, 20% do consumo corporal de O_2 é requerido para suprir 1,5 Kg de cérebro (2% do peso corporal) (Veech *et al*, 2001).

Em 1921, Geyelin fez as primeiras observações clínicas sobre a regulação e convulsão, especificamente notando que muitos paciente ficaram livres das convulsões durante o jejum (Prasad & Stafstrom, 1998). No mesmo ano, Wilder na Clínica Mayo, introduziu uma dieta rica em gorduras e pobre em carboidratos e proteínas para induzir os efeitos metabólicos do jejum em um tratamento para a epilepsia (Wilder, 1921).

Com o sucesso em reduzir as crises, ela passou a ser utilizadas por neurologistas para (1) Crises refratárias à terapia medicamentosa; (2) toxicidade medicamentosa; (3) crises provocadas por deficiências nas proteínas transportadoras de glicose (Doença de deVivo, transportador GLUT1) e (4) deficiências da piruvato desidrogenase (Nordli, 2002).

Entre as décadas de 1950 e 1980, com o advento de novos fármacos antiepilépticos, a terapia cetogênica caiu em desuso. Dietas clássicas, como as de Wilder ou Livingston, são baseadas no consumo de uma alta porcentagem de ácidos graxos saturados de cadeia longa, com uma taxa de 4:1. Sendo assim, é considerada relativamente impalatável, com baixa aceitação, especialmente entre as crianças mais velhas, que já possuem preferências alimentares. Além disso, a média plasmática de colesterol nestas crianças aumenta de 168 para cerca de 220 mg/100 mL, com um decréscimo na HDL, aumento da LDL e elevação dos triglicerídeos totais sistêmicos, colocando-os em um grande risco de desenvolver aterosclerose. Na prática, esta dieta é raramente usada em pacientes com mais de 17 anos de idade (Veech *et al*, 2001).

Entretanto, na última década a dieta cetogênica voltou a ser uma alternativa diante dos casos refratários, devido aos efeitos adversos das drogas antiepilépticas, especialmente sobre as funções cognitivas.

1.1 Modelos Animais com Dieta Cetogênica

Poucos estudos envolvendo modelos animais com dieta cetogênica foram publicados (Stafstrom, 1999). Este pequeno número certamente reflete o sucesso das terapias medicamentosas. Mas a Dieta Cetogênica (DC) não é apenas uma dieta excêntrica: ela funciona. Mas por que um modelo animal? Porque como vemos na tabela 1, podemos controlar diversas variáveis:

Tabela 1: Vantagens de um modelo animal

Controla-se precisamente a dieta; variações na razão cetogênica, constituintes, ingestão calórica, balanço fluido;
Pode-se quantificar anormalidades bioquímicas e neurológicas;
Compara-se a efetividade em função da idade do animal;
Correlaciona-se achados em vários níveis: todo o animal, circuitos locais, membrana celular, subcelular;
Estuda-se efeitos da DC sobre o comportamento, aprendizado e cognição;

Adaptado de Stafstrom (1999)

Já foram realizados experimentos em coelhos, ratos e camundongos (Stafstrom, 1999), com diferentes composições de dieta, diferentes tempos de administração para modelos diferentes de indução de epilepsia. Com seus resultados, o uso da dieta aponta para as seguintes questões:

- i. Epileptogênese: como a DC maximiza a inibição da epileptogênese;
- ii. Comportamento e cognição: observações não-clínicas afirmam que crianças mantidas nesta dieta tornam-se mais atentas, porém até hoje especula-se a causa: por redução das convulsões, efeito da cetose ou ambos;
- iii. Composição e administração da DC: obter formas maximizadas de administração da DC;
- iv. Interações com fármacos antiepilépticos;
- v. Mecanismos: efeitos da DC na estabilidade intrínseca das membranas neuronais, além da relação com a glia circundante e sistemas de neurotransmissores.

Diversas hipóteses têm surgido para explicar a redução da epileptogênese induzida por esta dieta. Isto inclui efeitos sobre os lipídeos das membranas neuronais ou gliais (composição, mobilidade ou função), sobre o metabolismo energético cerebral (metabolismo da glicose, resultando em elevação do limiar convulsivo) ou efeitos sobre a excitabilidade neuronal (através de interações com neurotransmissores) (Stafstrom, 1999).

1.2 O hipocampo e seus astrócitos

O hipocampo comumente está envolvido na gênese de distúrbios convulsivos em humanos e em roedores (Morimoto, 2004). Registros de eletroencefalograma de pacientes com epilepsia do lobo temporal mostram geralmente anormalidades de descarga, originárias no hipocampo ou em locais relacionados (Engel, 1996).

O interesse dos pesquisadores no hipocampo deve-se ao fato de ser uma área altamente reativa a uma variedade de tratamentos. Também é altamente suscetível ao dano neuronal e à reorganização da circuitaria induzida por repetidas descargas epiléticas. Virtualmente quaisquer elevações substanciais nos níveis normais de atividade nesta estrutura disparam centenas de mudanças mensuráveis nas células hipocampais, circuitos e funções (Morimoto *et al*, 2004)

O hipocampo, de acordo com a terminologia de Lorente de Nó (1934), é dividido em regiões – CA1, CA2, CA3 e CA4. Embora a proporção e localização anatômicas do hipocampo sejam absolutamente distintas entre humanos e roedores, os circuitos neuronais entre as sub-regiões são similares (Bear *et al*, 2002). No rato, As regiões CA3 e CA2 formam uma grande cavidade inferior, e a região CA1 forma uma região distal dorsal. As regiões CA3 e CA1 apresentam também uma clara diferenciação entre si, no tamanho das células piramidais e nas conexões neuronais de cada região. As células piramidais da região CA3 recebem terminações das fibras musgosas a partir do giro denteado, mas as células piramidais da região CA1, não. A região CA2 é uma estreita zona de células interpostas entre CA3 e CA1, que possuem grandes corpos celulares piramidais como CA3, mas não recebem inervação das fibras musgosas, como CA1. Apesar desta divisão ser questionada, a soma das evidências parecem confirmar uma diferença anatômica e talvez funcional com relação às outras regiões (Paxinos, 1995). A via septo-hipocampal é uma importante aferência colinérgica ao hipocampo, provavelmente projetando para as regiões dendríticas proximais de neurônios piramidais e para os interneurônios (Haas, 1983). Já o giro denteado, junto com o hipocampo e o *subiculum*, faz parte da formação hipocampal, envolvida com outras partes do sistema límbico na formação da memória.

Trabalhos com ratos mostraram que os requerimentos temporais para o hipocampo dorsal e o hipocampo ventral são diferentes para a consolidação na tarefa de esquila inibitória: o hipocampo dorsal foi necessário durante os 90 minutos e o restante do hipocampo somente durante 15 minutos após a aquisição (Lorenzini *et al.*, 1999). O hipocampo dorsal parece ser preferencialmente envolvido nas tarefas requerendo o uso de estratégia de localização. O hipocampo ventral parece estar envolvido na avaliação do medo e elaboração. Outra informação importante é que a inati-

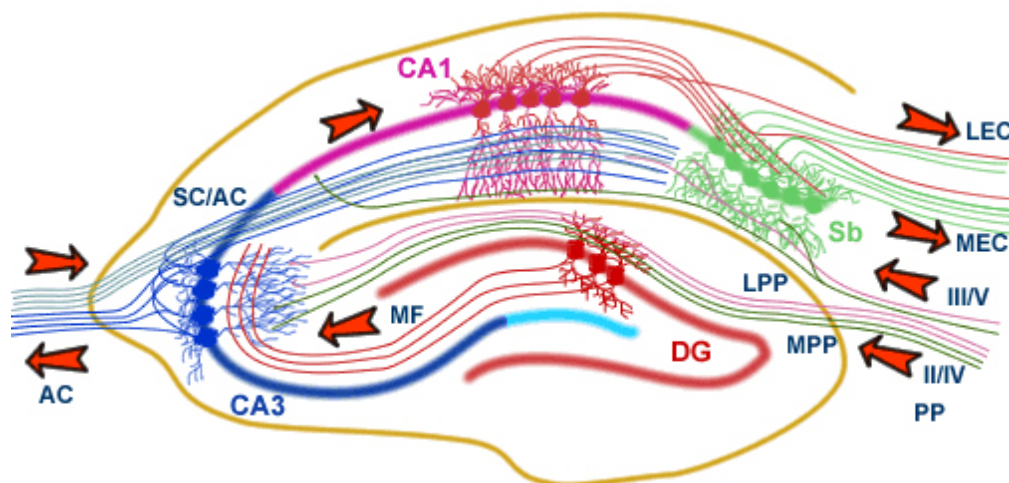


Figura 1 - A rede hipocampal: o hipocampo forma principalmente uma rede unidirecional, com aferências do córtex entorrinal (EC) que forma conexões com o giro dentado (DG) e neurônios piramidais de CA3 através da via perforante (PP) – separando para lateral e medial. Os neurônios de CA3 recebem aferências vindas do giro dentado através da via das fibras musgosas (MF). Eles enviam axônios às células piramidais de CA1 através da via colateral de Schaffer (SC), assim como das células da região CA1 do hipocampo contralateral através da via comissural associacional (AC). Os neurônios de CA1 também recebem aferências diretamente da via perforante e enviam axônios para o subículo (Sb). Estes neurônios por sua vez enviam a principal eferência dorsal para o EC, formando uma alça. Adaptado de www.bris.ac.uk.

vação bilateral do hipocampo é necessária para interromper a resposta na Esquila Inibitória (Lorenzini *et al.*, 1999). Uma importante característica é que o hipocampo é uma estrutura importante para a aquisição e para o processo inicial da consolidação da memória (Izquierdo *et al.*, 1997; Quillfeldt *et al.*, 1996).

Os astrócitos no hipocampo têm um diâmetro de 10 a 20 μ m e seus processos estendem-se por até 20-30 μ m, formando células estreladas, que no *stratum radiatum* da área CA1 são radiais (Rocha *et al.*, 1998). Ocupam entre 4 e 8% do volume hipocampal total, sendo assim o subtipo glial

predominante (Ventura & Harris, 1999). Junto a eles também encontram-se oligodendrócitos e microgliócitos. A presença astrocítica próxima às sinapses é importante para a função sináptica. Eles exercem influência através da modulação do volume, composição, concentração de íons, neurotransmissores, neuromoduladores e recursos energéticos dentro do espaço extracelular. O envolvimento de astrócitos na regulação da neurotransmissão tem sido bastante evidenciado, sendo a sinapse considerada uma tríade funcional: pré-sinapse, pós-sinapse e peri-sinapse astrocítica (Araque *et al*, 1999).

Além disso, os astrócitos também funcionam como elementos de transmissão não-sináptica, através de uma rede chamada sincício astrocítico. Ocorre a difusão de moléculas no sincício através de junções comunicantes entre os astrócitos. O cálcio é um exemplo, já que se propaga em ondas através do sincício, induzido pelo glutamato (Fróes & Menezes, 2002; Araque *et al*, 2001). Estas ondas de cálcio resultam em modulação a longa distância na composição e concentração de moléculas no espaço extracelular se o fluxo de cálcio entre os astrócitos através da rede conduzir a uma liberação cálcio-sensível e captação de íons e neuromoduladores.

Evidências sugerem que a glicose é parcialmente metabolizada pelos astrócitos e produtos intermediários são liberados para o uso neuronal (Tsacopoulos & Magistretti, 1996). No hipocampo, quando o metabolismo glial é bloqueado por fluorocitrato, um inibidor do ciclo de Krebs glia-específico, a transmissão sináptica é inibida (Keyser & Pellmar, 1994). Isto significa que os neurônios dependem dos astrócitos para fornecer o *combustível* para a função sináptica e neuronal. Além disso, outras evidências sugerem que o aporte energético oferecido pelo astrócito é dependente da atividade sináptica. O glutamato estimula a captação da glicose e subsequente liberação de lactato no espaço extracelular (Pellerin & Magistretti, 1994; Pfrieger & Barres, 1996). Deste modo, a atividade neuronal depende de e resulta em liberação de substratos energéticos pela glia. Além do suporte energético, da captação de neurotransmissores e da defesa antioxidante (Pellerin & Magistretti, 1994) os astrócitos liberam diversos fatores neurotróficos para sobrevivência e plasticidade neuronal, tais como

BDNF (*brain-derived neurotrophic factor* – fator neurotrófico derivado do encéfalo) e S100B.

1.3 A Proteína S100B

As proteínas S100 foram descritas pela primeira vez em 1965 por Moore, tendo recebido este nome por serem parcialmente solúveis em uma solução de sulfato de amônia 100%, em pH neutro.

A S100B é uma proteína astrogliar envolvida na regulação do citoesqueleto e possivelmente do ciclo celular (Donato, 2001). Modula a fosforilação de diversas proteínas do citoesqueleto, incluindo a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), formadora dos filamentos intermediários astrocitários

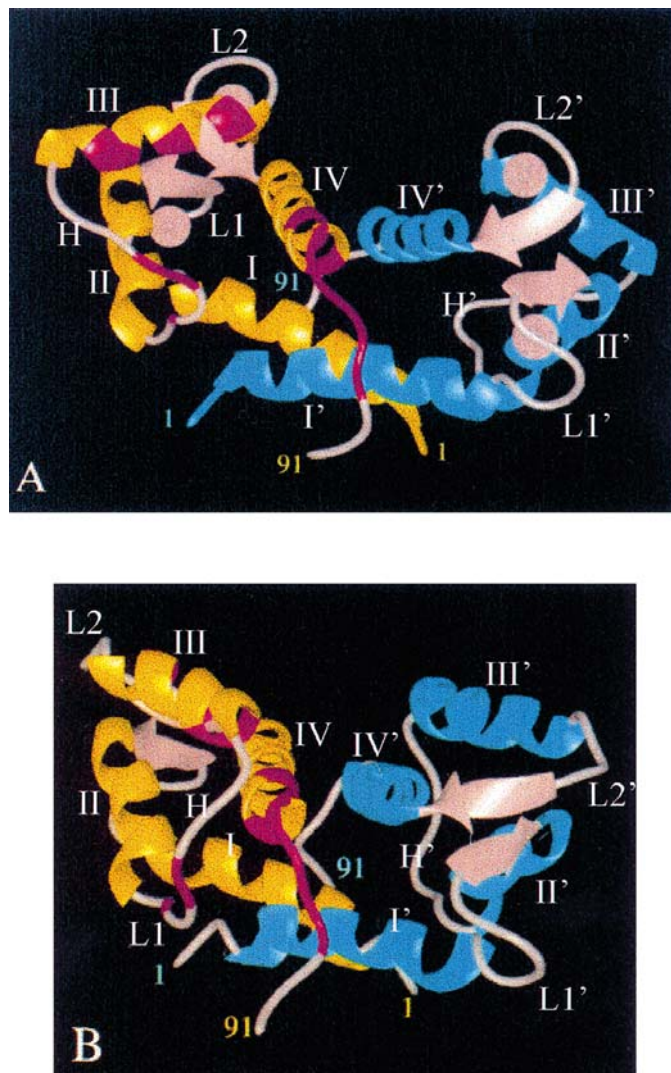


Figura 2 - Estrutura da S100B: estrutura do dímero de S100B ligada ao cálcio (esferas cor-de-rosa nas alças L1, L2, L1' E L2') (A) e livre de Cálcio (B). Note que a molécula estende-se quando se liga ao cálcio. Adaptado de Donato, 1999.

(Ziegler *et al.*, 1998). Além disto, tem uma ação neurotrófica sobre neurônios, tendo um papel importante durante a sinaptogênese (Asmitia *et al.*, 1990; Kligman *et al.*, 1987; Selinfreund *et al.*, 1991). A S100B tem sido usada como marcador de gliose e/ou ativação glial em diversas situações fisiopatológicas (O'Dowd *et al.*, 1997).

Estudos comportamentais utilizando-se tanto animais transgênicos (Gerlai *et al.* 1994 e 1995; Roder *et al.*, 1996), quanto a injeção de antisoro para S100B em animais normais (Gromov *et al.*, 1994; Karpiak *et al.*, 1976; O'Dowd *et al.*, 1997) mostram que sua diminuição provoca déficits de memória para as tarefas de aprendizado no labirinto em T, esquiva inibitória, labirinto aquático e desenvolvimento de reflexo condicionado alimentar. Como sua injeção intrahipocampal nas tarefas de esquiva inibitória e habituação ao campo aberto provocaram uma facilitação robusta na primeira tarefa e uma não tão clara na Segunda (Mello e Souza *et al.*, 2000) e como em fatias hipocampais a S100B provoca o bloqueamento da LTP (Lewis & Teyler, 1986), é possível que esta proteína aja também na plasticidade sináptica e processamento da informação.

1.4 A proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP)

Originalmente descoberta em casos de esclerose múltipla, doença caracterizada por desmielinização, intensa gliose reativa e formação de cicatrizes compostas de axônios expostos circundados por astrócitos repletos de filamentos gliais; é a principal proteína de filamentos intermediários de 8-9 nm em astrócitos maduros no SNC. É moduladora da estabilidade estrutural dos processos astrocíticos (Eng *et al.*, 2000).

No SNC de vertebrados superiores, seguidos de injúria resultante de trauma, doença, desordem genética ou insulto químico, os astrócitos tornam-se reativos e respondem de uma maneira típica, denominada astrogliose (Eng *et al.*, 2000), caracterizada pela rápida síntese de GFAP e filamentos intermediários, proliferação e/ou hipertrofia glial.

Um aumento no conteúdo de GFAP em astrócitos ocorre gradualmente durante o curso da vida em camundongos, ratos e humanos (Dahl, 1976; Nichols *et al.*, 1993). Três desordens mostram intensa gliose: a esclerose múltipla; a adenoleucodistrofia, desordem do metabolismo lipídico

hereditária e a doença de Alexander, caracterizada por grande gliose e depósitos de fibras de Rosenthal.

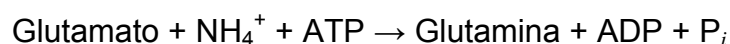
A gliose reativa ocorre em qualquer tipo de insulto ao SNC, mas a região anatômica, severidade da gliose e seqüência de desenvolvimento temporal varia entre doenças como a esclerose lateral amiotrófica (ELA) e as doenças de Gertmann-Straussler (GSS), Huntington, Wilson, Pick, Parkinson, Alzheimer e Down (Eng *et al*, 2000); assim como nas desordens convulsivas, em razão formação de cicatrizes no córtex após morte neuronal devido à excitotoxicidade (Eng *et al*, 2000).

1.5 Glutamina sintetase (GS):

Além da GFAP e S100B, há uma outra proteína específica de astrócitos que pode ser usada como marcadora de atividade glial; a glutamina sintetase (GS). É uma enzima que catalisa a conversão do glutamato a glutamina na presença de ATP e amônia, sendo uma enzima-chave no metabolismo do nitrogênio no SNC e desempenhando as seguintes funções (Petito *et al*, 1992):

1. a retirada de substâncias neurotóxicas, como glutamato e amônia;
2. prover de glutamina os neurônios, para utilização pela glutaminase neuronal, síntese protéica ou metabolismo oxidativo.

Sua reação consome uma molécula de ATP:



Não apenas modula a atividade dos neurônios glutamatérgicos, como também desempenha um papel no metabolismo da transmissão inibitória gabaérgica, através da transaminação (Kosenko *et al*, 2003).

Não é encontrada em neurônios, oligodendrócitos ou microgliócitos, apenas em astrócitos e na glia de Müller (Kosenko *et al*, 2003).

Sua ativação pode estar ligada a um aumento na síntese de glutamina, tendo um papel na mediação da depleção do ATP induzida por amônia e pela toxicidade e morte celular induzida por amônia (Albrech & Dolinska, 2001). A modulação da GS acontece por atividade de receptores

tipo NMDA: a ativação destes está ligada à formação de óxido nítrico (Kosenko *et al*, 2003). Este atravessa a membrana e modifica covalentemente a glutamina sintetase (por nitrosilação ou nitração). Esta modificação reduz a atividade da enzima. Modificação reversível, em que a redução da ativação dos receptores NMDA reduz a inibição tônica da glutamina sintetase pelo óxido nítrico resultando em aumento da atividade da enzima (Konsenko *et al*, 2003).

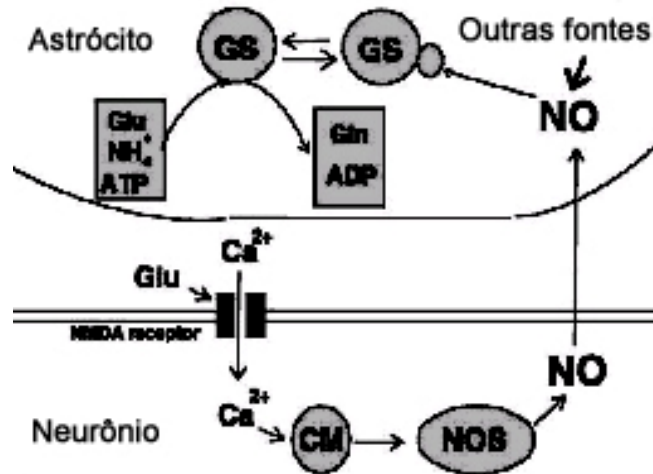


Figura 3 – Modulação da glutamina sintetase pelos receptores NMDA e o óxido nítrico: a ativação dos receptores NMDA induzem a ativação da óxido nítrico sintase e aumenta a formação de óxido nítrico que difunde-se nos astrócitos vizinhos e modifica covalentemente. Ver mais detalhes no texto. Adaptado de Konsenko *et al*, 2003.

2. Objetivos

Considerando (i) a importância do hipocampo na epileptogênese; (ii) a importância da atividade glial na plasticidade neural; e (iii) a redução de S100B no líquido de animais que receberam dieta cetogênica, este trabalho teve como objetivos:

Objetivo geral

Avaliar a possível alteração de parâmetros gliais no hipocampo de ratos tratados com dieta cetogênica.

Objetivos específicos

1. Avaliar o conteúdo da proteína GFAP em três subregiões hipocâmpais: CA1, CA2 e giro dentado, durante as 6 semanas de dieta cetogênica;
2. Avaliar o conteúdo de S100B;
3. Medir a atividade da glutamina sintetase;
4. Investigar alguma alteração do comportamento cognitivo, dependente do hipocampo.

3. Publicação

Manuscrito submetido à revista *Nutritional Neurochemistry* em 31 de março de 2005, com o título:

Transitory gliosis in the CA3 hippocampal region in rats fed on a ketogenic diet

Transitory gliosis in the CA3 hippocampal region in rats fed on a ketogenic diet

M. C. SILVA¹, J. ROCHA², C. S. PIRES³, L. C. RIBEIRO³, G. BROLESE³, M. C. LEITE³,
L. M. V. ALMEIDA³, F. TRAMONTINA³, D. R. ZIEGLER², & C. A. GONÇALVES^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Neurociências, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brazil,

²Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo RS, Brazil, and ³Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brazil

(Received 29 June 2005; in revised form 1 November 2005; In final form 13 November 2005)

Abstract

The ketogenic diet (KD) is a high-fat, low-protein and low-carbohydrate diet included as medical practice against seizure disorders, particularly in children refractory to conventional anti-epileptic drug treatment. However, the molecular basis of its therapeutic effect remains unclear. Considering the growing evidence for the importance of glial cells for neuronal development, survival and plasticity, we investigated astrocyte protein markers from KD fed rats, in different regions of hippocampus, a brain structure commonly involved in seizure disorders. We found a transitory increment in GFAP in the CA3 hippocampal region, but not in the CA1 or dentate gyrus (DG). This change was not accompanied by changes in S100B content or glutamine synthetase activity. In order to evaluate possible hippocampal involvement we investigated spatial-cognitive behavior using the water-maze task. No changes were observed. This transitory gliosis in CA3 could be related to, or precede, other associated changes proposed to be involved in the attenuation of seizure disorders. These data reinforce the importance of hippocampal astrocytes as cell targets during KD feeding.

Keywords: GFAP, gliosis, glutamine synthetase, ketogenic diet, S100B

Introduction

Ketogenic diets (KD) have been used in medical practice for seizure disorders of children not helped by conventional anti-epileptic drug treatment (Hemingway et al. 2001). The KD efficacy can be evaluated in experimental animal models of induced seizure with kainic acid (Muller-Schwarze et al. 1999) and pentylentetrazole (PTZ) (Bough and Eagles 1999; Ziegler et al. 2004). However, the basis of the therapeutic effect of this diet is still unknown (Stafstrom and Bough 2003; Yudkoff et al. 2004).

The hippocampus is a critical brain region involved in seizure genesis, besides its physiological role in learning and memory. Indeed, several effects of the KD have been reported in hippocampal

preparations, including reduction of mossy fiber sprouting (Muller-Schwarze et al. 1999), increase in protein phosphorylation (Ziegler et al. 2002), decrease in dentate gyrus (DG) excitability (Bough et al. 2003), increase in glutathione peroxidase activity (Ziegler et al. 2003), and activation of mitochondrial uncoupling proteins (Sullivan et al. 2004). Although, neuronal excitability was not affected directly by ketone bodies *in vitro* (Stafstrom et al. 1999), other effects induced by these energetic substrates have been reported to be important to the understanding of the neuroprotection induced by the KD, e.g. acetoacetate protected hippocampal neurons against glutamate-induced injury (Massieu et al. 2003).

Correspondence: C. A. Gonçalves, Departamento de Bioquímica, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, 90.035-003, Porto Alegre, Brazil. Fax: 55 51 316 5535. E-mail: casg@ufrgs.br

Astrocytes have a variety of roles in maintaining neural tissue physiology, including energetic support, uptake and metabolism of glutamate, antioxidant activity and secretion of neurotrophic factors (Takuma et al. 2004). Some metabolic alterations in astrocytes, induced directly by ketone bodies, maybe associated with changes in the neurotransmitters, glutamate and GABA (Yudkoff et al. 2004) or in neurotrophic factors (Leite et al. 2004). Recently, we described a decrease in the content of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic cytokine (Donato 2001; Van Eldik and Wainwright 2003), in the cerebrospinal fluid of KD fed rats (Ziegler et al. 2004).

In this study, we investigated three specific astrocyte markers to evaluate glial activation, glial fibrillary acid protein, S100B and glutamine synthetase activity, in different hippocampal regions of rats fed with KD for 6 weeks. In addition, the spatial-cognitive behavior of these animals was evaluated using the water-maze task at the end of treatment, in order to assess the hippocampal integrity (McDonald et al. 2004).

Materials and methods

Animals and diet

Thirty-day-old, 75 male Wistar rats from the local breeding colony were divided into two groups: C, control rats that received regular laboratory ration and K, rats that received the KD (Table I), prepared as described previously (Ziegler et al. 2002). All animals were fed and provided with water *ad libitum* for six weeks. Sixteen animals (eight from each group) were sacrificed in the first and sixth week for neurochemical analysis. Other seventeen animals were used for behavior task. Procedures were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Animals were weighed weekly and ketonuria was evaluated before sacrifice.

Hippocampal slices

Animals were sacrificed by decapitation, the hippocampi were dissected and cut into 0.4 mm slices with a McIlwain chopper. Microslices (0.5 mm in diameter) from CA1, CA3 and DG were obtained with a stainless steel punch. Microslices were homogenized in PBS, pH 7.4, containing 1 mM EGTA and 1 mM PMSF and stored at -20°C . For glutamine synthetase activity microslices were homogenized in 0.15 M KCl and immediately assayed.

ELISA for S100B and GFAP

Immunocontent of S100B was measured by ELISA, as described previously (Tramontina et al. 2000, 2002). Briefly, 50 μl of sample plus 50 μl of barbital

Table I. Composition of the control and KDs.

Control diet*	g/100 g	Ketogenic diet	g/100 g
Total fat	12	Lard	69
		Sunflower oil	0.5
Protein	23	Protein [†]	24
Fiber	3	Fiber	1
Ash	6	Ash [‡]	4
Vitamin	2	Vitamin [¶]	1.5
Carbohydrates	54	Carbohydrates	0

* Commercial non-purified diet, Nuvilab-CR1 (Curitiba, Brazil),
[†] Casein, purity 87% (from Herzog, Porto Alegre, Brazil) supplemented with 0.15% L-Methionine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil),
[‡] Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100 g of ration: NaCl, 557; KI, 3.2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄·7H₂O, 108; MnSO₄·H₂O, 16; ZnSO₄·7H₂O, 2.2; CuSO₄·5H₂O, 1.9; CoCl₂·6H₂O, 0.09,
[¶] Vitamin mixture (from Roche), mg/100 g of ration: Vitamin A, 4; Vitamin D, 0.5; Vitamin E, 10; Menadione, 0.5; Choline, 200; PABA 10; Inositol 10; Niacin, 4; Pantothenic acid, 4; Riboflavin, 0.8; Thiamin, 0.5; Pyridoxine, 0.5; Folic acid, 0.2; Biotin, 0.04; Vitamin B 12, 0.003.

buffer were incubated for 3 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1, from Sigma). Peroxidase-conjugated anti-S100 (from DAKO) was then incubated for 1 h. Color reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.1 to 4 ng/ml. Protein was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard. ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plate with 100 μl samples containing 30 μg of protein for 48 h at 4°C . Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit (DAKO) for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. The color reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. GFAP content in control samples in each brain region were assumed to be 100%.

Glutamine synthetase activity

The enzymatic assay was performed according to Petito et al. (1992). Homogenate (0.1 ml) was added to 0.2 ml of reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂; 50 L-glutamate; 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine-HCl; 10 ATP and incubated for 15 min at 37°C . The reaction was stopped by the addition of 0.8 ml of a solution containing (in mM): 370 ferric chloride; 670 HCl; 200 trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ -glutamylhydroxamate (from Sigma) treated with ferric chloride reagent.

Spatial learning

To assess spatial learning, a Morris-type water-maze task was performed (Morris 1984; Vicente et al. 2004) using a circular pool (180 cm diameter, 60 cm high), filled with water (depth 30 cm; $24 \pm 1^\circ\text{C}$), placed in a room that was rich in consistently located spatial cues (including a large wood door, two prominent posters on one wall, and the experimenter). An escape platform (10 cm diameter) was placed in the middle of one of the quadrants, 1.5 cm below the water surface, equidistant from the sidewall and the middle of the pool. The platform provided the only escape from the water and was located in the same quadrant in every trial. The position of the animal in the pool was recorded during the entire experiment. Four different starting positions were equally spaced around the perimeter of the pool. On each of the training days, all four start positions were used once in a random sequence, i.e. four training trials per day. A trial began by placing the animal in the water facing the wall of the pool at one of the starting points. If the animal failed to escape within 60 s it was gently conducted to the platform by the experimenter. The rat was allowed to stay there for 20 s. The inter-trial interval was 10 min. After each trial, the rats were dried and returned to their cages at the end of the session. Animals were trained for 5 days. Twenty-four hours after the last training session, the rats were subjected to a test session. Before this session, the submerged platform was removed. The retention test consisted of placing the animals in the water for 1 min. The latency in reaching the original position of the platform, the number of crossings in that place and the time spent in the target quadrant compared to the opposite quadrant were measured.

Statistical analysis

Parametric data are reported as mean \pm standard error and were analyzed by Student's *t*-test (when two groups were considered), two-way ANOVA, or by repeated measures ANOVA.

Table II. Body weight and ketonuria of rats fed with KD for six weeks.

	Control rats	KD rats
Body weight*	270 ± 15	245 ± 20
Ketonuria†	-	+/++

*Values expressed in grams are mean \pm standard error from control group ($n = 18$) and KD group ($n = 15$), †Ketonuria was measured by a semi-quantitative test (Keto-Diastix) from Bayer Diagnostics, where negative means (<0.4 mM of acetoacetate); one cross and two crosses mean more than 0.8 and 1.2 mM of acetoacetate, respectively. In KD group 12 animals were one-cross ketonuria and three animals were two-crosses ketonuria.

Results

Rats were subjected to the control or KD for six weeks. A non-significant decrease in body weight was observed during this period. It is important to mention that this decrease becomes significant after 8–10 weeks of KD feeding (data not shown). Increased ketonemia was confirmed by a positive ketonuria measured by a semi-quantitative test (Table II).

GFAP content measurement in specific hippocampal regions showed an increase in GFAP in CA3 at the end of the first week of the KD diet. At this same time of treatment, no change was observed in DG ($p = 0.711$) and a discrete increase (but no significant, $p = 0.157$) was observed in CA1. The CA3 change was not observed after six weeks of KD (Figure 1).

Conversely, no changes were observed in S100B content in the CA3 region at 1 or 6 weeks of KD

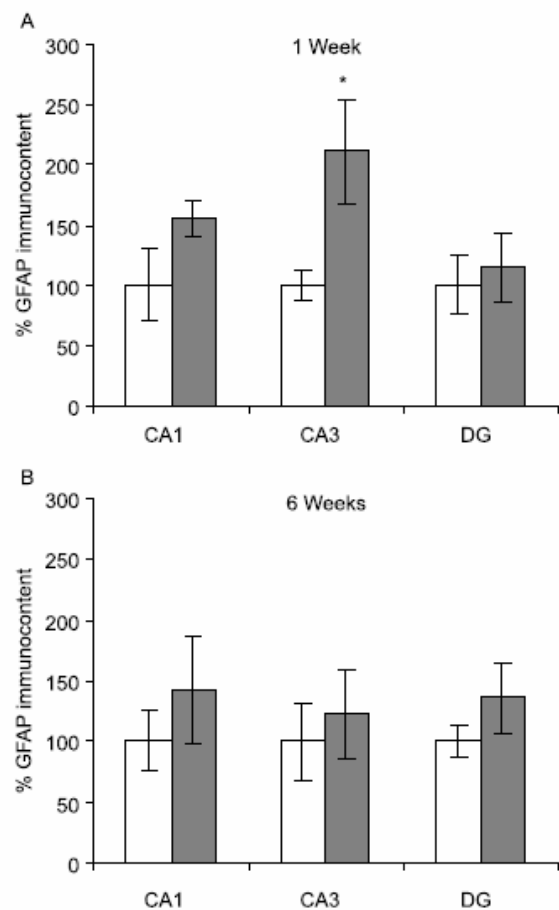


Figure 1. GFAP content in brain tissue of rats fed on a KD. Rats fed on a KD were sacrificed at 1 (panel A) or 6 (panel B) weeks. Hippocampi were dissected out and GFAP content of microslices from specific regions (CA1, CA3 and DG) were analyzed by ELISA. Bars represent the mean \pm S.E.M. of control (white) and KD (grey) groups. *Significantly different from respective control assumed as 100%, $p < 0.05$, $n = 8$).

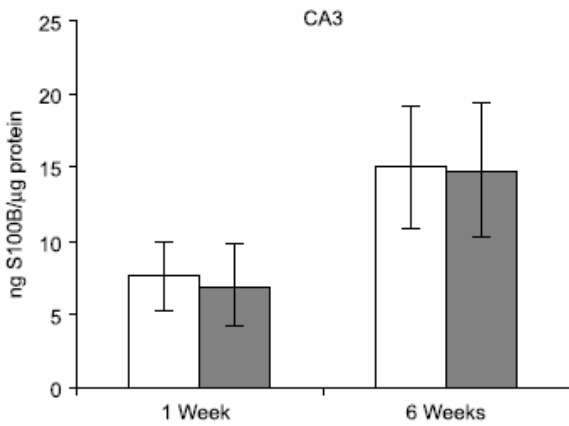


Figure 2. S100B content in CA3 hippocampal region of rats fed on a KD. Rats fed with KD were sacrificed at 1 or 6 weeks. S100B content of microslices from CA3 region was analyzed by ELISA. Bars represent the mean \pm S.E.M of control (white) and KD (grey) groups. No significant differences from the respective controls were found ($n = 8$).

(Figure 2). Similarly, no changes were observed in CA1 and DG (data not shown). No increase in hippocampal S100B occurred between 1 and 6 weeks, independent of the diet, in keeping with the normal ontogeny of this protein ($R^2 = 0.276$; $p = 0.128$).

No changes in glutamine synthetase activity were observed in the CA3 region at 1 or 6 weeks of the KD (Figure 3) or in any hippocampal region (data not shown). Taking together the enzymatic activities from all hippocampal regions we observed a decrease between 30- and 70-old-day rats, independent of diet ($p = 0.021$, inset in Figure 3).

In order to evaluate possible non-seizure related effects on the hippocampus, we investigated spatial-cognitive behavior using the water-maze task. No changes in the water-maze test were observed between the two groups (Figure 4).

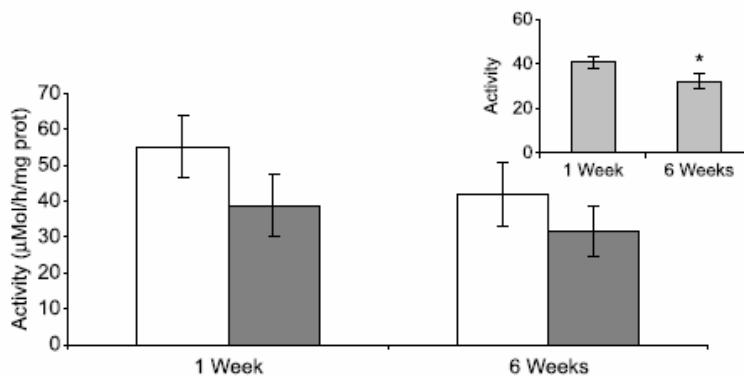


Figure 3. Glutamine synthetase activity in CA3 hippocampal region of rats fed on a KD. Rats fed with KD were sacrificed at 1 or 6 weeks. Glutamine synthetase activity in microslices from CA3 region was determined by a colorimetric assay. Bars represent the mean \pm S.E.M of control (white) and KD (grey) groups. *Inset shows a significant difference between 30- and 70-day-old rats, when all hippocampal regions were brought together and analyzed independently of diet ($p < 0.05$).

Discussion

There are many hypotheses to explain the anticonvulsant efficacy of KD in seizure disorders (Stafstrom and Bough 2003). Recently, changes in the expression of various genes were shown by cDNA microarray analysis in the hippocampus of KD fed rats (Noh et al. 2004), where an increase in the gene expression of enzymes involved in the mitochondrial ATP synthesis was observed, supporting the idea of an improvement in the brain energy metabolism proposed originally by De Vivo et al. (1978). Moreover, they found an increase in the gene expression of the monocarboxylic transporter (MCT1), as previously described in cerebral cortex (Leino et al. 2001). All these changes were observed during the first week of KD feeding, suggesting important early changes. However, no changes in gene expression of specific astrocyte markers were detected in whole hippocampal preparations. Due to the growing evidence of the importance of glial cells for neuronal development, survival and plasticity we investigated astrocyte protein markers in the hippocampal regions of KD fed rats.

Interestingly, we found a specific and significant increment of GFAP in the CA3 region during the first week of KD feeding. This change was not observed five weeks later. In a previous study, we did not observe any changes in GFAP content in whole hippocampal slices from KD fed rats (Ziegler et al. 2004). Based on the current concept of gliosis (O'Callaghan 1991), defined as an increase in GFAP content, it is possible to conceive a transitory gliosis in CA3 induced by KD diet. However, further investigations using bromodeoxyuridine incorporation and immunohistochemistry for GFAP will allow a better characterization of this change in CA3.

S100B protein is a member of a multigenic family of calcium-modulated proteins involved in cell growth and cytoskeleton reorganization (Donato 2001).

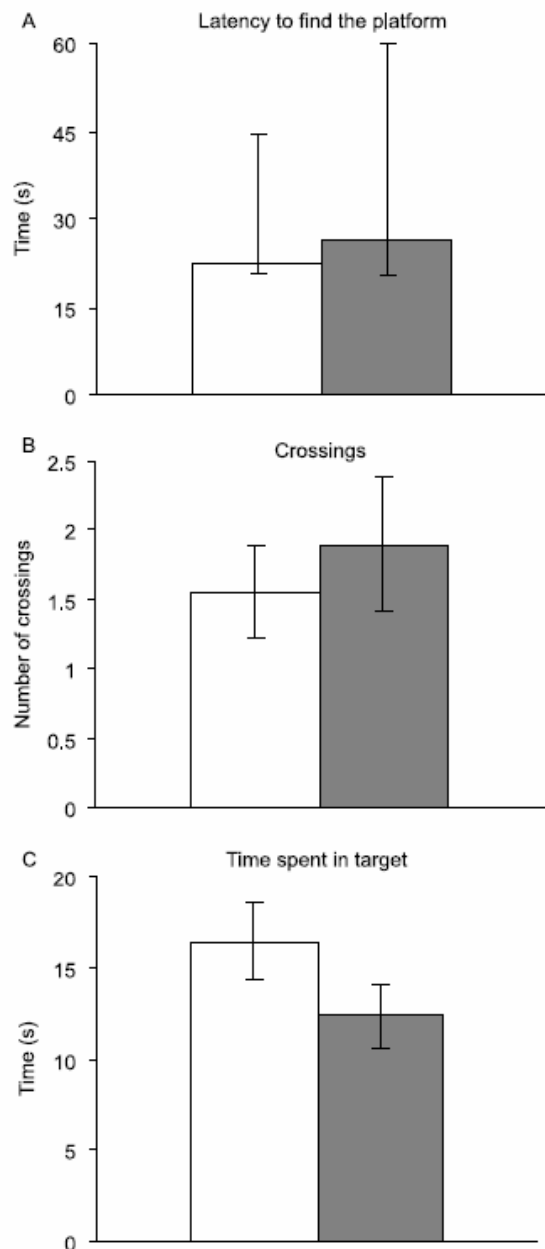


Figure 4. Cognitive behavior in the water-maze task of rats fed on a KD for 6 weeks. Spatial learning of 70-day-old control and KD fed rats was evaluated by measurement of the latency to find the platform (A), crossings (B) and time spent in target quadrant (C). Bars represent the median (with interquartile intervals) (A) or mean \pm S.E.M (B and C) of control (white) and KD (grey) groups. Control and KD groups contained 10 and 7 animals, respectively. No statistical differences were found (Two-way ANOVA).

In the nervous system, this protein is primarily expressed by astrocytes and secreted by these cells and plays a neurotrophic role in neighboring cells. We previously reported that the KD diet induces a decrease in cerebrospinal fluid S100B (Ziegler et al. 2004). In this study, no changes in S100B immunoccontent were observed in CA3 or any other hippocampal region, at 1 or 6 weeks of KD feeding.

However, in brain tissue only a small quantity of S100B is released into the extracellular medium (Tramontina et al. 2002) and, therefore, changes in CSF content are not necessarily accompanied by significant changes in the brain tissue. In fact, changes in the secretion of S100B in astrocyte cultures induced by ketone bodies were not accompanied by changes in cellular content (Leite et al. 2004). This suggests that ketone bodies may be able to induce changes directly in S100B secretion, affecting all astrocytes or, possibly, as yet unidentified specific populations of astrocytes. The resulting alteration in S100B secretion suggests some type of glial mobilization.

An interesting hypothesis for the anticonvulsant efficacy of the KD is the change in glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) neurotransmitters, secondary to metabolic changes induced by ketone bodies in astrocytes (Yudkoff et al. 2004). It has been proposed that ketone bodies consumption reduces transamination of glutamate to aspartate and that, therefore, more glutamate is available for glutamine synthesis (in astrocytes) and then GABA (in GABAergic neurons), i.e. ketosis is accompanied by an increase of the flux via astrocyte glutamine synthetase. We did not find changes in the activity of this enzyme in the CA3 or other region of the hippocampus. Considering that this enzyme is not modulated by allosteric effectors, it is possible that the unchanged activity in KD fed rats observed here reflects unchanged content of enzyme, however, this does not rule out the putative increment in the flux from Glu to Gln in astrocytes during ketosis (Yudkoff et al. 2004). Moreover, ketone bodies also appear not to affect astrocyte glutamate uptake (Yudkoff et al. 1997; Leite et al. 2004).

Based on the gliosis observed in CA3, we decided to evaluate spatial learning behavior in these animals later on, using the Morris water-maze. Performance in this task is strongly linked to hippocampal function (McDonald et al. 2004). No alterations were observed in the water-maze task in 70-day-old rats fed with KD rats for six weeks. These results suggest that the alteration observed in CA3 in the first week of KD feeding hippocampus do not alter spatial memory.

It is unclear at present the meaning of this gliosis and its relation with seizure control. It is possible that the transitory gliosis observed in CA3 may be linked with the control of seizure genesis. A feedback communication, occurring between CA3 astrocytes and DG neurons, may be involved in other alterations previously observed, such as reduction in mossy fiber sprouting (Muller-Schwarze et al. 1999) and decrease in excitability (Bough et al. 2003).

In summary, we found a specific and transitory increment in GFAP in the CA3 hippocampal region in KD fed rats, not accompanied by changes in S100B content or glutamine synthetase activity in this region. The significance of this gliosis is unclear at this

moment, but it could be related to or precede other changes involved in the attenuation of seizure disorders. These data reinforce the importance of the hippocampal astrocytes as cell targets during KD feeding.

Acknowledgements

Financial support by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Bough KJ, Eagles DA. 1999. A ketogenic diet increases the resistance to entylenetetrazole-induced seizures in the rat. *Epilepsia* 40:138–143.
- Bough KJ, Schwartzkroin PA, Rho JM. 2003. Calorie restriction and ketogenic diet diminish neuronal excitability in rat dentate gyrus *in vivo*. *Epilepsia* 44:752–760.
- De Vivo DC, Leckie MP, Ferrendelli JS, McDougal Jr, DB. 1978. Chronic ketosis and cerebral metabolism. *Ann. Neurol.* 3:331–337.
- Donato R. 2001. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33:637–668.
- Hemingway C, Freeman JM, Pillas DJ, Pyzik PL. 2001. The ketogenic diet: A 3- to 6-year follow-up of 150 children enrolled prospectively. *Pediatrics* 108:898–905.
- Leino RL, Gerhart DZ, Duelli R, Enerson BE, Drewes LR. 2001. Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochem. Int.* 38:519–527.
- Leite M, Frizzo JK, Nardin P, Almeida LM, Tramontina F, Gottfried C, Gonçalves CA. 2004. β -hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res. Bull.* 63:139–143.
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernandez-Fonseca K. 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120:365–378.
- McDonald RJ, Hong NS, Devan BD. 2004. The challenges of understanding mammalian cognition and memory-based behaviours: An interactive learning and memory systems approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28:719–745.
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11:47–60.
- Muller-Schwarze AB, Tandon P, Liu Z, Yang Y, Holmes GL, Stafstrom CE. 1999. Ketogenic diet reduces spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the kainic acid model. *Neuroreport* 10:1517–1522.
- Noh HS, Lee HP, Kim DW, Kang SS, Cho GJ, Rho JM, Choi WS. 2004. A cDNA microarray analysis of gene expression profiles in rat hippocampus following a ketogenic diet. *Mol. Brain Res.* 129:80–87.
- O'Callaghan JP. 1991. Assessment of neurotoxicity: Use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed. Environ. Sci.* 4:197–206.
- Petito CK, Chung MC, Verkhovsky LM, Cooper AJL. 1992. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 569:275–280.
- Stafstrom CE, Bough KJ. 2003. The ketogenic diet for the treatment of epilepsy: A challenge for nutritional neuroscientists. *Nutr. Neurosci.* 6:67–79.
- Stafstrom CE, Wang C, Jensen FE. 1999. Electrophysiological observations in hippocampal slices from rats treated with the ketogenic diet. *Dev. Neurosci.* 21:393–399.
- Sullivan PG, Rippey NA, Dorenbos K, Concepcion RC, Agarwal AK, Rho JM. 2004. The ketogenic diet increases mitochondrial uncoupling protein levels and activity. *Ann. Neurol.* 55:576–580.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T. 2004. Astrocyte apoptosis: Implications for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 72:111–127.
- Tramontina F, Karl J, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Portela LV, Gonçalves CA. 2000. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res. Protoc.* 6:86–90.
- Tramontina F, Conte S, Gonçalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, Gonçalves CA. 2002. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22:373–378.
- Van Eldik LJ, Wainwright MS. 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* 21:97–108.
- Vicente E, Boer M, Leite M, Silva M, Tramontina F, Porciúncula L, Dalmaz C, Gonçalves CA. 2004. Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methylmercury-intoxicated pregnant rats. *Neurotoxicology* 25:771–777.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Grunstein R, Nissim I. 1997. Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J. Neurochem.* 69:682–692.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Nissim I. 2004. Ketogenic diet, brain glutamate metabolism and seizure control. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70:277–285.
- Ziegler DR, Araújo E, Rotta LN, Perry ML, Gonçalves CA. 2002. A ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. *J. Nutrition* 132:483–487.
- Ziegler DR, Ribeiro LC, Hagenn M, Siqueira IR, Araújo E, Torres ILS, Gottfried C, Netto CA, Gonçalves CA. 2003. Ketogenic diet increases glutathione peroxidase activity in rat hippocampus. *Neurochem. Res.* 28:1793–1797.
- Ziegler DR, Oliveira DL, Pires C, Ribeiro L, Leite M, Mendez A, Gonçalves D, Tramontina F, Portela LV, Wofchuk ST, Perry ML, Gonçalves CA. 2004. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci. Res.* 50:375–379.

4. Discussão

Há várias hipóteses que tentam explicar a eficácia anticonvulsivante da DC nos casos de convulsões (Stafstrom & Bough, 2003). Muitas mudanças na expressão gênica foram encontradas por análise de microarranjos de cDNA no hipocampo de ratos que ingerem a DC (Noh et al, 2004). Eles observaram um aumento na expressão gênica de enzimas envolvidas na síntese de ATP mitocondrial, apoiando a idéia da melhora no metabolismo energético encefálico proposto originalmente por De Vivo e colegas (De Vivo et al, 1978). Além disto, eles encontraram um aumento na expressão gênica do transportador monocarboxílico MCT1, como previamente descrito para córtex cerebral (Leino et al, 2001). Todas estas mudanças foram observadas na primeira semana de administração da DC, sugerindo importantes modificações precoces. Contudo, não foram observadas modificações na expressão gênica de marcadores astrocitários específicos em todas as preparações hipocampais. Devido à crescente evidência para a importância das células gliais para o desenvolvimento neuronal, sobrevivência e plasticidade, nós investigamos marcadores astrocitários protéicos nas diferentes regiões hipocampais de ratos alimentados com a DC.

E encontramos um aumento significativo e específico da GFAP na região CA3 na primeira semana de administração da dieta. Esta mudança não foi notada cinco semanas mais tarde. Em nosso grupo, não observamos previamente qualquer mudança no conteúdo de GFAP em todas as *fatias* hipocampais de ratos alimentados com a DC (Ziegler et al, 2004). Baseado no conceito corrente de gliose (O'Challagan, 2001), definido como um incremento no conteúdo de GFAP, é possível conceber uma gliose transitória em CA3 induzida pela DC.

A proteína S100B é um membro de uma família multigênica de proteínas moduladas pelo cálcio envolvida no crescimento celular e reorganização do citoesqueleto (Donato, 2001). No sistema nervoso esta proteína é primariamente expressa pelos astrócitos e secretada por essas células desempenhando um papel neurotrófico sobre as células vizinhas. Nosso grupo previamente registrou que a DC induz um decréscimo no

conteúdo de S100B no fluido cerebrospinal (Ziegler et al, 2004). Neste trabalho, nenhuma mudança no imunoc conteúdo foi observada em CA3 ou qualquer outra região hipocampal, com uma ou seis semanas de tratamento. Mas deve-se observar que somente uma pequena parte da S100B é liberada no meio extracelular (Tramontina et al, 2002) e, portanto, mudanças no conteúdo líquido não são necessariamente acompanhadas por mudanças teciduais significativas. De fato, mudanças na secreção de S100B em culturas de astrócitos por corpos cetônicos não são acompanhadas por mudanças no conteúdo celular (Leite et al, 2004). Isto nos permite considerar que a DC possa ser capaz de induzir mudanças diretamente na secreção de S100B, afetando todos os astrócitos ou talvez populações específicas, não identificadas ainda. A alteração resultante na secreção de S100B sugere muitos tipos de mobilização glial.

Uma hipótese interessante para explicar a eficácia anticonvulsivante da DC é a mudança na neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, secundariamente às mudanças metabólicas induzidas pelos corpos cetônicos nos astrócitos (Yudkoff et al, 2004). É proposto que os corpos cetônicos gastos reduzem a transaminação do glutamato a aspartato, e portanto mais glutamato está disponível para a síntese de glutamina nos astrócitos e GABA nos neurônios GABAérgicos, provocando redução da excitabilidade do tecido como um todo. Contudo, observações eletrofisiológicas indicam que os corpos cetônicos *per se* não reduzem a excitabilidade neuronal (Stafstrom et al, 1999). Não encontramos qualquer mudança na atividade desta enzima na região CA3 ou outra região do hipocampo. Considerando que esta enzima não é modulada por efetores alostéricos, é possível assumir que a ausência de alterações na atividade nos ratos alimentados com a DC observada no trabalho reflete uma ausência de mudança no conteúdo da enzima; mas isto não impediria o suposto aumento no fluxo do glutamato para glutamina nos astrócitos durante a cetose (Yudkoff et al, 2004). Além do mais, os corpos cetônicos também parecem não afetar a captação do glutamato (Yudkoff et al, 1997; Leite et al, 2004).

Baseado na gliose observada em CA3 decidiu-se avaliar o comportamento de aprendizado espacial nestes animais, utilizando a tarefa do labirinto aquático de Morris. O desempenho nesta tarefa está fortemente

ligado à função hipocampal. Nenhuma alteração foi observada nesta tarefa em ratos de 70 dias alimentados com a DC por seis semanas. Uma explicação para este fato é que a alteração hipocampal observada em CA3 na primeira semana de administração da DC não tem qualquer efeito sobre a memória espacial. A gliose não afetaria os circuitos do hipocampo.

É muito difícil até o momento ligar a gliose transitória observada em CA3 com o controle epileptogênese. É possível que haja uma retroalimentação entre os astrócitos de CA3 e os neurônios do giro denteado envolvidos em outras alterações previamente observadas como a redução do brotamento de fibras musgosas (Muller-Schawze et al, 1999) e o decréscimo da excitabilidade (Bough et al, 2003).

Resumindo, encontramos um aumento específico e transitório do conteúdo de GFAP em CA3, mas não acompanhado de mudanças no conteúdo de S100B ou na atividade da glutamina sintetase. O significado desta gliose é incerto até o momento, mas pode estar relacionado a ou preceder outras mudanças na vizinhança talvez envolvidas na atenuação das desordens convulsivas. Os dados reforçam a importância dos astrócitos hipocampais como alvos durante a ingestão da DC.

5. Referências Bibliográficas (relativas à Introdução e Discussão)

Albrecht, J.; Dolinska, M. (2001) Glutamine as a pathogenic factor in hepatic encephalopathy. *J. Neurosci Res* **65**: 1-5.

Araque, A.; Carmignoto, G.; Haydon, P.G. (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* **63**: 795-813.

Araque, A.; Parpura, V.; Sanzgiri, R.P.; Haydon, P.G. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *TINS* **22**(5): 208-215.

Asmitia, E.C., Dolanm K., Whitaker-Asmitia, P.M. (1990) S100B, but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Res* **516**: 354-356.

Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A. (2002) *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 2ª edição. Editora Artmed. Porto Alegre, 855p.

Bough, K.J., Schwartzkroin, P.A. and Rho, J.M. (2003) Calorie restriction and ketogenic diet diminish neuronal excitability in rat dentate gyrus in vivo. *Epilepsia* **44**:752-60.

Dahl, D. (1976) Isolation and initial characterization of glial fibrillary acidic protein from chicken, turtle, frog, and fish central nervous system. *Biochim Biophys Acta* **446**: 41-50.

De vivo, D.C., Leckie, M.P., Ferrendelli, J.S. and McDougal D.B.Jr. (1978) Chronic ketosis and cerebral metabolism. *Ann Neurol* **3**:331-337.

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

Eng, L.F.; Ghirnikar, R.S.; Lee, Y.L. (2000) Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**: 1439-1451.

Engel Jr., J (1996) Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* **26**:141-150.

Fróes, M.M.; Menezes, J.R.L. (2002) Coupled heterocellular arrays in the brain. *Neurochem Int* **41**: 367-375.

Gerlai, R.; Woytowicz, J.M.; Marks, A.; Roder, J. (1995) Overexpression of calcium-binding protein, S100 β , in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learn Mem* **2**(2): 26-39.

Gerlai, R; Marks, A; Roder, J. (1994) T-maze spontaneous alternation rate is decreased in S100B transgenic mice. *Behav Neurosci* **108**(1): 100-6.

Gromov, A.; Syrovatskaia, L.P.; Ovinova, G.V. (1992) Functional role of the neurospecific S100 protein in the processes of memory. *Neurosci Physiol Behav* **22**(1): 25-9.

Haas, H.L. (1983). Amine neurotransmitter actions in the hippocampus. In: *Neurobiology of the hippocampus*. Seifert, W. New York. Academic Press Inc. p.139-155.

Izquierdo, I.; Medina, J.H. (1997) The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in the other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, **68**, pp 285-316.

Karpiak S.E; Serokosz M; Rapport M.M. (1976) Effect of antisera to S100 protein and to synaptic membrane fraction on maze performance and EEG. *Brain Res* **102**(3): 313-21.

Keyser D.O. and Pellmar T.C. (1994) Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cells. *Glia* **10**: 237-243.

Kligman, D., Hsieh, L.S. (1987) Neurite extension factor induces rapid morphological differentiation of mouse neuroblastoma cells in defined medium. *Develop Brain Res* **33**: 296-300.

Kosenko, E.; Llansola, M.; Montoliu, C.; Monfort, P.; Rodrigo, R.; Hernandez-Viadel, M.; Erceg, S.; Sánchez-Perez, A.M; Felipo, V. (2003) Glutamine Synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem Int* **43**: 493-499.

Leino, R.L., Gerhart, D.Z., Duelli, R., Enerson, B.E. and Drewes, L.R. (2001) Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochem Int* **38**:519-27.

Leite, M., Frizzo, J.K., Nardin, P., Almeida L.M., Tramontina, F., Gottfried, C. and Gonçalves, C.A. (2004) β -Hydroxy-Butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull* **63**:139-143.

Lewis D; Teyler TJ. (1986) Anti-S100 serum blocks long-term potentiation in the hippocampal slice. *Brain Res* **383**(1-2): 159-64.

Liedke, W.; Edelman W.; Bieri, P.L.; Chiu, F.C.; Cowan, N.J.; Kucherlapati, R.; Raine, C.S. (1996) GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* **17**: 607-615;

Lorente de No, R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex II: continuation of the study of ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie* **46**: 113-77.

Lorenzini, C.G.A.; Baldi, E.; Bucherelli, C.; Sacchetti, B.; Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* **71**, pp 1-18.

Morimoto, K; Fahnestok, M.; Racine, R.J. (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* **73**:1-60.

Mello e Souza, T.; Rohden, A.; Meinhardt, M.; Gonçalves, C.A.; Quillfeldt, J.A. (2000) S100B infusion into rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation *Physiol Behav* **71**: 29-33.

Muller-Schwarze, A.B., Tandon, P., Liu, Z., Yang, Y., Holmes, G.L. and Stafstrom, C.E. (1999). Ketogenic diet reduces spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the kainic acid model. *Neuroreport* **10**: 1517-1522.

Nicholls, N.R.; Day, J.R; Laping, N.J.; Johnson, S.A.; Finch, C.E. (1993) GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging* **14**: 421-429.

Noh, H.S., Lee, H.P., Kim, D.W., Kang, S.S., Cho, G.J., Rho, J.M. and Choi, W.S. (2004) A cDNA microarray analysis of gene expression profiles in rat hippocampus following a ketogenic diet. *Mol Brain Res* **129**:80-7.

Nordli, D. (2002) The ketogenic diet: uses and abuses. *Neurology* **58** (Suppl7): S21-S24.

O'Callaghan, J.P. (1991) Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed Environ Sci* **4**:197-206.

Paxinos, G. (1997) The Rat Nervous System. 3rd ed., San Diego, *Academic Press*.

Pellerin L. and Magistretti P.J. (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(22): 10625-9.

Pfriege F.W. and Barres B.A. (1996) New views on synapse-glia interactions. *Current Op. in Neurob.* **6**:615-621.

Prasad, A.N; Stafstrom, C.E. (1998) Dietary therapy of epilepsy in the nineties; renewed experience with the ketogenic diet. *Nutrit Res* **18**: 403-416.

Quillfeldt, J.A.; Zanatta, M.S.; Schmitz, P.K.; Quevedo, J.; Schaeffer, E.; De Lima, J.B.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. (1996). Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurob Learn Mem* **66**, pp 97-101.

O'Dowd, B.S.; Zhao, W.Q.; Ng, K.T.; Robinson, S.R. (1997) Chicks injected with antisera of either S100 α or S100B protein develop amnesia for a passive avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* **67**(1-2):197-206.

Rocha, E.; Achaval, M.; Santos, P.; Rodnight, R. (1988) Lithium treatment causes gliosis and modifies the morphology of hippocampal astrocytes in rats. *Neuroreport* **9**(17): 3971-3974.

Selinfreund, R.H., Barger, S.W., Pledger, W.J., Van Eldik, L.J. (1991) Neurotrophic protein S100B stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3354-3358.

Stafstrom, C.E. (1999) Animal models of ketogenic diet: what have we learned what can we learn? *Epilep Res* **37**: 241-259.

Stafstrom, C.E. and Bough, K.J. (2003). The ketogenic diet for the treatment of epilepsy: a challenge for nutritional neuroscientists. *Nutr Neurosci* **6**: 67-79.

Tramontina, F., Conte, S., Gonçalves, D., Gottfried, C., Portela, L.V., Vinade, L., Salbego, C. and Gonçalves, C.A. (2002). Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol* **22**:373-8.

Tsacopoulos M. and Magistretti P.J. (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* **16**: 877-885.

Veech, R.L.; Chance, B.; Kashiwaya, Y.; Lardy, H.A.; Cahill Jr.; G.F. (2001) Ketone bodies, potential therapeutic uses. *Life* **51**: 241-247.

Ventura R. and Harris K.M. (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci.* **19**(16):6897-6906.

Wilder, R.M. (1921) The effects of ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Proc* **2**: 307-308.

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Grunstein, R. and Nissim, I (1997) Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J Neurochem* **69**: 682-692.

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A. and Nissim, I. (2004) Ketogenic diet, brain glutamate metabolism and seizure control. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**:277-85.

Ziegler, D.R., Oliveira, D.L., Pires C., Ribeiro, L., Leite, M., Mendez, A., Gonçalves, D, Tramontina, F., Portela, L.V., Wofchuk, S.T., Perry, M.L. and Gonçalves, C.A. (2004) Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid.

Neurosci Res **50**:375-9.